



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN



Chirurgische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Kommissarischer Leiter: Univ.-Prof. Dr. J. H. Kleeff)

Gewebeprotektion in der akuten Pankreatitis durch Signalwege des angeborenen Immunsystems

Charlotte Sophie Bruse

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. H. Kleeff
2. Priv.-Doz. Dr. Chr. Michalski

Die Dissertation wurde am 29.08.2013 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2014
angenommen.

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Verzeichnis der Abkürzungen	5
Tabellenverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
1 Einleitung.....	9
1.1 Akute Pankreatitis	9
1.1.1 Ätiologie.....	9
1.1.2 Klinik und Diagnostik Therapie.....	10
1.1.3 Therapie	11
1.1.4 Pathophysiologie	12
1.1.5 Experimentelle Induktion der Pankreatitis durch Caerulein.....	13
1.2 Toll-like Rezeptoren	14
1.2.1 Überblick	14
1.2.2 TLR und ihre Liganden	15
1.2.3 TLR und ihre Signaltransduktion	17
1.2.4 TLR und Gewebshomöostase.....	20
1.3 Typ I Interferone	21
1.3.1 Klassifikation und Vorkommen	21
1.3.2 Signaltransduktion von Typ I IFN	21
1.3.3 Funktionen von IFN α und IFN β	23
1.3.4 TLR und Typ I IFN.....	24
2 Problemstellung.....	25
3 Material und Methodik	26
3.1 Versuchstiere	26
3.2 Materialien.....	27
3.2.1 Geräte	27
3.2.2 Verbrauchsmaterialien	28
3.2.3 Reagenzien	28
3.3 Methodik.....	31
3.3.1 Induktion der akuten Pankreatitis durch Caerulein.....	31
3.3.2 Blutserum-Analysen	32

3.3.2.1 α -Amylase	32
3.3.2.2 Lipase.....	33
3.3.2.3 LDH	33
3.3.2.4 Calcium	34
3.3.3 Histologische Analysen	35
3.3.3.1 Gewebeschnitte Paraffin	35
3.3.3.2 Gefriergewebeschnitte	35
3.3.3.3 Auswertung der histologischen Schnitte	36
3.3.4 Quantitative RT-Polymerasenkettenreaktion.....	38
3.3.4.1 Funktionsprinzipien PCR.....	38
3.3.4.2 Funktionsprinzipien quantitative PCR	39
3.3.4.3 Isolation von mRNA	40
3.3.4.4 Qualitätssicherung der RNA.....	41
3.3.4.5 Synthese der cDNA (Reverse Transkription).....	42
3.3.4.6 Etablierung von Referenzgenen.....	42
3.3.4.7 „ <i>Universal Probes</i> “ qRT-PCR.....	43
3.3.5 Statistische Auswertung	45
4 Ergebnisse.....	46
4.1. Blutserum-Analysen	46
4.2. Histologische Analysen	49
4.3. Quantitative RT-Polymerasekettenreaktion.....	51
5 Diskussion	62
6 Zusammenfassung	67
7 Literaturverzeichnis	69
8 Tabellarischer Anhang.....	77
9 Danksagung	83

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMV	Aviäres Myeloblastose-Virus
AP	Akute Pankreatitis
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i> , akutes Lungenversagen
BCL	<i>B-cell lymphoma</i> (Apoptose regulierendes Protein)
BCP	1-Brom-3-Chlorpropan
CCL	CC-Motiv Ligand (Chemokine)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale auf Zellen
cDNA	<i>complementary DNA</i> , Komplementär-Desoxyribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	C-X-C-Motiv Ligand (Chemokine)
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung (= 9,80665 m/s ²)
GAS	<i>IFNγ-activated site</i>
Gr1	Granulozyten Antigen 1
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1
IFN	Interferon
IFNaR	Interferon-alpha-beta-Rezeptor
IL	Interleukin
IP	<i>Interferon gamma-induced protein</i> , Interferon gamma induziertes Protein
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISG	IFN-stimulierte Gene
ITGAM	Integrin alpha M (CD11b)
JAK	Janus-Kinase
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid

Ly-6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i> , Lymphozyten Antigen 6 complex, Locus G
LysM	Lysozym M
MAC1	Makrophagen Antigen 1 (CD11b)
min	Minute
MLV	Murines Leukämie-Virus
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PPIB	<i>Peptidylprolyl isomerase B</i> , Cyclophilin B
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time PCR</i> , quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPL13A	Ribosomales Protein L13A
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i> , generalisierte inflammatorische Reaktion unterschiedlicher Genese
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIF	<i>Toll-like receptor adaptor molecule 1 inducing interferon beta</i>
UP	Universal Probe® (Roche)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.....	26
Tabelle 2.....	27
Tabelle 3.....	28
Tabelle 4.....	28
Tabelle 5.....	29
Tabelle 6.....	29
Tabelle 7.....	31
Tabelle 8.....	44
Tabelle 9.....	51
Tabelle 10.....	77
Tabelle 11.....	78
Tabelle 12.....	78
Tabelle 13.....	79
Tabelle 14.....	80
Tabelle 15.....	81
Tabelle 16.....	81
Tabelle 17.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.....	17
Abb. 2.....	19
Abb. 3.....	23
Abb. 4.....	48
Abb. 5.....	50
Abb. 6.....	51
Abb. 7.....	53
Abb. 8.....	58
Abb. 9.....	60

1 Einleitung

1.1 Akute Pankreatitis

Die akute Entzündung der Bauchspeicheldrüse stellt noch heute eine Erkrankung mit hoher Morbidität, Mortalität und Hospitalisierung dar (Yadav und Lowenfels, 2013). Die Inzidenz der akuten Pankreatitis variiert zwischen 5-80 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Mayerle et al., 2005), wobei die Inzidenz in den letzten Jahrzehnten tendenziell steigend ist (Yadav und Lowenfels, 2006), (Frey et al., 2006), (Lindkvist et al., 2004). Man unterscheidet die milde interstitiell-ödematöse Verlaufsform, welche 80-85% der Patienten betrifft, und die mit einem meist selbstlimitierenden und komplikationslosen Verlauf und einer Mortalitätsrate unter 1% einher geht, von der schweren hämorrhagisch-nekrotisierenden Form, die ca. 15-20% der Patienten erleiden. Diese schwere Verlaufsform ist gekennzeichnet durch die Ausbildung lokaler Komplikationen, wie Pseudozysten, Abszesse, Nekrosen, welche systemische Reaktionen wie SIRS (systemic inflammatory response syndrome), Sepsis und Multiorganversagen zur Folge haben können (Hochman et al., 2006), und mit einer Mortalität von bis zu 30-40% assoziiert ist (Dambrauskas et al., 2010).

1.1.1 Ätiologie

Multiple Ursachen können zur Entstehung einer akuten Pankreatitis führen. Am häufigsten in Westeuropa (ca. 55%) ist die Choledocholithiasis, bei der es zu einer Verlegung der Vaterschen Papille (gemeinsame Mündung des Ductus Choledochus und des Ductus Pancreaticus in den Zwölffingerdarm) und somit zum Reflux von Gallen- und Pankreassaft in den Pankreasgang hinein führen (Wang et al., 2009). Durch den erhöhten intraduktalen Druck und der Permeabilitätssteigerung für Phospholipasen, die Phosphatide in zytotoxische Lysophosphatide umwandeln, kommt es zur vorzeitigen unkontrollierten Aktivierung von Pankreasenzymen. Dies fördert den Selbstverdau der Bauchspeicheldrüse und die Entstehung der Entzündungsreaktion (Diehl et al., 1997). Diese Form der akuten Pankreatitis wird auch biliäre Pankreatitis genannt.

An zweiter Stelle steht der Alkoholabusus (35%), wobei die Korrelation zwischen der Alkoholmenge und dem Auftreten der akuten Pankreatitis nur unzureichend geklärt ist (Gorelick, 2003), (Clemens und Mahan, 2010). Es wird angenommen, dass das

Risiko eine akute Pankreatitis zu erleiden bei einmaligem Konsum erheblicher Mengen an hartem Alkohol (Liköre oder Schnäpse) größer ist, als beim Konsum von Wein und Bier (Yadav, 2011), (Sand et al., 2007). Auch Alkohol führt zu einer Permeabilitätssteigerung des Pankreasgangsystems. Des Weiteren kann Alkohol die Sekretion und die Zusammensetzung des Pankreassafts verändern und eine Gangsklerosierung begünstigen. Seltener Gründe, die das Entstehen einer akuten Pankreatitis fördern, sind Hypertriglyceridämie, abdominale Adipositas, sowie Medikamente wie Azathioprin, Thiazide, Tetracycline oder Valproinsäure. Auch nach abdominalen Traumen, Abdominaloperationen oder nach einer ERCP (endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie) treten akute Pankreatitiden auf (Whitcomb, 2006). Des Weiteren gibt es hereditäre Formen der akuten Pankreatitis mit autosomal-dominantem Erbgang, bei denen Mutationen im kationischen Trypsinogen (PRSS1-Gen) oder Mutationen des Serinprotease-Inhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1-Gen) zu beobachten sind. Auch angeborene anatomische Anomalien wie das Pancreas divisum können eine akute Pankreatitis begünstigen. Ferner können auch Infektionen mit Mumps oder Virushepatitiden zu Entstehung einer akuten Pankreatitis führen. Virale Infektionen mit Epstein-Barr Viren, Coxsackie B-Viren, Echo-Viren oder Varizella-Zoster-Viren sind die häufigste Ursache für die akute Pankreatitis bei Kindern (Tonsi et al., 2009). In ca. 20% der Fälle bleibt die Genese unklar (idiopathische akute Pankreatitis).

1.1.2 Klinik und Diagnostik Therapie

Leitsymptom einer akuten Pankreatitis ist ein plötzlich einsetzender, heftiger epigastrischer Schmerz, der von den Patienten als dumpf und bohrend beschrieben wird, und meist mehrere Tage anhaltend ist. Dieser Schmerz kann gürtelförmig in den Rücken, in die Schulter aber auch in die Brust ausstrahlen. Nicht selten kommt es daneben zu Übelkeit, Erbrechen Meteorismus, Symptomen eines (Sub)ileus und Fieber. Bei schweren Verlaufsformen kann sich ein SIRS entwickeln, das mit Verbrauchskoagulopathie, akuter kardiovaskulärer Insuffizienz, akuter respiratorischer Insuffizienz (ARDS = acute respiratory distress syndrome) und akuter Niereninsuffizienz einhergeht, und zum septischen Schock führen kann (Werner et al., 2005). Bei diesen Verläufen kann man gelegentliche Ekchymosen im Bereich der Flanken (Grey-Turner-Zeichen) und im Bereich des Bauchnabels (Cullen-Zeichen) beobachten; diese treten in weniger als 3% der Fälle auf und sind

mit einer hohen Mortalität von fast 40% assoziiert (Meyers et al., 1989), (Bem und Bradley, 1998).

Sowohl das klinische Bild als auch der Anstieg der pankreasspezifischen Lipase und Pankreasamylase über das dreifache der oberen Norm im Serum und ein positiver Sonographiebefund sind zielweisend zur Diagnosestellung (Matull et al., 2006). Neben der Messung des C-reaktiven Proteins (CRP) und Leukozyten als Entzündungsparameter kommen bildgebende Mittel wie die Endo- und Abdomen-Sonographie und die kontrastmittelverstärkte Computer Tomographie Untersuchung zur Diagnostik und Verlaufskontrolle zum Einsatz (Toouli et al., 2002). Es ist von besonderer Bedeutung schwerere Krankheitsverläufe mit lokalen oder extrapancreatischen Komplikationen frühzeitig herauszufiltern und aggressiv zu therapieren, da die Morbidität und Mortalität bei diesen Patienten erhöht ist (Lund et al., 2006). Die gefährlichste lokale Komplikation ist die Pankreasnekrose, da diese häufig mit einer Latenzzeit von zwei bis drei Wochen durch bakterielle Superinfektion über die Galleflüssigkeit zur infizierten Pankreasnekrose führt. Während die Mortalitätsrate einer sterilen Nekrose bei 10% liegt, steigt diese auf Werte von 25% bei Superinfektion (Frossard et al., 2008). Die Prognoseabschätzung einer akuten Pankreatitis mit der Identifizierung potentiell lebensbedrohlicher komplikationsreicher Verläufe erfolgt über verschiedene Scoring-Systeme, wie den Ranson-Score, *Acute physiology and chronic health evaluation (APACHE II)* -Score und *Sequential organ failure assessment (SOFA)* –Score (Sandberg und Borgström, 2002) und über die Bestimmung von Serumparametern wie CRP oder Interleukin 6 (IL6) und deren Verläufe, wobei dies täglich wiederholt und evaluiert werden sollte (Sandberg und Borgström, 2002), (Pezzilli et al., 2010).

1.1.3 Therapie

Bei schweren Verläufen ist eine stationäre Aufnahme bzw. intensivmedizinische Überwachung und eine adäquate symptomatische Therapie unabdingbar. Neben der parenteralen Volumen-, Elektrolyt- und Glucosesubstitution (aufgrund der erheblichen Hypovolämie durch peripankreatische und retroperitoneale Sequestration) zur Sicherstellung einer ausreichenden Organperfusion gehören ferner eine angemessene Schmerztherapie und Ernährungsanpassung. Während sich milde Pankreatitisformen mit einer oralen Nahrungsreduktion bis zum Eintritt der Schmerzfreiheit gut behandeln lassen, ist bei mittel-schweren bis schweren

Pankreatitiden häufig das Legen einer nasojejunalen Sonde zur frühzeitigen enteralen Ernährung indiziert (Mayerle et al., 2005), (Whitcomb, 2006), (Imrie et al., 2002). Bei der nekrotisierenden Verlaufsform der Pankreatitis, oder bei Komplikationen wie infizierten Pseudozysten oder bei Abszessen ist eine zusätzliche antibiotische Therapie indiziert, um eine bakterielle Superinfektion zu vermeiden (Toouli et al., 2002).

Eine chirurgische Sanierung ist heute nur noch selten indiziert, sie spielt allerdings bei den komplikationsreicheren Verläufen, wie infizierten Pankreasnekrosen, Abszessen oder symptomatischen Pankreasfisteln und Pseudozysten eine Rolle. Patienten mit einer milden akuten biliären Pankreatitis sollten sich nach klinischer Besserung einer Cholezystektomie unterziehen (Bakker et al., 2011). Bei schwereren Verläufen sollte der chirurgische Eingriff nicht sofort, sondern so spät wie möglich erfolgen (Uhl et al., 2002). Bei klinischen Zeichen einer Choledocholithiasis und Cholangitis, z.B. Fieber oder Ikterus, sollte eine ERCP mit Steinentfernung innerhalb von 72 Stunden erfolgen (Frossard et al., 2008), (Wada et al., 2010).

1.1.4 Pathophysiologie

Noch heute sind die einzelnen pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entstehung einer akuten Pankreatitis führen nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass eine intra-azinäre Trypsinogenaktivierung in der akuten Phase den Azinuszellschaden, die Entzündungsreaktion und die Autodigestion hervorruft. Auch die mutierten Varianten des Trypsinogens bei den hereditären Formen der akuten Pankreatitis bestärken die Rolle des Trypsinogens in der Pathogenese.

Eine akute Pankreatitis entsteht, wenn intrazelluläre protektive Mechanismen, die die Trypsinogen-Aktivierung unterbinden oder die Trypsin-Aktivität reduzieren, ausfallen. Zu diesen protektiven Mechanismen zählen Trypsin-Inhibitoren wie der Serinprotease-Inhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1) und niedrige intrazelluläre Kalzium-Konzentrationen. Nach der frühzeitigen Aktivierung von Trypsinogen in aktives Trypsin kommt es neben einer kaskadenartigen Aktivierung weiterer Enzyme wie der Elastase und der Phospholipase A2 auch zu einer exzessiven intrazellulären Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern (Petersen et al., 2011). Daneben tragen Sauerstoffradikale als hochreaktive Substanzen zum Azinuszellschaden durch Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Plättchenaktivierender Faktor (PAF), Bradykinin und

Endothelin bei (Poch et al., 1999). Diese pathologischen Veränderungen führen dazu, dass die aktivierten Pankreasenzyme ins Blutsystem gelangen. Ferner kommt es im Pankreasgewebe zur Produktion von Entzündungsmediatoren, insbesondere von proinflammatorischen Zytokinen (Gross et al., 1993) wie IL1 β (Bhatia, 2005), IL6 (Suzuki et al., 2000) und IL8 durch aktivierte Neutrophile, Makrophagen (Shrivastava und Bhatia, 2010) und Lymphozyten. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) wird ebenso von lokalen Makrophagen freigesetzt und korreliert, wie IL6 (Bhatia, 2005), mit dem Schweregrad der Erkrankung (Norman et al., 1996). Auch antiinflammatorische Zytokine wie IL10 (Bhatia, 2009) oder der Komplementfaktor C5a (Bhatia et al., 2001) werden verstärkt exprimiert. Die Expression vieler dieser Zytokine wird über den *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*-Signalweg (NF κ B-Signalweg) reguliert (Rakonczay et al., 2008). Via Chemotaxis werden weitere Leukozyten angelockt und es kommt zur Aktivierung von vaskulärem Endothel mit gesteigerter Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM1 (Bhatia et al., 2005). Die dadurch entstehenden Endothelschädigungen und Mikrozirkulationsstörungen innerhalb des Pankreasgewebes begünstigen Nekrosen (Frossard et al., 2008).

1.1.5 Experimentelle Induktion der Pankreatitis durch Caerulein

Zum genaueren Verständnis der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis wurden diverse experimentelle Tiermodelle mit unterschiedlicher Methodik entwickelt. Das für Versuchszwecke am häufigsten gewählte Tiermodell ist das der supramaximalen Hormonstimulation mit Caerulein (Perides et al., 2005), welches zum ersten Mal im Jahre 1977 beschrieben wurde (Lampel und Kern, 1977). Caerulein ist ein Dekapeptid und wurde erstmals 1967 aus der Haut von Korallenfinger-Laubfröschen isoliert. Hinsichtlich der Struktur und der Wirkung weist es große Ähnlichkeiten zum gastrointestinalen Peptidhormon Cholezystokinin auf. Cholezystokinin ist ein wichtiger physiologischer Regulator der Sekretion von Verdauungsenzymen u.a. aus den Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse. In einer supramaximal stimulierenden Dosis bewirkt Caerulein morphologische Veränderungen der Pankreasazinuszellen, die einer akuten Pankreatitis gleichen, und die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* innerhalb von 15-30 min nach Applikation auftreten (Hofbauer et al., 1998). Durch Zerstörung des Zytoskeletts führt Caerulein zu einer Blockade der Sekretion aus Azinuszellen und zu intrazellulärer Trypsinogen-Aktivierung. Dies setzt den oben aufgeführten Entzündungsprozess in Gang. Caerulein bewirkt des Weiteren durch

Aktivierung der proteolytischen Kaspasen 8 und 3 die Induktion von Apoptose (Gukovskaya et al., 2002).

Man entdeckte, dass bei Ratten durch intravenöse oder auch intraperitoneale Applikation supramaximal stimulierender Dosen des Cholezystokininanalogons Caerulein eine milde, nicht letale, interstitiell-ödematöse Pankreatitis induziert werden kann, in der der Azinuszellschaden insbesondere durch Apoptose zustande kommt (Bhatia, 2004). Bei Mäusen dagegen treten bei gleichem Vorgehen auch nekrotische Areale auf (Kaiser et al., 1995). Somit eignet sich die Caerulein-induzierte Pankreatitis als Tiermodell zur Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen und molekularbiologischer Vorgängen.

1.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören als transmembranöse *Pattern Recognition Receptors* (PRR's) zum angeborenen Immunsystem und stellen eine hochkonservierte Rezeptorfamilie dar (Martinelli und Reichhart, 2005). Sie erlauben es dem angeborenen Immunsystem, zwischen „Eigen“ und „Fremd“ zu unterscheiden und leiten eine potente Entzündungsantwort ein. Toll-like Rezeptoren sind in der Lage verschiedene mikrobielle Strukturen u.a. sog. *PAMPs* (pathogen-associated molecular patterns) und *DAMPs* (damage-associated molecular patterns) zu erkennen und führen über weitere Signaltransduktion zu einer koordinierten, systemischen, inflammatorischen und antimikrobiellen Abwehr mit gezielter Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

1.2.1 Überblick

Das Toll-Gen, das der Rezeptorfamilie seinen Namen gab, wurde 1985 erstmals in Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) entdeckt, da es in der frühen embryonalen Entwicklung bei der dorso-ventralen Ausrichtung eine besondere Rolle spielt. Damals konnte gezeigt werden, dass bei fehlender Funktion des Toll-Gens keine Embryonalentwicklung der Fruchtfliegen möglich war, da sich alle embryonalen Zellen wie („Rücken“)Zellen der Wildtyp-Embryonen verhielten (Anderson et al., 1985). Erst elf Jahre später erkannte man auch die Rolle des Toll-Gens in der Immunabwehr: Fruchtfliegen mit defizientem Toll-Gen zeigten eine dramatisch verkürzte Überlebenszeit nach Pilzinfektion mit *Aspergillus niger* im Vergleich zum

Wildtyp (Lemaitre et al., 1996). Daraufhin wurde das humane Toll-ähnliche Protein identifiziert, welches genau wie das Drosophila Toll-Protein ein Transmembranrezeptor mit einer Leucin-reichen extrazellulären Domäne und einer dem IL1-Rezeptor (IL1R1) ähnlichen zytoplasmatischen Domäne ist. Es konnte gezeigt werden, dass bei ständiger Expression des Toll-„ähnlichen“ (Toll-like) Rezeptors (TLR) in menschlichen Zelllinien der NF κ B-Signalweg aktiviert und die Expression NF κ B-kontrollierter Gene, nämlich proinflammatorischer Zytokine wie IL1, IL6 und IL8 stimuliert wurde (Medzhitov et al., 1997). Bei Säugetieren konnte man je nach Spezies 10-15 verschiedene TLR identifizieren: beim Menschen konnte man TLR 1-10 entdecken, bei Mäusen zusätzlich TLR 11-13, wobei der murine TLR10 nicht existiert. Die einzelnen TLR werden auf diversen Zellen exprimiert, wobei die einzelnen Expressionsmuster auf den Zelllinien sehr unterschiedlich ausfallen und z.T. Diskrepanz in der Datenlage herrscht. Sie werden vor allem auf Epithelien des Intestinal-, Respirations- und Urogenitaltrakts und der Haut (Rakoff-Nahoum und Medzhitov, 2009), und auch auf Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, Mastzellen, NK-Zellen, Neutrophilen und Eosinophilen exprimiert (Iwasaki und Medzhitov, 2004). Vorläufige Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass TLR3 und TLR4 auch in Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse exprimiert werden.

1.2.2 TLR und ihre Liganden

Die Interaktion mit dem jeweiligen Liganden erfolgt bei TLR über die Leucin-reiche Wiederholungssequenzen (LRR) der extrazellulären Domäne, während es die zytoplasmatische Domäne ist, die sog. Toll/IL1-Rezeptor (TIR) Domäne, die für die Signaltransduktion verantwortlich ist (O'Neill, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Adaptermolekülen der TLR existiert, die ebenfalls hochkonserviert sind, über eine solche TIR Domäne verfügen und mit dem TLR über die TIR interagieren. Zu diesen zählen *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), *MyD88-adapter-like* (MAL, auch bekannt als TIRAP), *Toll-like receptor adaptor molecule 1 inducing interferone beta* (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM, auch bekannt als TICAM2) und *sterile α - and armadillo-motif-containing protein* (SARM) (O'Neill und Bowie, 2007).

Die einzelnen TLR erkennen unterschiedliche PAMPs bzw DAMPs und treten als Dimere auf: TLR1 und TLR2 bilden ein Heterodimer und erkennen bakterielle Triacyl-

Lipopeptide, TLR2 mit TLR6 erkennen als Heterodimer bakterielle Diacyl-Lipopeptide und TLR4 erkennt als Homodimer LPS (Lipopolysaccharide), das als Membranbestandteil gram-negativer Bakterien einen starken Virulenzfaktor darstellt. Der Homodimer TLR9 identifiziert unmethylierte CpG-reiche DNA-Motive bakterieller und viraler DNA. Man geht davon aus, dass auch TLR3 und TLR5 homodimerisieren: TLR3 detektiert virale Doppelstrang-RNA (dsRNA) und TLR5 bakterielles Flagellin. TLR7 und TLR8 heterodimerisieren und erkennen virale Einzelstrang-RNA (ssRNA) und Immunmodulatoren wie Imiquimod. TLR10 kann ebenfalls mit TLR1 oder TLR2 heterodimerisieren, allerdings wurde hierfür bisher noch kein Ligand gefunden (O'Neill und Bowie, 2007), (Brown et al., 2011).

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und der humane TLR10 bzw murine TLR11 befinden sich in der Zellmembran und gewährleisten vorrangig die Abwehr bakterieller Pathogene, indem sie bakterielle Produkte von denen des Wirtes differenzieren können. Dagegen spielen TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 durch Erkennung viraler Nukleinsäuren eine wichtige Rolle in der antiviralen Abwehr und liegen in intrazellulären Kompartimenten, v.a. im Endosom (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

Aber nicht nur exogene mikrobielle Strukturen führen zur Aktivierung von TLR. Auch endogene Stimuli, wie Fragmente der extrazellulären Matrix (z.B. Hyaluronsäure oder Biglykan) oder intrazelluläre Proteine, wie das Protein *high-mobility group box 1* (HMGB1), das von nekrotischen Zellen freigesetzt wird, aktivieren TLR und können proinflammatorische Prozesse in Gang setzen (Iwasaki und Medzhitov, 2010) (siehe Abb. 1).

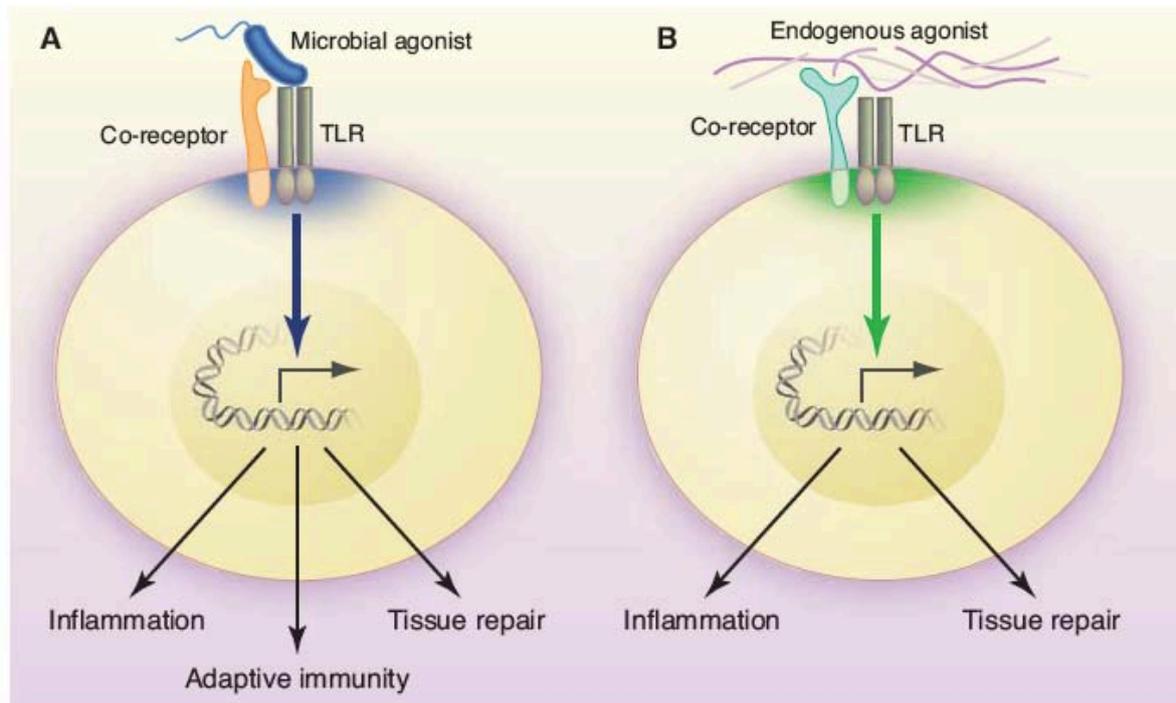


Abb. 1 A) Exogener und B) endogener Einfluss auf die TLR Signaltransduktion (mit freundlicher Genehmigung aus Iwasaki und Medzhitov, 2010)

1.2.3 TLR und ihre Signaltransduktion

Zusätzlich zur Ligandenspezifität und Expressionsmustern lassen sich die einzelnen TLR in ihren Adaptermolekülen und Signaltransduktionswegen unterscheiden. Nach Bindung des Liganden an die jeweiligen TLR führen die in Kapitel 1.2.2 beschriebenen Adaptermoleküle MyD88, MAL (TIRAP), TRIF und TRAM (TICAM2) zur Rekrutierung und Aktivierung von „*downstream*“-Kinasen und spezifischer Transkriptionsfaktoren, die die Immunantwort regulieren.

Die Signaltransduktion der TLR verläuft entweder über einen MyD88-abhängigen oder über einen MyD88-unabhängigen Signalweg und endet in der Produktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone (IFN) (siehe Abb. 2). Mit Ausnahme von TLR3 und speziellen TLR4-Signalwegen, die via TRIF einen MyD88-unabhängigen Weg wählen, läuft bei den restlichen TLR die Signaltransduktion über das Adaptermolekül MyD88, das eine NH₂-terminale „*death domain*“ und eine carboxyterminale TIR-Domäne besitzt. Über eine TIR-TIR Bindung lagert MyD88 an der TIR-Domäne des TLR an und kann über die „*death domain*“ mit seinen

„downstream“-Molekülen (sog. IL1R-assoziierte Kinasen (IRAK)) interagieren (O’Neill und Bowie, 2007).

TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 bedürfen MAL (TIRAP) zur Anlagerung von MyD88 an die zytoplasmatische TIR-Domäne. IRAK4 wird von MyD88 rekrutiert und führt zur weiteren Aktivierung von IRAK1 durch Phosphorylierung. IRAK1 hat als „downstream“-Molekül den Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6), welcher über weitere Signalwege NF κ B aktiviert (O’Neill und Bowie, 2007), und durch dessen Translokation in den Nukleus und zur Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL1, IL6 oder TNF α führt (Ghosh et al., 1998). Im Fall der Aktivierung von TLR4 kann NF κ B sowohl über MyD88 in der Frühphase als auch über TRIF etwas verzögert in einer späteren Phase aktiviert werden. Das bedeutet, dass TLR4 zeitlich früher via MyD88, zeitlich später über TRIF die NF κ B-abhängige Genexpression antreibt, wobei beide Phasen für die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen notwendig sind. Außerdem vermag MyD88 auch über IRAK4 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAP-Kinasen) zu aktivieren und auch dadurch die Genexpression proinflammatorischer Zytokine zu induzieren (Kawai und Akira, 2010).

Der MyD88-unabhängige Signalweg, die TRIF-Signalkaskade, erfolgt über die Aktivierung von TBK1, welches wiederum *Interferon regulatory factor 3* (IRF3) rekrutiert. IRF3 ist für die TRIF-abhängige Induktion der Typ I IFN Antwort verantwortlich (Yamamoto et al., 2003). Davon unabhängig vermag TRIF auch über TRAF6 die Expression von NF κ B verzögert im Vergleich zur frühen Phase zu induzieren (Sato et al., 2003). Des Weiteren kann TRIF in einem weiteren für TLR3 spezifischen Signalweg über das Rezeptor-interagierende Protein 1 (RIP1) die Induktion von Apoptose auslösen (O’Neill und Bowie, 2007).

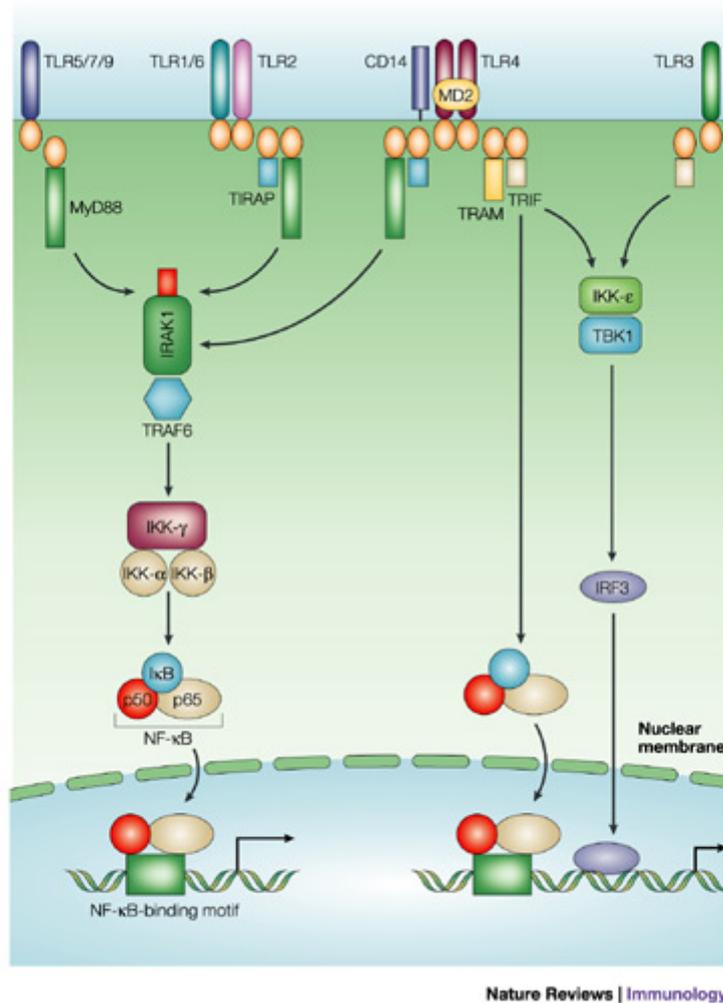


Abb. 2 Die Signaltransduktion der TLR3 und TLR4 führt über TRIF (TLR3 und TLR4) und über MyD88 (TLR4) zur Aktivierung des NF κ B-Signalwegs. (mit freundlicher Genehmigung aus Akira und Takeda, 2004)

Die zentrale Aufgabe der TLR liegt in der Abwehr pathogener Erreger und in der Induktion der inflammatorischen Immunreaktion. Neben der Produktion proinflammatorischer Zytokine über NF κ B kommt es nach Erkennung von PAMPs durch TLR zur Expression von Selektinen, Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren, die unter anderem die Migration von Entzündungszellen zur Stelle der Infektion verursachen. Selektine fördern die Anheftung von Leukozyten an die vaskulären Endothelzellen. Chemokine führen zu Konformationsänderungen der Integrine auf Leukozyten, was den Leukozyten eine festere Anheftung ans Endothel erlaubt. Die Induktion der Expression von endothelialen Integrin-Liganden wie dem interzellulären Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM1) erfolgt entweder direkt über TLR des Endothels oder indirekt über IL1 und TNF. Dadurch können die Leukozyten zwischen den

Endothelzellen der Gefäße hindurch ins Interstitium wandern und die Stelle der Entzündung erreichen (Rakoff-Nahoum und Medzhitov, 2009).

Angeregte TLR vermögen außerdem die Expression von Co-Stimulatoren (CD80 und CD86) zu bewirken, welche für die Reifung von CD4 positiven T-Zellen von Nöten sind, und bestimmen u.a. auch die Reifung von B-Zellen mit, indem sie den Isotypenswitch von Immunglobulinen und die somatische Hypermutation beeinflussen (Gerondakis et al., 2007). So nehmen die TLR auch Einfluss auf die adaptive Immunabwehr (Medzhitov et al., 1997). Durch die Interaktion von angeborenem und adaptivem Immunsystem tragen die TLR zu einer komplexen Immunantwort bei. Daneben sind die TLR nach Erkennung endogener *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) auch in verschiedenen Prozessen der Gewebeshomöostase, der Gewebsinstandsetzung und der Gewebsregeneration eingebunden (Iwasaki und Medzhitov, 2010), (Inokuchi et al., 2010), (Michelsen und Arditi, 2007).

1.2.4 TLR und Gewebshomöostase

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 erwähnt werden TLR auch auf Epithelzellen (z.B. des Darmes) exprimiert. Dort sind sie unter anderem für die Instandhaltung einer funktionierenden Barriere in der mikrobiellen Abwehr zuständig. Es konnte gezeigt werden, dass TLR auch in der Zellproliferation von Epithelien und der Erhaltung von *tight junctions* als parazelluläre Barrieren eine Rolle spielen. Ebenso wichtig sind sie für die IgA-Sekretion und die Expression antimikrobieller Peptide, wie Defensine und Lysozyme in der Abwehr pathogener Erreger (Abreu, 2010). So vermag zum Beispiel TLR4 durch Induktion der Transkription von Wachstumshormonen und über die Aktivierung der Cyclooxygenase (COX) 2 Signalwege der Zellproliferation zu aktivieren und dadurch für eine Zellhomöostase und Gewebsregeneration zu sorgen (Fukata et al., 2006), (Fukata et al., 2007). Bei Dysregulation dieser Signalkaskaden kann es zur Entstehung von Entzündung bis hin zur Karzinogenese kommen. Die TLR stellen somit u.a. eine Verbindung zwischen bakterieller Infektion, chronischer Entzündung und Krebsentstehung her (Abreu, 2010).

1.3 Typ I Interferone

Interferone (IFN) gehören neben den Interleukinen, den *Colonie*-stimulierenden Faktoren (CSF), den Chemokinen und den Tumornekrosefaktoren zu der Gruppe der Zytokine und nehmen einen hohen Stellenwert in immunologischen Reaktionen ein.

1.3.1 Klassifikation und Vorkommen

IFN lassen sich in zwei Untergruppen unterteilen, die Typ I IFN, zu denen IFN α und IFN β gehören, und die Typ II Interferone, nämlich IFN γ . Ursprünglich wurde den IFN vor allem eine Rolle in der antiviralen Abwehr zugeschrieben, da sie nach Kontakt mit Viren ausgeschüttet, die Nachbarzellen vor Infektion schützten. Neben der antiviralen Abwehr wirken IFN auch antiproliferativ und immunmodulierend.

Im Gegensatz zum Zytokin IFN γ , das nur von Natürlichen-Killer (NK-) Zellen, Natürlichen-Killer-T (NKT-) Zellen und T-Zellen produziert werden kann, kann die Transkription von IFN α und IFN β nach Stimulation durch Viren und andere Mikroorganismen in allen kernhaltigen Zellen erfolgen. Beim Menschen existieren 30, bei der Maus 24 Typ I IFN Gene, wovon jeweils 13 Gene für homologe IFN α -Proteine und 1 Gen für das IFN β -Protein kodieren (Noppert et al., 2007). Trotz der Unterschiede zwischen Typ I und Typ II IFN verläuft die Signaltransduktion beider Zytokin-Untergruppen über ähnliche Signalwege, was zur Expression gemeinsamer Gene führt.

1.3.2 Signaltransduktion von Typ I IFN

Die Stimulation durch Viren, Bakterien oder durch TLR-Liganden wie LPS oder CpG führt zur Induktion der Transkription von IFN β und IFN α 4 (Taniguchi und Takaoka, 2002). Die Transkription verläuft hauptsächlich über Proteine der IRF-Familie, bei IFN β vor allem über IRF3, bei IFN α hauptsächlich über IRF7, das MyD88-abhängig aktiviert wird (O'Neill und Bowie, 2007), (Noppert et al., 2007).

Nach ihrer Freisetzung binden Typ I IFN an den Interferon-alpha-beta-Rezeptor (IFN α R), ein Heterodimer, das aus den Untereinheiten IFN α R1 und IFN α R2 besteht. Man geht davon aus, dass der IFN α R auf allen Zellen konstitutiv exprimiert wird (Noppert et al., 2007). Die Untereinheiten des IFN α R interagieren mit je einer Janus-Kinase (JAK): IFN α R1 mit Tyrosin-Kinase 2 (TYK2) und IFN α R2 mit JAK1 (Platanias, 2005). Die Bindung von Typ I IFN an dem IFN α R führt zum Rearrangement und

Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten, was wiederum die Autophosphorylierung und Aktivierung der JAK nach sich zieht. Dadurch werden sog. *signal transducer and activator of transcription* (STAT) –Proteine, v.a. STAT1 und STAT2 phosphoryliert und aktiviert und der JAK-STAT–Signalweg in Gang gesetzt. Für die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT1 wird die Anwesenheit von phosphoryliertem STAT2 benötigt. STAT2 dagegen kann auch bei Fehlen von STAT1 phosphoryliert werden (Darnell, 1997). STAT1, STAT2 und IRF9 bilden einen Komplex namens ISG Faktor 3 (ISGF3), der an Interferon-stimulierten Responsiven Elementen (ISRE) in Promotoren gewisser Gene binden kann, und zur Transkription von z.B. IRF7, ISG15 und IP10 führt (siehe Abb. 3). STAT1 kann als Homodimer durch Bindung an sog. *IFN γ -activated site* (GAS) die Transkription von IRF1 induzieren, was u.a. die Expression weiterer Typ I IFN und die Expression der induzierten Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) antreibt (Taniguchi und Takaoka, 2002). STAT1 spielt auch in der Signaltransduktion von IFN γ eine entscheidende Rolle (Dunn et al., 2006).

Die Sekretion von IFN β und IFN α 4 kann über eine positive Rückkoppelungsschleife durch den IFN α R die Expression weiterer IFN α -Subtypen hochregulieren und so eine antivirale Abwehr für Nachbarzellen bewirken. Auch STAT1 wirkt über eine positive Rückkoppelungsschleife stimulierend auf die Expression von Typ I oder Typ II IFN (Shuai und Liu, 2003).

Durch die Aktivierung weiterer Signalwege z.B. über STAT4 bzw. STAT5 oder über Proteine wie *Ras-related protein1* (Rap1) oder MAP-Kinasen erzielt der Typ I IFN-Signalweg eine mannigfaltige Genexpression (Noppert et al., 2007).

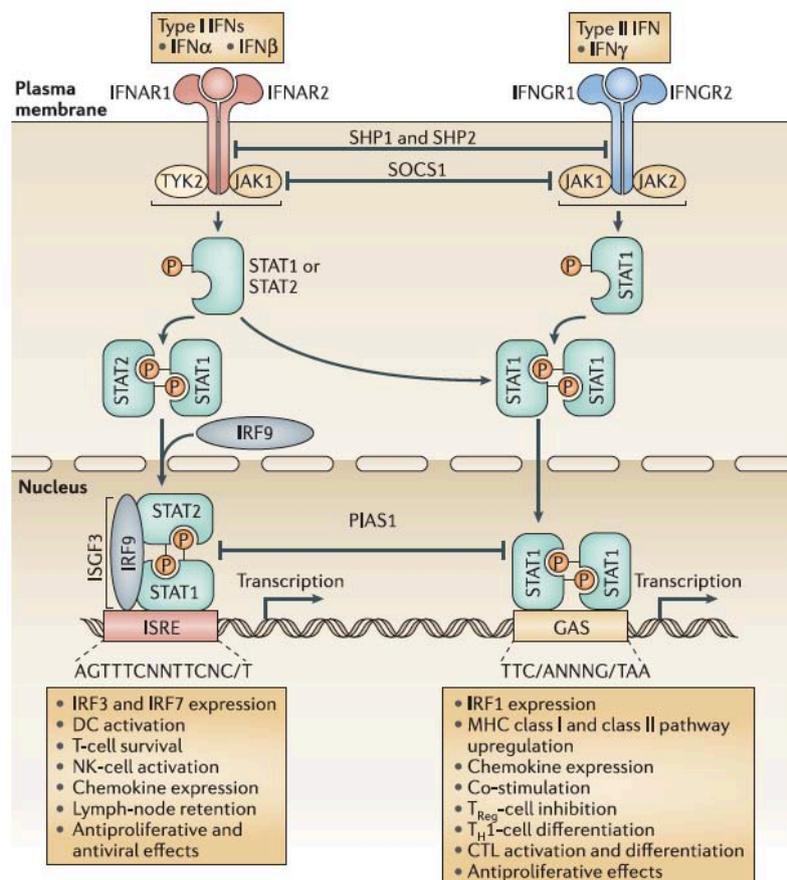


Abb. 3 Signaltransduktion von Typ I und Typ II IFN führt über Bindung am IFN α R zur Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs (mit freundlicher Genehmigung von Dunn et al., 2006)

1.3.3 Funktionen von IFN α und IFN β

Antiviral wirken IFN α und IFN β über eine Vielfalt von Mechanismen, unter anderem durch Aktivierung von Enzymen, die virale RNA degradieren können (RNasen). Obgleich die Funktion von IFN α und IFN β meistens mit der antiviralen Abwehr assoziiert wird, führen Typ I IFN zur Transkription einer Vielzahl von Genen, die in den verschiedensten Mechanismen der adaptiven Immunabwehr von großer Bedeutung sind. Zum Beispiel fördern IFN α und IFN β die Proliferation von T-Gedächtniszellen und verhindern T-Zell-Apoptose (Tough et al., 1999). Ferner sind sie am Isotypenswitch von B-Zellen und an ihrer Differenzierung in Plasmazellen durch die Aktivierung von dendritischen Zellen beteiligt. Des Weiteren können IFN α und IFN β NK-Zellen und Makrophagen aktivieren und so direkt die Immunantwort

modulieren (Takaoka und Yanai, 2006). Darüber hinaus können $\text{IFN}\alpha$ und $\text{IFN}\beta$ auch die Rekrutierung dieser Immunzellen zur Stelle der Entzündung durch die Induktion von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren beeinflussen (Salazar-Mather et al., 2002).

Durch negativen Einfluss auf die Produktion von Wachstumsfaktoren und Eingriffe in die Regulation des Zellzyklus können Typ I IFN antiproliferativ wirken. Außerdem regulieren sie die Expression mehrerer Moleküle, die im Zell-Überleben bzw. für die Apoptose eine Rolle spielen, wie Mitglieder der BCL2-Familie (Noppert et al., 2007).

Typ I IFN sind auch bei der Bekämpfung von Tumorzellen wichtig: Sie greifen zwar nicht direkt (wie $\text{IFN}\gamma$) Tumorzellen an, doch sind sie in der Lage durch Inhibition der Myelopoese protektiv gegen den Tumor zu wirken (Dunn et al., 2006).

1.3.4 TLR und Typ I IFN

Die einzelnen TLR unterscheiden sich in ihrem Vermögen, die Expression von $\text{IFN}\alpha$ und $\text{IFN}\beta$ zu induzieren. Während die Signalwege von TLR1, TLR2, TLR5 und TLR6 nicht zur Expression von Typ I IFN führen, vermögen dies TLR3, TLR4, TLR7 und TLR9 über unterschiedliche Signalstrecken. Dadurch dass jedes Pathogen meistens nicht nur einen TLR aktiviert, sondern mehrere verschiedene TLR, geht man davon aus, dass aus der Kombination die Expression von Typ I IFN resultiert (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

2 Problemstellung

Toll-like Rezeptoren, eine der bedeutendsten *Pattern Recognition* Rezeptorfamilien des angeborenen Immunsystems, sind von äußerster Wichtigkeit in der Induktion einer adäquaten Entzündungsantwort. Sie erkennen nicht nur mikrobielle Strukturen oder immunstimulierende Moleküle, sondern sind auch in der Lage in Mechanismen des erworbenen Immunsystems einzugreifen.

Diese Dissertation befasst sich mit der Bedeutung der Signaltransduktionsmoleküle TRIF und MyD88 im TLR3- bzw. TLR4-abhängigen Signalweg in der murinen Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis. Es stellt sich die Frage, welche Veränderungen in der Entzündungsantwort bei Wegfall von Genen dieses Signalwegs zu finden sind. Es soll hier auf die histopathologischen, morphologischen Veränderungen des Schweregrades der akuten Entzündung sowie auf eine möglicherweise veränderte Genexpression auf mRNA-Ebene eingegangen werden. Ferner soll geklärt werden, welche Mechanismen für diese Veränderungen verantwortlich gemacht werden können.

3 Material und Methodik

3.1 Versuchstiere

Tabelle 1: Versuchstiere und Zuchtorte		
Versuchstier	Zuchtort	Erstbeschreibung
Trif ^{dps2/lps2}	Zentrum für präklinische Forschung der der TU München	K. Hoebe et al., 2003 (Bhatia, 2004)
MyD88 ^{-/-} /Trif ^{dps2/lps2}	Zentrum für präklinische Forschung der der TU München	K. Hoebe et al., 2003 (Hoebe et al., 2003) O. Adachi et al., 1998 (Adachi et al., 1998)
TLR3 ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie, TU München	L. Alexopoulou et al., 2001 (Alexopoulou et al., 2001)
MyD88 ^{-/-}	Zentrum für präklinische Forschung der der TU München	O. Adachi et al., 1998 (Adachi et al., 1998)
IFNaR ^{-/-}	Helmholtz-Zentrum München	U. Müller et al., 1994 (Müller et al., 1994)
STAT1 ^{-/-}	Helmholtz-Zentrum München	J. Durbin et al., 1996 (Durbin et al., 1996)
C57BL/6N (Wildtyp)	Charles River Lab., Sulzfeld	C.C. Little, 1921

Die im Folgenden beschriebenen tierexperimentellen Arbeiten wurden an Mäusen (*Mus musculus*) durchgeführt.

Alle verwendeten Versuchstiere waren globale Gen-defiziente Mäuse, sog. globale *Knock-out* Mäuse, das bedeutet, dass ihnen bestimmte Gene in der Keimbahn sowie in allen somatischen Zellen fehlten oder mutiert waren, und somit die betreffenden Gene funktionell ausgeschaltet waren.

Trif^{dps2/lps2} ist eine Knock-out Maus, bei der das TRIF-Gen auf beiden Allelen mutiert ist und dadurch deaktiviert ist. MyD88^{-/-}/Trif^{dps2/lps2} ist eine Doppel-Knock-out Maus, der das Gen MyD88 auf beiden Allelen gentechnisch deaktiviert wurde, und der aufgrund einer Mutation auf beiden Allelen das TRIF-Gen fehlt.

Bei den Mäusen TLR3^{-/-}, MyD88^{-/-}, IFNaR^{-/-} und STAT1^{-/-} handelt es sich ebenfalls um eine Knock-out Mäusen, bei denen jeweils auf beiden Allelen die jeweiligen Gene deaktiviert wurde.

Es wurden pro Mausstamm 12 Mäuse verwendet, von denen je 6 Caerulein und 6 isotonische Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert bekamen. Aus Zuchtproblemen konnten allerdings insgesamt nur 9 MyD88^{-/-}-Tiere verwendet werden, von denen 6 Caerulein und 3 Kochsalzlösung erhielten.

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (TVA: Az.55.2-1-54-2531-147-09 (Molekulare und morphologische Analyse akuter Pankreatitis bei Mäusen mit Defekten des angeborenen Immunsystems)).

3.2 Materialien

3.2.1 Geräte

Tabelle 2: Relevante Geräte	
Gerät	Hersteller
Vakuum Gewebeeinfiltrationsautomat ASP200 S	Leica Microsystems, Wetzlar
Paraffin-Einbettgerät Leica EG1160	Leica Microsystems, Wetzlar
NanoDrop® ND-1000	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Gel Doc XR System	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Fisher Scientific, Ulm
Heizblock	Liebisch, Bielefeld Kleinfeld, Gehrden
Kryostat	Leica, Wetzlar
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Multifuge	Heraeus, Osterode
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Zentrifuge Centrifuge 5414 R	Eppendorf, Hamburg
Waagen	Sartorius, Göttingen
Tissue Lyser II	Qiagen GmbH/Retsch, Hilden
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Osterode
Gefrierschrank -20°C	Siemens, München
Autoklav	Systec, Wettenberg
Mikrowelle	Micromaxx
LightCycler®480	Roche Applied Science, Mannheim
Zeiss Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop-Kamera AxioCam ICc3	Carl Zeiss, Oberkochen

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Micro-Fine 1 ml (U100) Insulinspritze 0,33 mm (29G) x 12,7 mm	BD, Heidelberg
Micro-Fine 0,3 ml (U100) Insulinspritze 0,30 mm (30G) x 8 mm	BD, Heidelberg
Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe
Paraffin Histosec Pastillen (ohne DMSO)	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen mit Filter	Kisker Biotech GmbH & Co KG,
Deckgläser 24 x 50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Objektträger Superfrost® Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Serumröhrchen Microtainer SST	BD, Heidelberg
Tissue-Tek® Cryomold Standard	Sakura, Alphen aan den Rijn, Holland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche Applied Science, Mannheim

3.2.3 Reagenzien

Materialien	Hersteller
Caerulein C9026	Sigma-Aldrich, Stammheim
NaCl 0,9% Injektionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Tri-Reagenz	Sigma-Aldrich, Stammheim
1-Bromo-3-Chloropropan	Sigma-Aldrich, Stammheim
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (70%, 80%, 96%, 99,8%)	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Paraformaldehyd 4%	
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Eosin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Tissue Tek®	Sakura, Alphen aan den Rijn, Holland
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Temgesic®	Essex Pharma GmbH, München
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) (10x)	MBI, San Francisco, USA
Agarose	Biozym, Oldendorf
38% Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Stammheim
Oligonukleotid-Primer	Metabion, Martinsried
Universal Probe Library	Roche Applied Science, Mannheim

Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Eindeckmedium Vectamount™	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ultra Pure LPS (Salmonella minnesota R595)	List Biological Laboratories, Campbell, USA

Tabelle 5: Stammlösungen

Materialien		
Diethylpyrocarbonat (DEPC) – Wasser	0,1%	DEPC → ü/N bei RT rühren → autoklavieren
DNA-Auftragspuffer (6x)	1 ml 1 ml 5 ml 3 ml	10x TAE-Puffer Orange G [10 mg/ml] Glycerin ddH ₂ O
Eosin	1,5 g 300 ml 6 Tropfen	Eosin Ethanol 96% Essigsäure (100%) → steril filtrieren
RNA-Auftragspuffer (2x)	160 µl 80 µl 720 µl 720 µl 160 µl 120 µl	MOPS (10x) Bromphenolblau (gesättigt) Formamid 37 % Formaldehyd Glycerin ddH ₂ O → Aufbewahrung bei -20°C

Tabelle 6: Oligonukleotid–Primer für Universal Probes PCR (Metabion, Martinsried)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendete Probe
PPIB 5'	TTC TTC ATA ACC ACA GTC AAG ACC	UP 20
PPIB 3'	TCC ACC TTC CGT ACC ACA TC	UP 20
RPL13A 5'	CCC TCC ACC CTA TGA CAA GA	UP 108
RPL13A 3'	GTA GGC TTC AGC CGA ACA AC	UP 108
IL6 5'	GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A	UP 6
IL6 3'	CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA	UP 6
TNF α 5'	TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC	UP 49
TNF α 3'	GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT	UP 49
LysM 5'	GGA ATG GCT GGC TAC TAT GG	UP 64
LysM 3'	TGC TCT CGT GCT GAG CTA AA	UP 64
CCL2 5'	CAT CCA CGT GTT GC TCA	UP 62
CCL2 3'	GAT CAT CTT GCT GGT GAA TGA GT	UP 62
CXCL9 5'	CCA TGA AGT CCG CTG TTC TT	UP 1
CXCL9 3'	TGA GGG ATT TGT AGT GGA TCG	UP 1
CXCL10 5'	AAT GAA AGC GTT TAG CCA AAA A	UP 56

CXCL10 3'	AGG GGA GTG ATG GAG AGA GG	UP 56
CXCL11 5'	ACA GGA AGG TCA CAG CCA TAG	UP 71
CXCL11 3'	CCC CTG TTT GAA CAT AAG GAA G	UP 71
CD3 5'	CCA GAG ATG GGA GGC AAA C	UP 82
CD3 3'	AGT GCA TTG TAT ACG CCT TCC	UP 82
CD19 5'	AAG GTC ATT GCA AGG TCA GC	UP 21
CD19 3'	CTG GGA CTA TCC ATC CAC CA	UP 21
CD11b 5'	CAA TAG CCA GCC TCA GTG C	UP 76
CD11b 3'	GAG CCC AGG GGA GAA GTG	UP 76
Gr1 5'	TGC GTT GCT CTG GAG ATA GA	UP 13
Gr1 3'	CAG AGT AGT GGG GCA GAT GG	UP 13
HPRT 5'	TCC TCC TCA GAC CGC TTT T	UP 95
HPRT 3'	CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC	UP95
Beta Actin 5'	CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG	UP 64
Beta Actin 3'	ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA	UP 64
FasL 5'	ACC GGT GGT ATT TTT CAT GG	UP 21
FasL 3'	AGG CTT TGG TTG GTG AAC TC	UP 21
Trail 5'	GCT CCT GCA GGC TGT GTC	UP 76
Trail 3'	CCA ATT TTG GAG TAA TTG TCC TG	UP 76
Bim 5'	GGA GAC GAG TTC AAC GAA ACT T	UP 41
Bim 3'	AAC AGT TGT AAG ATA ACC ATT TGA GG	UP 41
Noxa 5'	CAG ATG CCT GGG AAG TCG	UP 15
Noxa 3'	TGA GCA CAC TCG TCC TTC AA	UP 15
Puma 5'	TTC TCC GGA GTG TTC ATG C	UP 79
Puma 3'	TAC AGC GGA GGG CAT CAG	UP79
BCL2 5'	GTA CCT GAA CCG GCA TCT G	UP 75
BCL2 3'	GGG GCC ATA TAG TTC CAC AA	UP 75
BCL2L1 5'	TGA CCA CCT AGA GCC TTG GA	UP 2
BCL2L1 3'	GAG GGG TGT ACC TCC ACT CA	UP 2
BCL2L2 5'	CAA GTG CAG GAT TGG ATG GT	UP 80
BCL2L2 3'	CCC GTA TAG AGC TGT GAA CTC C	UP 80
Birc2 5'	TGA TGG TGG CTT GAG ATG TT	UP 80
Birc2 3'	CCC TTC ATC CGT ATC AAG AAC T	UP 80
Birc3 5'	CGA TGC ACA ACA CGA GAT GA	UP 68
Birc3 3'	TTT GTT CTT CCG GAT TAG TGC	UP 68
Birc4 5'	GAG GCA GGA AGC TAA CGT TTT	UP 26
Birc4 3'	AAT AGG ACT TGT CCA CCT TTT CA	UP26
Flip1 5'	CTT CGC TCC CAA AAT TGA GT	UP 50
Flip1 3'	TCC ACA AAT CTT GGC TCT TTA CT	UP 50
Flip2 5'	TCC AGA AGT ACA CCC AGT CCA	UP 80
Flip2 3'	CAC TGG CTC CAG ACT CAC C	UP80

Tabelle 7: Verwendete Kits

Name	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden,
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
LightCycler® 480 Probes Master	Roche Applied Science, Mannheim

3.3 Methodik

3.3.1 Induktion der akuten Pankreatitis durch Caerulein

Die Induktion der akuten Pankreatitis erfolgte durch die intraperitoneale Injektion des Cholezystokinin-Analogons Caerulein (50 µg/kg KG, in 0,9% NaCl gelöst) in einer supramaximal stimulierenden Dosis, also einer 50-fach höheren als der maximal stimulierenden Dosis (Singh et al., 2001).

In 10 stündlichen Injektionen wurde jeweils 1 µg Caerulein, insgesamt 10 µg, intraperitoneal appliziert. Dies ist ein standardisiertes und gängiges Verfahren zur Induktion einer akuten Pankreatitis bei Mäusen oder Ratten. Der Schweregrad der Erkrankung, der durch die intraperitoneale Caerulein-Injektionen entsteht, ist bei Mäusen als Versuchstieren gravierender als bei Ratten, jedoch überleben alle Tiere dieses etablierte Versuchsprotokoll (Niederau et al., 1985), (Bhatia et al., 2001).

Die Kontrolltiere erhielten in gleichen Abständen dieselbe Menge 0,9% Kochsalzlösung injiziert. Um präemptiv Schmerzen, die durch die Pankreatitis und die peritoneale Reizung verursacht werden, zu verhindern, erfolgte vor der ersten Caerulein-Injektion eine Analgesie mit dem halbsynthetischen Opioid Buprenorphin (Temgesic®) (0,1 mg/kg KG subkutan).

Eine Stunde nach der letzten Injektion wurden die Tiere vor der Euthanasie zunächst mit Isofluran betäubt. Darauf erfolgte eine retrookuläre Blutentnahme, bei der das Blut in Serumröhrchen des Typs Microtainer SST (BD) gesammelt wurde. Anschließend wurde die Halswirbelsäule der Mäuse subluxiert. Die Organentnahme erfolgte nach medianer Laparotomie: Pankreas und Leber wurden entnommen, das Gewebe wurde geteilt, ein Teil wurde in Formalin 4% fixiert, ein anderer Teil wurde für Gefrierschnitte in einem *Cryomold* (Tissue Tek®) mit OTC-Medium (Tissue Tek®) fixiert und sofort bei -80 °C eingefroren, und der letzte Teil des Gewebes wurde zügig in kleine Stückchen zerteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um für die Isolation von RNA weiterverwendet zu werden.

Für die Entnahme von Lungengewebe wurde bei den Mäusen zunächst eine mediane Thorakotomie durchgeführt, woraufhin der linke Lungenflügel Hilus-nah ligiert wurde. Anschließend wurde eine Tracheotomie durchgeführt, wodurch der rechte Lungenflügel mit 1 ml einer PBS/OTC Lösung (1:1) perfundiert werden, so dass dieser sich wieder entfaltete und in seiner physiologischen, nicht kollabierten Form entnommen werden konnte. Der rechte Lungenflügel wurde in einem *Cryomold* (Tissue Tek[®]) mit OTC (Tissue Tek[®]) fixiert und sofort bei -80 °C schockgefroren, um für Gefrierschnitte verwendet zu werden. Das Gewebe des linken Lungenflügels, das durch Abschnürung nicht perfundiert und mit OTC kontaminiert worden war, diente zur Isolation von RNA. Es wurde wie Leber und Pankreas in kleinste Stücke zerteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.3.2 Blutserum-Analysen

Nach der retrokulären Blutentnahme wurde das Blut in einem Serumröhrchen mit Trenngel der Firma BD gesammelt und 5 Minuten bei 6.000 rpm zentrifugiert. Hierdurch trennte das in den Röhrchen enthaltene Gel das Serum von den zellulären Blutbestandteilen, und das Serum konnte leicht in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und anschließend bei -20°C für weitere Analysen gelagert werden.

Die Serumparameter Amylase, Lipase, LDH und Calcium wurden im Institut für Klinische Chemie des Klinikums Rechts der Isar in klinisch-chemischen Analyseautomaten von Roche nach vorherrschenden Richtlinien ausgemessen und ausgewertet.

3.3.2.1 α -Amylase

Amylasen sind Enzyme, die Polysaccharide (z.B. Stärke) in kleinere Oligosaccharide spalten. Es gibt verschiedene Isotypen der murinen Amylase, die wie beim Menschen entweder in der Bauchspeicheldrüse oder in den Speicheldrüsen der Mundhöhle gebildet werden. Die α -Amylasen des Pankreas (AMY2A und AMY2B) werden von seinen Azinuszellen produziert und gelangen mit dem Bauchspeicheldrüsensekret, das weitere stärke-, eiweiß- und fettspaltende Enzyme enthält, in das Duodenum. Erst dort werden die meisten Verdauungsenzyme, die in inaktiver Form vorliegen, durch proteolytische Spaltung aktiviert, um eine Selbstverdauung der Bauchspeicheldrüse zu verhindern. Im Normalfall gelangen nur geringe Mengen der Pankreasamylase ins Blut, allerdings findet man bei akuten

Entzündungen aufgrund der vorzeitigen Freisetzung einen Anstieg des Enzyms im Serum um ein Vielfaches. Die Bestimmung der α -Amylase erfolgte mittels eines enzymatischen Farbtests. Bei dieser kinetischen Methode wird eine von der α -Amylase katalysierte Folgereaktion mit Hilfe eines Farbtests nachgewiesen. Da die Farbintensität des Produkts eine direkte Proportionalität zur α -Amylase-Aktivität zeigt, war es möglich durch photometrische Messung der Farbintensität die Aktivität der α -Amylase zu bestimmen.

3.3.2.2 Lipase

Neben der Amylase spielt die Lipase eine entscheidende Rolle in der Pankreas-Diagnostik und zählt zu den wertvollsten klinisch-chemischen Parametern bei Pankreaserkrankungen. Lipasen sind Glykoproteine, die im Pankreas gebildet werden und die Spaltung von Triglyzeriden in Monoglyzeride und Fettsäuren im Duodenum katalysieren. Im Rahmen einer akuten Pankreatitis kommt es durch den Zellschaden zur vorzeitigen Freisetzung diverser Enzyme und die Lipase-Aktivität im Serum steigt rasch innerhalb weniger Stunden auf ein Vielfaches an.

Auch die Aktivität der Lipase wurde mit einem enzymatischen Farbttest bestimmt. Bei diesem Test wurde die Spaltung eines mit Gallensäuren emulgierten spezifischen Lipase-Farbsubstrats detektiert und die Farbintensität photometrisch gemessen. Diese Farbintensität konnte aufgrund ihrer direkten Proportionalität zur Lipase-Aktivität zur Bestimmung der Lipase im Serum verwendet werden.

3.3.2.3 LDH

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, das praktisch in allen Zellen vorkommt und folglich nicht pankreasspezifisch ist. Bei Zelluntergängen jeglichen Gewebes findet man einen Anstieg der LDH im Serum. Analog zur humanen LDH kann man die LDH bei Mäusen in fünf verschiedene Isoenzyme unterteilen anhand derer man nachvollziehen kann, welche Organschädigung die Enzymerhöhung zu verantworten hat. Eine Erhöhung des Isoenzym LDH-1 spricht z.B. für den Untergang von Herzmuskelgewebe, dagegen spricht eine Erhöhung des Isoenzym LDH-5 eher für einen Ursprung im Lebergewebe bzw. der quergestreiften Muskulatur. LDH-2 kommt vor allem in Zellen des Lymphsystems vor, LDH-3 in Zellen der Lunge und LDH-4 in verschiedenen anderen Organen. Diese Unterteilung spielt zwar in der Diagnostik der akuten Pankreatitis kaum eine Rolle, doch auch hier

findet man einen Anstieg der LDH aufgrund des vermehrten Zelluntergangs in der akuten Entzündung.

Mithilfe eines UV-Tests wurde die Aktivität der LDH gemessen. Die LDH katalysiert die Umwandlung von Lactat zu Pyruvat, wobei NAD zu NADH reduziert wird. Bei dieser Methode konnte durch Messung der Extinktionszunahme von NADH bei 340nm auf die LDH-Aktivität rückgeschlossen werden, da diese direkt proportional zur Bildungsgeschwindigkeit von NADH ist.

3.3.2.4 Calcium

Calcium ist essentieller Mineralstoff, der im Knochenstoffwechsel und in der Zellphysiologie eine entscheidende Rolle spielt. Mehr als 1 kg beträgt im Durchschnitt der Calciumbestand eines Erwachsenen. Davon werden 99% im Knochen als Calciumhydroxyapatit gespeichert und nur 1% befindet sich im extrazellulären Raum. Der Calciumstoffwechsel wird von Parathormon, Calcitriol und Calcitonin reguliert, wobei Parathormon bei einem erniedrigten Serum-Calcium-Spiegel zu dessen Anstieg durch Freisetzung von Calcium aus den Knochen führt. Auch Calcitriol wirkt sich positiv auf die Calcium-Bilanz aus, indem es die enterale Resorption von Calcium und auch die Knochenmineralisation fördert. Calcitonin senkt den Serum-Calcium-Spiegel, indem es sowohl die enterale Calciumresorption als auch die Osteoklasten-Tätigkeit hemmt.

Calciumionen sind für die Kontraktionen der Herz- und Skelettmuskulatur und die Funktion des Nervensystems unentbehrlich. Bei einer akuten Pankreatitis kommt es häufig zu einer Hypokalzämie, deren Ursache nicht genau bekannt ist. Es wird diskutiert, dass eine Verseifung von Fettsäuren mit Kalziumbindung eine Rolle spielt. Die Erniedrigung des Calciums im Serum gibt einen Hinweis auf die Schwere der Pankreatitis und geht mit einer ungünstigeren Prognose einher (Ammori et al., 2003). Die Calciumkonzentration wurde mit einem Farbtest gemessen. Hierbei wurde durch Farbkombildung von Calcium und einer zugefügten Testsubstanz auf die Calcium-Konzentration rückgeschlossen.

3.3.3 Histologische Analysen

3.3.3.1 Gewebeschnitte Paraffin

Nach Entnahme der Gewebeproben wurden diese 24 Stunden lang bei Raumtemperatur in Formalin 4% und dann für mindestens weitere 24 Stunden in Ethanol 70% eingelegt. Um sie in Paraffin einzubetten, wurden die Proben in Einbettkassetten über den Entwässerungsautomat Leica ASP200 S in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (Ethanol 70% - 45 min, Ethanol 80% - 45 min, Ethanol 96% - 2 x 60 min, Ethanol 100% - 3 x 60 min, Roticlear - 45 min, Roticlear - 60 min, Roticlear - 75 min, Paraffin - 3 x 60 min). Anschließend wurden die Gewebeproben mit Hilfe des Automaten Leica EG1160 in Paraffin eingebettet.

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde am Mikrotom in 3 µm dicke Schichten geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und bei 37° C über Nacht getrocknet.

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte in Roticlear (Carl Roth, Karlsruhe) (3 x 5 min) deparaffinisiert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert (Ethanol 100% - 3 x 5 min, Ethanol 95% - 3 min, Ethanol 70% - 10 min, Ethanol 50% - 2 min).

Um noch letzte Spuren von Ethanol zu entfernen, wurden die Schnitte 10 Minuten lang in deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 5 Sekunden in eine Hämatoxylinlösung (Merck, Darmstadt) gehalten, danach 10 Minuten mit Leitungswasser gespült und nun 2 Sekunden lang in eine Eosin Y - Lösung (Sigma-Aldrich, Stammheim) gebracht. Darauf wurden die Gewebeschnitte 3 Sekunden in Ethanol 96% und weitere 3 Sekunden in deionisiertes Wasser gehalten und schließlich in aufsteigender Alkoholreihe wieder dehydriert (Ethanol 70% - 3 s, Ethanol 90% - 3 min, Ethanol 100% - 2 x 3 min). Zur Vorbereitung des Eindeckprozesses wurden die Objektträger in Roticlear getaucht (3 x 5 min) und zuletzt mit Vectamount Eindeckmedium eingedeckt. Die fertiggestellten HE-Schnitte wurden über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

3.3.3.2 Gefriergewebeschnitte

Um reproduzierbare Gewebeschnitte zu erhalten und ein Auftauen der Gewebeproben zu verhindern, wurden die auf einem Kryoblock mit Tissue Tek[®] fixierten Proben im Leica CW 3050 S Kryostat in 7 µm dicke Gewebeschnitte geschnitten und auf Superfrost Objektträger (Menzel, Braunschweig) übertragen. Die

Kryoschnitte wurden für einige Stunden luftgetrocknet und entweder direkt für Färbungen verwendet oder bei -80°C gelagert.

Hierfür wurden die Objektträger zunächst eine Minute lang in 4%igem Formalin fixiert und anschließend kurz in deionisiertem Wasser gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden die Schnitte 30 s mit Hämatoxylin (Merck, Darmstadt) gefärbt und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült und kurz in deionisiertem Wasser geschwenkt. Daraufhin erfolgte eine Gegenfärbung mit Eosin (Sigma-Aldrich, Stammheim) für 30 s. Nach kurzem Waschen in deionisiertem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70% - 5 s, Ethanol 96% - 30 s, Ethanol 100% - 3 x 2 min) dehydriert. Zur Verdrängung des Alkohols wurden die Objektträger dann in Roticlear (Carl Roth, Karlsruhe) (3 x 8 min) inkubiert und anschließend mit Vectamount eingedeckt. Die fertiggestellten HE-Schnitte wurden wie die Paraffin-Schnitte bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht getrocknet.

3.3.3.3 Auswertung der histologischen Schnitte

Die histologischen HE gefärbten Schnitte wurden von zwei Personen unabhängig voneinander und in verblindeter Form nach folgenden Kriterien untersucht und nach einem standardisierten *Score* (Binker et al., 2008) eingestuft:

Ödem

0 = kein Ödem

1 = Ödem in 25% des Gewebes = mild

2 = Ödem in 50% des Gewebes = moderat

3 = Ödem in 75% des Gewebes = schwer

4 = Ödem in 100% des Gewebes = sehr schwer

Immunzell-Infiltration

0 = keine Infiltration

1 = Infiltration in 25% des Gewebes zu finden = mild

2 = Infiltration in 50% des Gewebes zu finden = moderat

3 = Infiltration in 75% des Gewebes zu finden = schwer

4 = Infiltration in 100% des Gewebes zu finden = sehr schwer

Hämorrhagie

- 0 = kein Anzeichen einer Hämorrhagie
- 1 = 25% des Gewebes betroffen = mild
- 2 = 50% des Gewebes betroffen = moderat
- 3 = 75% des Gewebes betroffen = schwer
- 4 = 100% des Gewebes betroffen = sehr schwer

Zelluntergang (Nekrose und Apoptose)

- 0 = kein Anzeichen für Zelluntergang
- 1 = 25% des Gewebes betroffen = mild
- 2 = 50% des Gewebes betroffen = moderat
- 3 = 75% des Gewebes betroffen = schwer
- 4 = 100% des Gewebes betroffen = sehr schwer

Alle Einzelwerte der vier Kategorien wurden addiert und aus der Summe ergab sich ein Gesamtwert von max. 16 Punkten.

Schweregrad der Pankreatitis:

- 0 = kein Anzeichen einer Pankreatitis
- 1 – 4 Punkte = milde Pankreatitis
- 5 – 8 Punkte = moderate Pankreatitis
- 9 – 12 Punkte = schwere Pankreatitis
- 13 – 16 Punkte = sehr schwere Pankreatitis

Die Zellzählung der Infiltrate von Leukozyten, Makrophagen oder NK-Zellen erfolgte anhand morphologischer Identifizierung auf HE-Färbungen in 100x Vergrößerung. Hierbei wurden 5 zufällig gewählte Areale, sog. „*regions of interest*“ (ROI) fotografiert, und die sich dort befindenden Zellen gezählt (Zellen/ROI). Anschließend wurde der Mittelwert der 5 Zählungen errechnet.

3.3.4 Quantitative RT-Polymerasenkettenreaktion

3.3.4.1 Funktionsprinzipien PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein enzymatisches Verfahren, bei dem selektiv ein definiertes DNA-Fragment aus einem DNA-Gemisch in vitro amplifiziert und somit nachgewiesen werden kann. Bei dem verwendeten Enzym handelt es sich um eine thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, die Taq-Polymerase. Zur Synthese der neuen DNA-Moleküle benötigt man ferner alle vier in der DNA enthaltenen Basen in Form von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten und zwei einzelsträngige Oligonukleotidprimer (ein Forward und ein Reverse Primer). Die zwei Primer flankieren das zu amplifizierende Fragment: dieses kann nun von einer extrem geringen DNA-Menge in einen nachweisbaren Maßstab repliziert werden. Die Amplifikation erfolgt dabei durch die zyklische Abfolge der drei Schritte Denaturierung, Hybridisierung (*Annealing*) und Elongation, die in einem programmierbaren Thermocycler ablaufen. Die Denaturierung erfolgt bei 95 °C und bewirkt die Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge. In einem zweiten Schritt, dem *Annealing*, wird die Temperatur herabgesenkt: dadurch können die Primer an den jeweiligen komplementären Einzelsträngen hybridisieren. Die Temperatur hierfür wird entsprechend des Schmelzpunktes der jeweiligen Primer gewählt. Der Elongationsschritt findet bei 72°C statt; hier beginnt die eigentliche DNA-Synthese, indem die thermostabile Taq-Polymerase den neuen Strang komplementär zur Matrize in 5' → 3'-Richtung synthetisiert.

Aus einem DNA-Doppelstrang werden so zwei neue DNA-Stränge synthetisiert. Durch die zyklische Wiederholung der drei Schritte (30-35x) kommt es somit zu einer exponentiellen Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnittes. Die Dauer der einzelnen Schritte variiert entsprechend der Größe des PCR-Produktes.

Zum Nachweis der amplifizierten DNA kann das PCR-Produkt anschließend mittels der Agarosegelelektrophorese analysiert werden. Hierbei werden DNA-Moleküle in einem konstanten elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt.

DNA-Moleküle sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und bewegen sich daher im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Durch die angelegte Spannung wandern die Moleküle durch die Matrix des Agarosegels. Kürzere Fragmente gelangen schneller durch das Netz des Gels als längere, deshalb trennt

sich die DNA in Banden auf, die aus Fragmenten ähnlicher Länge bestehen. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid in das Agarose-Gel können die Banden sichtbar gemacht werden und anhand ihrer Länge zugeordnet werden. Die PCR ist eine Methode zum Nachweis kleinster DNA-Spuren; sie gibt jedoch *per se* noch keinen Aufschluss über die genaue Menge des Ursprungsmaterials.

3.3.4.2 Funktionsprinzipien quantitative PCR

Früher wurde zur semiquantitativen Bestimmung von cDNA eine konventionelle Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden der einzelnen PCR-Produkte mit dem des Referenzgens verglichen. So konnte anhand der Stärke der einzelnen Banden auf die Ursprungsmenge der cDNA geschlossen werden. Diese Methode der semiquantitativen PCR kommt heutzutage aufgrund ihrer Ungenauigkeit kaum mehr zum Tragen.

Die häufigste Methode, mittels derer cDNA quantitativ nachgewiesen wird, ist die quantitative „real-time Reverse Transkriptase PCR“ (qRT-PCR). Durch eine qRT-PCR lässt sich auf die Menge an mRNA, und somit auf die Transkriptionsrate im Ausgangsmaterial schließen. Hierfür kann man entweder sequenzspezifische Sondenmoleküle, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, oder DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. SYBR Green I, verwenden. Eine qRT-PCR erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden, die in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA binden. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge des Ausgangsmaterials und kann mittels einer Software in Echtzeit (*real-time*) dargestellt werden.

Der große Vorteil des SYBR Green I Systems besteht darin, dass es sich um eine kostengünstige Methode handelt, da sie auf eine teure Synthese und Markierung sequenzspezifischer Sonden verzichtet. SYBR Green I lagert sich mit hoher Spezifität in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein; allerdings interkaliert es mit allen doppelsträngigen DNA-Molekülen, also auch an Primer-Dimeren und nicht spezifischen PCR-Produkten, so dass diese zum Fluoreszenzsignal beitragen und zu Fehlern in der Quantifizierung führen. Man kann die Spezifität der Reaktion durch

Schmelzkurvenanalysen testen und durch den Einsatz optimierter Reaktionsbedingungen erhöhen.

Bei der Variante der qRT-PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden binden in der Hybridisierungsphase die sequenzspezifischen Primer an die Enden der Zielsequenz und eine fluoreszenzmarkierte Sonde innerhalb des zu amplifizierten Fragmentes. Somit ist das Fluoreszenzsignal sehr spezifisch für die Reaktion. Es gibt äußerst verschiedene Sondentypen, die sich alle in ihrem Aufbau und ihrer Effizienz zur Quantifizierung unterscheiden.

In dieser Arbeit wurden sequenzspezifische Hybridisierungssonden der *Universal-Probe-Library* (Roche) verwendet. Bei dieser Methode enthält eine Einzel-Probe jeweils zwei Markierungen: einen Fluoreszenz *Reporter* und einen *Quencher*, die räumlich nahe beieinander liegen und sich zwischen die beiden Primer-Bindestellen an die zu amplifizierende DNA heften. Ist die Probe intakt, liegt der *Quencher*-Farbstoff nah genug am Reporter um dessen Fluoreszenzsignal zu unterdrücken. Durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird die Probe abgespalten. Somit ist der Reporter nicht länger „gequencht“ und emittiert ein Fluoreszenzsignal. Diese Fluoreszenzsignalzunahme kann nun als Quantifizierung der Ausgangs-DNA eingesetzt werden. Prinzipieller Vorteil dieser Methode soll die Spezifität von Sequenz-spezifischen Sonden in Verbindung mit einer zu interkalierenden Chromogenen vergleichbaren Flexibilität sein.

Zur genauen Quantifizierung der Ziel-DNA wurden im Vorversuch Referenz-Gene (auch „Housekeeping Gene“ genannt) getestet, also Gene, die konstitutiv in Pankreas, Leber und Lunge exprimiert werden, und somit als Referenz eingesetzt werden können.

3.3.4.3 Isolation von mRNA

Zur Isolierung von RNA wurden in flüssigen Stickstoff schockgefrorene Gewebeproben, die bei -80°C gelagert waren, verwendet. Pro Probe wurden 50-100 mg Gewebe verwendet und mit Tri-Reagenz (1 ml/100 mg Gewebe) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch im *TissueLyser* (Qiagen/Retsch, Hilden) homogenisiert. Nach einem Inkubationsschritt (5 min bei RT) wurden 100 µl BCP/ml Tri-Reagenz zum Ansatz pipettiert und gut gemischt. Nach einem erneuten Inkubationsschritt (5 min bei RT) wurden die Phasen mittels Zentrifugierung (12.000 rpm, 15 min bei 4°C) getrennt. 350 µl der klaren oberen Phase, welche die RNA

enthält, wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die organische untere Phase wurde verworfen. Der RNA-Phase wurden weitere 350 µl Ethanol 70% zugefügt, gemischt und auf die Membran einer *RNeasy spin column* (RNeasy Mini Kit, Qiagen) gegeben. Dieses wurde 15 Sekunden lang bei 10.000 rpm bei RT (wie auch alle weiteren Zentrifugierungsschritte) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die RNA-haltige Membran zu waschen, wurden 700 µl des *RW1 Puffers* (RNeasy Mini Kit, Qiagen) auf das Säulchen geladen und der Durchfluss, nach 15 sekündigen Zentrifugieren bei 10.000 rpm, verworfen. Nun wurde das Säulchen mit 500 µl *RPE Puffer* (RNeasy Mini Kit, Qiagen), der zuvor mit Ethanol 96% komplettiert wurde, versehen, 15 Sekunden lang mit 10.000 rpm bei RT zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und das Säulchen wurde 2 Minuten lang bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die *RNeasy spin column* in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß platziert und bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm) eine Minute zentrifugiert, um den Waschpuffer einschließlich des darin enthaltenen Ethanols möglichst vollständig zu entfernen und die Filtermembran zu trocknen. Darauf hin wurde das *RNeasy spin* Säulchen in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gesteckt und die RNA mit 40 µl sterilem RNase-freien destillierten Wasser bei einer einminütigen Zentrifugierung bei 10.000 rpm eluiert.

Die Konzentration und der Reinheitsgrad wurden am NanoDrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) bestimmt. War der Reinheitsgrad (Sollwert 260/280 > 2,0) oder die Konzentration der RNA (Sollwert > 200 ng/µl) unzureichend, wurde erneut RNA aus Gewebe isoliert.

Die RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3.4.4 Qualitätssicherung der RNA

Denaturierende RNA-Gele wurden genutzt, um den Zustand der RNA nach der Extraktion beurteilen zu können. Dazu wurden 85 ml DEPC Wasser mit 1,5 g Agarose aufgekocht und nach kurzem Abkühlen wurde 10 ml MOPS-Puffer (10x) und 5 ml Formaldehyd (38%) hinzugegeben. Um eine Kontamination mit RNasen auszuschließen, wurden sowohl Kämme als auch Kammern zuvor mit 3% H₂O₂ gewaschen. Zur Kontrolle der Proben wurden 10 µl RNA (5 µg) mit 10 µl RNA-Auftragspuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1:20) gemischt und bei 50V 120 min lang

aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht photographiert und dokumentiert. Nur RNA-Proben mit eindeutigen 18s und 28s rRNA Banden wurden zur weiteren Analyse verwendet.

3.3.4.5 Synthese der cDNA (Reverse Transkription)

Bei der Synthese von cDNA (von engl. *complementary DNA*) wird mRNA (von engl. *messenger RNA*), die als Matrize fungiert, durch das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Zur reversen Transkription werden generell virale Reverse Transkriptasen genutzt wie die des Aviären Myeloblastose-Virus (AMV) und des Murinen Leukämie Virus (MLV).

Alle von uns verwendeten Reagenzien stammten aus dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen), bei welchem die Reverse Transkriptase aus rekombinanten heterodimeren Enzymen, die von *E. coli* exprimiert werden, gewonnen wird. Diese Reverse Transkriptase besitzt eine DNA-Polymerase-Aktivität, für die sie Primer zur Bindung an die RNA und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine für den DNA-Strang benötigt; des weiteren hat sie eine RNase-H-Aktivität, mittels derer sie nur die bereits transkribierte RNA abbauen kann, aber keinen Einfluss auf pure RNA besitzt. Alle Anweisungen des Herstellers Qiagen wurden streng eingehalten.

Um genomische DNA effektiv zu eliminieren wurden die RNA-Proben (jeweils 1 µg RNA in 12 µl RNase freiem Wasser lysiert) mit 2 µl *gDNA wipeout buffer 7x* (Qiagen) 2 Minuten lang bei 42°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis platziert. Anschließend wurden diese RNA-Ansätze mit jeweils 1 µl *Quantiscript Reverse Transcriptase* (Qiagen), 4 µl *Quantiscript RT Buffer 5x* (Qiagen) und 1 µl *RT Primer Mix* (Qiagen) komplementiert und bei 42°C 15 Minuten lang inkubiert. Zum Beenden der Reaktion und zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Reaktionsgefäße bei 95°C 3 Minuten im Heizblock erhitzt. Zuletzt wurde die hierbei entstandene cDNA mit RNase und DNase freiem Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.3.4.6 Etablierung von Referenzgenen

Zur Messung der Expression von Zielgenen wurden nach Literaturrecherche vier Gene ausgewählt, die dann in Leber-, Lungen- und Pankreasgewebe mittels qRT-PCR auf ihre konstitutive Expression getestet wurden. Hierbei zeigte sich, dass PPIB

(*peptidylprolyl isomerase B*; Cyclophilin B) und RPL13A (*ribosomal protein L13A*) geeignet waren. Sie dienten bei den qRT-PCR-Versuchen als Referenzgene.

Der Grad der akuten Pankreatitis wurde dadurch bestimmt, dass die Replikate verschiedener Gene mittels qRT-PCR gemessen wurden, die die Entzündungsantwort entscheidend mitbeeinflussen: Interleukin (IL6), Tumornekrosefaktor alpha ($TNF\alpha$), das bakteriolytische Lysozym M (LysM) und die Chemokine C-C-Motiv Ligand 2 (CCL2, oder auch als MCP1 bekannt), C-X-C-Motiv Ligand 9 (CXCL9, oder auch bekannt als MIG), C-X-C-Motiv Ligand 10 (CXCL10, auch bekannt als IP10) und C-X-C-Motiv Ligand 11 (CXCL11, auch bekannt als IP9 bzw. ITAC). Ferner sollte anhand der Immunzellinfiltration der Schweregrad der akuten Pankreatitis genauer analysiert werden. Hierzu sollte mithilfe der qRT-PCR die Expression der Gene CD3 (Teil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes), CD11b (auch bekannt als ITGAM oder MAC1 alpha, exprimiert auf Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und natürlichen Killer-Zellen), CD19 (exprimiert auf B-Lymphozyten) und Gr1 (auch Ly-6G genannt; auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Plasmazellen, dendritischen Zellen und T-Zellen exprimiert) bestimmt werden.

Um den Zelluntergang und den Zellschaden näher zu charakterisieren und um zwischen programmierten (Apoptose) und akzidentellem Zelltod (Nekrose) in der akuten Pankreatitis unterscheiden zu können, wurde die Expression verschiedener Gene untersucht, die beim programmierten Zelltod (Apoptose) eine Rolle spielen. Es wurden sowohl solche Gene untersucht, die die Apoptose induzieren bzw. fördern, z.B. BIM, FasL, Noxa, Puma und Trail, als auch derartige, die anti-apoptotisch wirken, wie BCL2, BCL2L1, BCL2L2, Birc2, Birc3, Birc4, Flip1 und Flip2.

3.3.4.7 „Universal Probes“ qRT-PCR

Für die qRT-PCR-Versuche verwendeten wir den LightCycler® 480, den *LightCycler® 480 Probes Master Mix* und die *Universal Probe Library Mouse* (alle Roche Applied Science, Mannheim). Alle Schritte erfolgten lichtgeschützt auf Eis, um die fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden zu schonen. Pro Reaktion wurden folgende Komponenten in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengemischt: 4,4 µl DNA-freies PCR-Wasser, 0,2 µl *Universal Probe Library Probe*, 0,2 µl Primer (links), 0,2 µl Primer (rechts) und 10 µl *LightCycler® 480 Probes Master*. Nach sorgfältigem

Mischen durch Auf- und Ab-Pipettieren füllten wir in jedes Loch einer 96-Lochplatte 15 µl dieses Reaktionsgemisches und fügten 5 µl cDNA (1:5) hinzu.

Die 96-Lochplatte wurde mit der dazugehörigen Folie versiegelt und 2 min lang bei 1.500 x g zentrifugiert.

Im Folgenden sind die verwendeten Zyklusschritte des LightCycler® 480 Geräts aufgelistet:

Tabelle 8: Zyklus für qRT-PCR

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Prä-Inkubation	95°C	5 min	1
Amplifikation	95°C	10 s	45
	60°C	30 s	
	72°C	1 s	
Kühlung	40°C	30 s	1

Um die korrekte Versuchsdurchführung zu überprüfen, wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde statt cDNA die gleiche Menge DNase-freies Wasser zum Reaktionsgemisch hinzugefügt. Als Positivkontrolle fungierte cDNA aus der Milz einer mit Lipopolysacchariden (LPS) stimulierten Maus. Dieser wurde 300 ng LPS intraperitoneal injiziert. Drei Stunden nach der Applikation wurde die Maus mit Isofluran betäubt, durch Subluxation der Halswirbelsäule getötet und die Milz entnommen. Aus dem entnommenen Organ wurde nach obigen Protokollen mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben.

LPS sind Bestandteile der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien und wirken als Antigene. LPS werden von Monozyten, deren wichtigster Speicherort die Milz ist, erkannt und führen über den NFκB-Signalweg zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNFα und IL-1.

Die Auswertung der qRT-PCR-Versuche erfolgte mit dem Systemprogramm des LightCycler® 480. Gemessen wurde hierbei die relative Quantifizierung, wobei die Normalisierung durch den Mittelwert der beiden Referenzgene RPL13A und PPIB erfolgte.

3.3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad PRISM® (Version 5.00) mithilfe des Student-t-Tests. Als signifikant gilt ein Unterschied zwischen Messdaten bei einem Wert von $p < 0,05$, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entspricht.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Rolle bestimmter Gene des Toll-like-Rezeptor-Signalwegs in der akuten Pankreatitis mithilfe des Caerulein-Modells der akuten murinen Bauchspeicheldrüsenentzündung näher charakterisiert werden. Untersucht wurden die globalen Knock-out Mausmodelle $TLR3^{-/-}$, $Trif^{flps2/lps2}$, $MyD88^{-/-}$, $MyD88^{-/-}/Trif^{flps2/lps2}$, $IFNaR^{-/-}$ und $STAT1^{-/-}$ mit C57BL/6N-Mäusen als Wildtyp-Kontrollen. Alle Ergebnissen sind wie folgt angegeben: Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD). Die jeweiligen Werte beziehen sich auf die Caerulein behandelten Wildtypkontrollen.

4.1. Blutserum-Analysen

Zunächst wurden die Serumparameter Amylase, Lipase, Lactatdehydrogenase (LDH) und Calcium aller Mäuse im Institut für Klinische Chemie des Klinikums Rechts der Isar gemessen und ausgewertet. Amylase und Lipase sind trotz geringer Spezifität wichtige Parameter in der Diagnostik der akuten Pankreatitis (Frossard et al., 2008), allerdings korrelieren sie wenig mit dem Schweregrad der akuten Entzündung. Bei der akuten Pankreatitis steigen die Werte von Amylase und Lipase im Serum bereits innerhalb weniger Stunden um ein Vielfaches an. Nach 3-5 Tagen findet man häufig wieder normale Amylase-Werte, wobei die Lipase-Werte noch länger (8-10 Tage) erhöht bleiben (Matull et al., 2006).

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Caerulein-behandelten Gen-defizienten Mausstämme ($TLR3^{-/-}$, $Trif^{flps2/lps2}$, $MyD88^{-/-}/Trif^{flps2/lps2}$, $MyD88^{-/-}$, $IFNaR^{-/-}$ und $STAT1^{-/-}$) höhere Serumspiegel von Amylase und Lipase aufwiesen als die jeweiligen Caerulein-behandelten Wildtyp-Kontrolltiere (C57BL/6N).

Der Mittelwert des Amylase-Serumspiegels von C57BL/6N-Negativkontrollen betrug 2.361 U/l (\pm 184,8 U/l SD); nach Auslösung einer akuten Pankreatitis beim Wildtyp erzielte man signifikant erhöhte Amylase-Serumspiegel von 24.750 U/l (\pm 7.337 U/l SD, $p=0,0122^*$). Eine noch stärkere Freisetzung von Amylase aus Pankreasgewebe konnte bei oben genannten Gen-defizienten Mausstämmen beobachtet werden, denen Caerulein injiziert wurde. Die Mittelwerte betrugen bei $TLR3^{-/-}$ 36.773 U/l (\pm 5.156 U/l SD), bei $Trif^{flps2/lps2}$ 39.731 U/l (\pm 5.484 U/l SD), bei $MyD88^{-/-}/Trif^{flps2/lps2}$ 44.770 U/l (\pm 3.677 U/l SD, $p=0,0268^*$), bei $MyD88^{-/-}$ 45.877 U/l (\pm 6.891 U/l SD), bei $IFNaR^{-/-}$ 39.987 U/l (\pm 3.977 U/l SD) und bei $STAT1^{-/-}$ 60.977 (\pm 6.970 U/l SD, $p=0,005^{**}$). Diese Erhöhung im Vergleich zum Wildtypen war bei $MyD88^{-/-}/Trif^{flps2/lps2}$

und STAT1^{-/-} signifikant ($p < 0,05$). Unbehandelte Gen-defiziente Tiere zeigten keine erhöhten Amylase-Serumspiegel (siehe Abb. 4 (A)).

Der Mittelwert des Lipase-Serumspiegels bei unbehandelten Wildtypkontrollen lag bei 75,30 U/l ($\pm 9,687$ U/l SD), der von stimulierten Wildtyp-Mäusen lag dazu im Vergleich signifikant erhöht bei 896,2 U/l ($\pm 306,1$ U/l SD, $p=0,0231^*$). Es ergaben sich im Mittel folgende Lipase-Spiegel: TLR3^{-/-} 1.461 U/l ($\pm 283,6$ U/l SD), Trif^{flps2/lps2} 1.707 U/l ($\pm 286,6$ U/l SD), MyD88^{-/-}/Trif^{flps2/lps2} 1.684 U/l ($\pm 176,1$ U/l SD, $p=0,0408^*$), MyD88^{-/-} 1.471 U/l ($\pm 347,7$ U/l SD), IFN α R^{-/-} 1.961 U/l ($\pm 197,3$ U/l SD, $p=0,0152$) und von STAT1^{-/-} 2.960 U/l ($\pm 489,8$ U/l SD, $0,0051^{**}$). Signifikant war dieser Unterschied im Vergleich zum Wildtyp bei MyD88^{-/-}/Trif^{flps2/lps2}, IFN α R^{-/-} und STAT1^{-/-} ($p < 0,05$). Unbehandelte Gen-defiziente Tiere wiesen keine erhöhten Lipase-Serumspiegel auf. (siehe Abb. 4 (B))

Somit konnte gezeigt werden, dass die Gen-defizienten Mäuse stärkere Zeichen einer akuten Pankreatitis aufwiesen, als ihre Wildtypkontrollen, gemessen an den Serumparametern Amylase und Lipase.

Weder bei der LDH-Messung von Wildtyp-Negativkontrollen im Vergleich zu Wildtyp-Positivkontrollen noch bei der LDH-Messung im Blutserum der Gen-defizienten Mäusen konnten signifikante Unterschiede erfasst werden.

Calcium, welches bei einer akuten Pankreatitis häufig erniedrigt und mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert ist (Ammori et al., 2003), zeigte sich sowohl bei den Caerulein-behandelten Trif^{flps2/lps2}-Tieren mit 2,050 mmol/l ($\pm 0,03890$ mmol/l SD, $p=0,0211^*$) als auch bei den STAT1^{-/-}-Mäusen mit 2,013 mmol/l ($\pm 0,04835$ mmol/l SD, $p=0,0130^*$) im Vergleich zu den mit Caerulein behandelten Wildtypkontrollen, die Calcium-Werte von 2,203 mmol/l ($\pm 0,04047$ mmol/l SD) aufwiesen, signifikant vermindert (siehe Abb. 4 (C)).

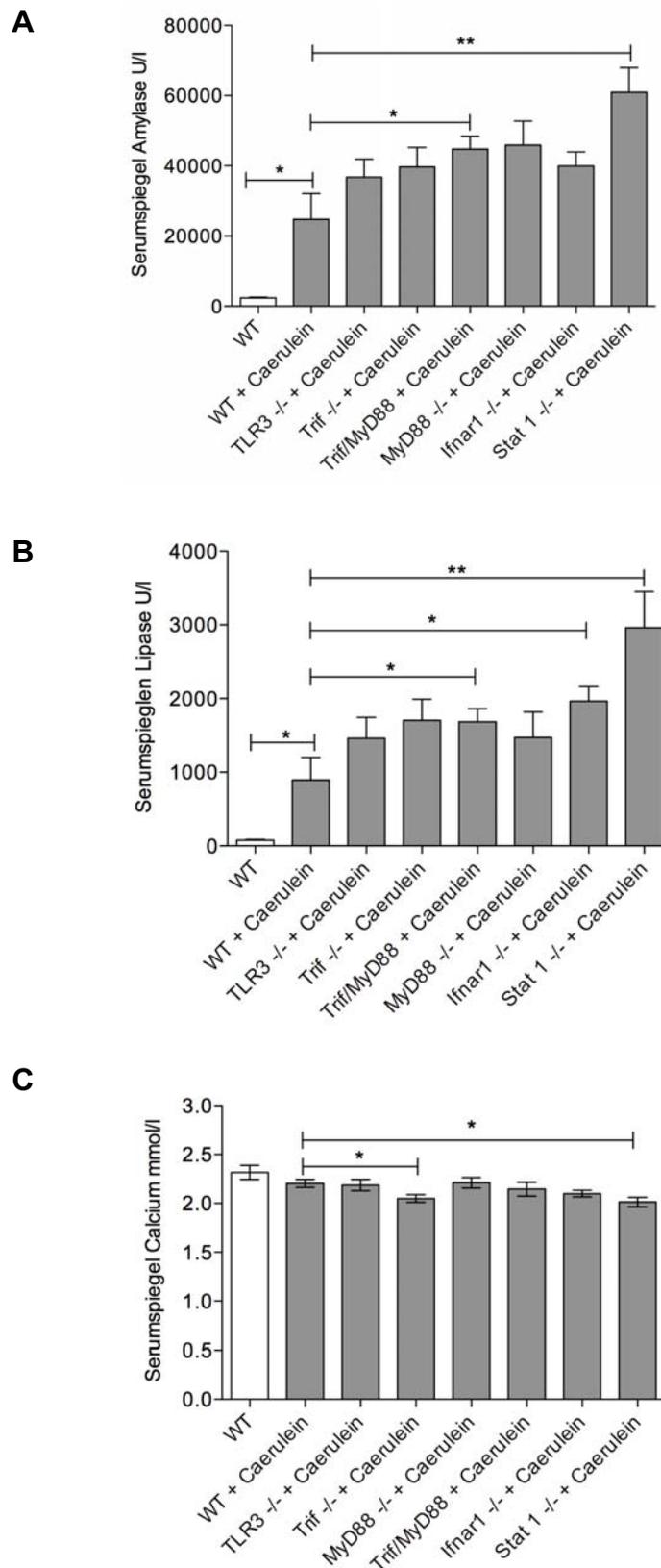


Abb. 4 (A)-(C) Serumspiegel von Amylase (A) und Lipase (B) und Calcium (C). Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken stellen Standardfehler der Mittelwerte dar.

* zeigt einen statistisch signifikanten, ** einen statistisch hoch signifikanten Unterschied im Vergleich zu WT + Caerulein an.

4.2. Histologische Analysen

Alle histologischen Schnitte wurden in verblindeter Form untersucht und konnten anhand einer standardisierten Skala (siehe 3.3.3.3) in den Kategorien Ödem, Immunzellinfiltration, Hämorrhagie und Zelluntergang in verschiedene Schweregrade eingeteilt werden.

Die mit Caerulein behandelten Wildtyp-Mäuse erreichten im Mittel eine Gesamtsumme von 3,677 Punkten ($\pm 0,3333$ Punkte SD), was einer milden akuten Pankreatitis entspricht. Alle Gen-defizienten Mausstämme erreichten signifikant höhere histologische Gesamtpunktwerte. TLR3^{-/-}-Tiere erhielten im Mittel eine Gesamtsumme von 5,875 Punkten ($\pm 0,4407$ Punkte SD), was eine Einstufung als moderate akute Pankreatitis bedeutet. Trif^{dlps2/lps2}-Mäuse erreichten 4,833 Punkte ($\pm 0,4014$ Punkte SD), was zwar noch mit der Einteilung in die Gruppe der milden akuten Pankreatitis einhergeht, allerdings war die Gesamtsumme des histologischen Schweregrades signifikant höher als die der Wildtypkontrollen ($p = 0,0493^*$). Höhere Schweregrade erzielten MyD88^{-/-}/Trif^{dlps2/lps2}- und MyD88^{-/-}-Tiere mit einem Mittel von 6,0 Punkten ($\pm 0,4364$ Punkte SD) bei MyD88^{-/-}/Trif^{dlps2/lps2} und 5,833 Punkten ($\pm 0,1667$ Punkte SD) bei den MyD88^{-/-}-Tieren. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der Einstufung in die Gruppe der moderaten akuten Pankreatitis wider. Die höchsten histologischen Gesamtpunktzahlen erhielten IFN α R^{-/-}- und STAT1^{-/-}-Mäuse ($p < 0,0001^{***}$). IFN α R^{-/-} wies einen Mittelwert von 7,833 Punkten ($\pm 0,4773$ Punkte SD) und STAT1^{-/-} einen Wert von 9,0 Punkten ($\pm 0,3651$ Punkte SD) auf, was eine Einstufung in die Kategorie schwere akute Pankreatitis bedeutet. Somit wiesen alle Gen-defizienten Mausstämme in der histologischen Analyse einen stärkeren Phänotyp der akuten Pankreatitis auf, verglichen mit der Pankreatitis in Wildtyp-Tieren. Ein besonders schwerwiegendes Bild der akuten Pankreatitis zeigte sich bei den IFN α R^{-/-}- und STAT1^{-/-}-Tieren. Verglichen mit den anderen KO-Linien zeigten beide Gruppen in den histologischen Bildern ausgeprägte hämorrhagische Areale und Regionen mit massivem Zelluntergang, was bei den anderen KO-Tieren nicht beobachtet werden konnte (siehe Abb. 5 (F) und 5 (G)). Auch verstärkte Ödembildung und erhöhtes Leukozyten-Infiltrat im Vergleich zu den anderen KO-Stämmen erhöhten den Schweregrad der histologischen Skala bei den IFN α R^{-/-}- und STAT1^{-/-}-Tieren.

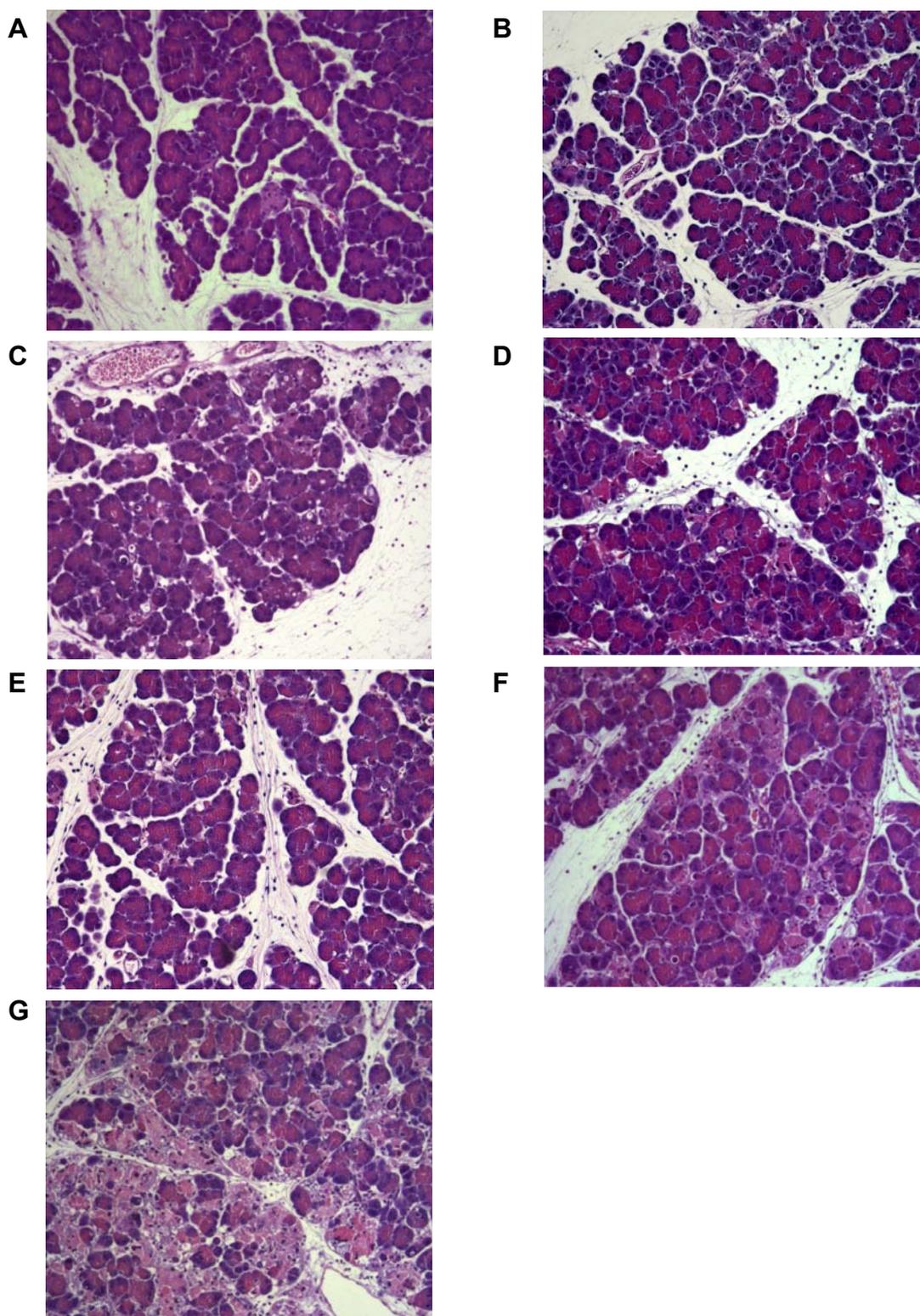


Abb. 5 (A)-(G) HE-Färbungen von C57BL/6N-Kontrollen (A), TLR3^{-/-} (B), Trif^{Δps2/ps2} (C), MyD88^{-/-} (D), MyD88^{-/-}/Trif^{Δps2/ps2} (E), IFNαR^{-/-} (F) und STAT1^{-/-} (G) in 100x Vergrößerung

Tabelle 9: Einteilung des Schweregrads anhand der Histologie

Mausstamm	Gesamtpunktzahl	Schweregrad
C57BL/6N	3,677 (\pm 0,3333 SD)	Milde akute Pankreatitis
TLR3 ^{-/-}	5,875 (\pm 0,4407 SD)	Moderate akute Pankreatitis
Trif ^{lps2/lps2}	4,833 (\pm 0,4014 SD)	Milde akute Pankreatitis
MyD88 ^{-/-}	5,833 (\pm 0,1667 SD)	Moderate akute Pankreatitis
MyD88 ^{-/-} /Trif ^{lps2/lps2}	6,0 (\pm 0,4364 SD)	Moderate akute Pankreatitis
IFNaR ^{-/-}	7,833 (\pm 0,4773 SD)	Schwere akute Pankreatitis
STAT1 ^{-/-}	9,0 (\pm 0,3651SD)	Schwerer akute Pankreatitis

Bei der Zählung der Immunzellen pro „regions of interest“ (ROI) in den HE-Färbungen zeigten die mit Caerulein-behandelten KO-Tiere eine höhere Immunzellinfiltration als ihre mit Caerulein-behandelten Wildtyp-Kontrollen. Besonders konnte dies bei den IFNaR^{-/-}- und STAT1^{-/-}-Tieren beobachtet werden, allerdings waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant.

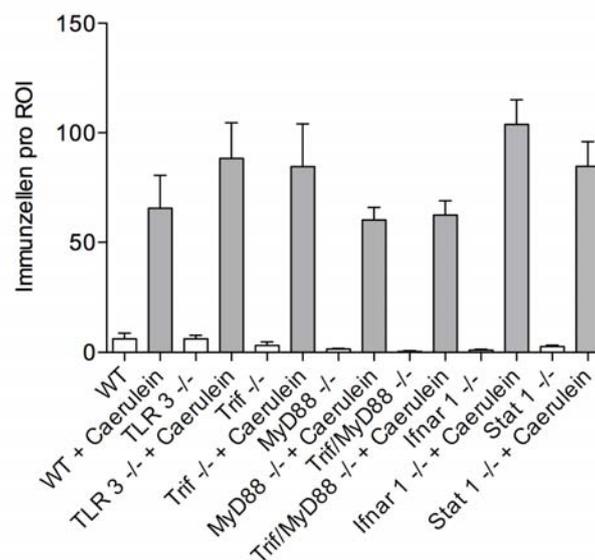


Abb. 6 Immunzellen pro region of interest (ROI). Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken stellen Standardfehler der Mittelwerte dar. Alle Zählungen waren nicht statistisch signifikant.

4.3. Quantitative RT-Polymerasekettenreaktion

Nach Literaturrecherche wurden für die spätere Quantifizierung relevanter Transkripte vier passende Referenzgene ausgewählt, welche in Leber-, Lungen- und

Pankreasgewebe sowohl von Pankreatitis-Mäusen (C57BL6/N, Caerulein), als auch von Negativ-Kontrollen (C57BL6/N, NaCl) mittels quantitativer „real-time Reverse Transkriptase PCR“ (qRT-PCR) auf ihre konstitutive Expression getestet wurden: Beta Actin, Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), *peptidylprolyl isomerase B* (PPIB) und Ribosomales Protein L13A (RPL13A).

Dabei zeigte sich, dass Beta Actin, ein verbreitetes und häufig verwendetes Referenzgen, in Pankreasgewebe von Caerulein-behandelten C57/BL6N-Mäusen statistisch hoch signifikant stärker ausgeprägt wurde ($p = 0,0031$) als in Pankreasgewebe von C57/BL6N-Mäusen, die nur Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert bekamen. Somit ist Beta Actin als Referenztranskript in der akuten Pankreatitis ungeeignet. Daneben zeigte HPRT1 zu hohe Cp-Werte („*crossing point*“ Werte), wobei der Cp-Wert im Mittel um 30 lag, was für eine zu geringe konstitutive Expression und gegen eine Verwendung als Referenzgen sprach.

PPIB und RPL13A wiesen niedrigere Cp-Werte auf (beide im Mittel um 24). Des Weiteren zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Pankreatitis-Mäusen und den Negativkontrollen, so dass beide als Referenzgene eingesetzt wurden (siehe Abb. 7 (A)).

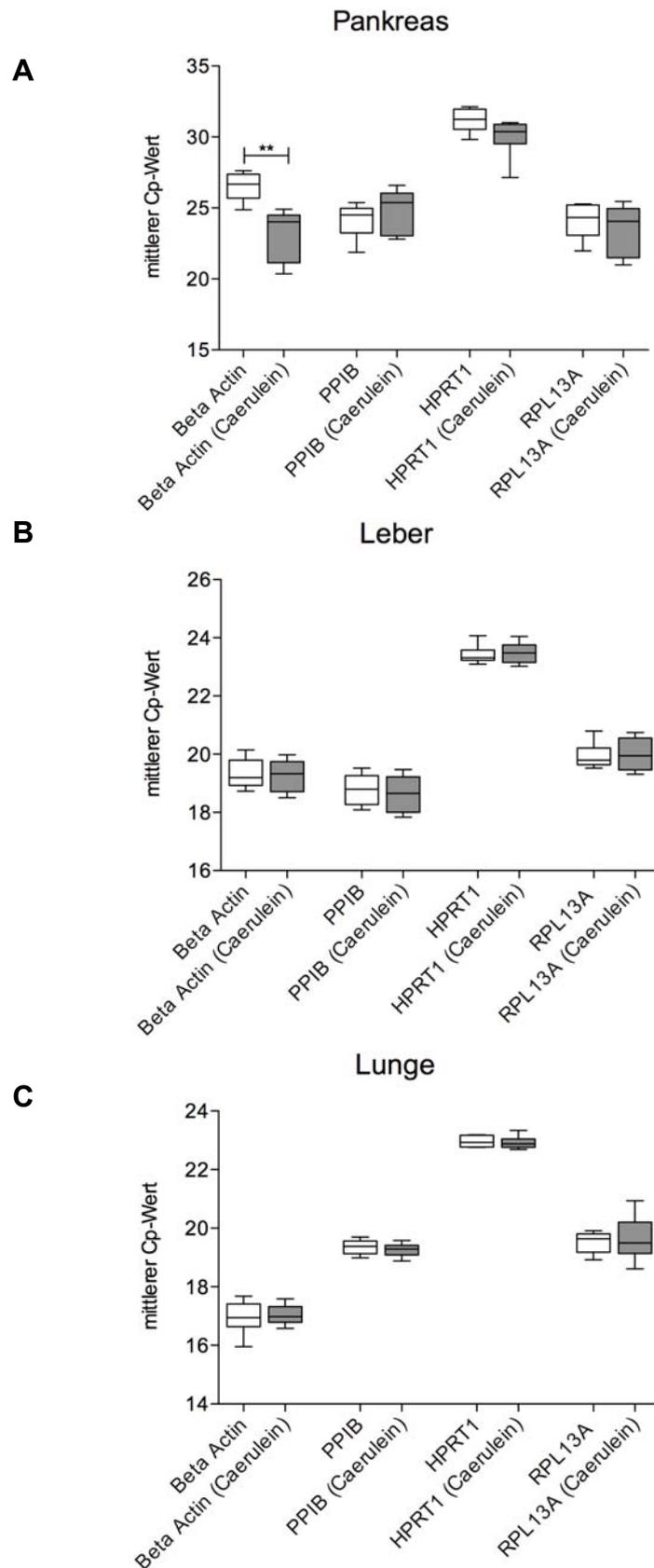


Abb. 7 (A)-(C) Cp-Werte der Gene Beta Actin, PPIB, HPRT1 und RPL13A in Pankreas- (A), Leber- (B) und Lungengewebe (C). Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken stellen Standardfehler der Mittelwerte dar. ** zeigt einen statistisch hoch signifikanten Unterschied an.

Für die weitere Charakterisierung der akuten Pankreatitis bei den untersuchten Gen-defizienten Tieren und ihren Wildtyp-Kontrollen wurden die proinflammatorische Zytokine IL6 und $\text{TNF}\alpha$, das bakteriolytische Enzym Lysozym M (LysM) und die Chemokine CCL2, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR gemessen und ausgewertet.

Hierbei zeigte sich, dass die einzelnen mit Caerulein behandelten Gen-defizienten Mausstämme unterschiedlich starke Ausprägungen der untersuchten proinflammatorischen Zytokine und Chemokine verglichen mit den behandelten Wildtyp-Kontrollen aufwiesen.

$\text{TLR3}^{-/-}$ -Tiere zeigten im Mittel eine 3,164fach ($\pm 1,325$ SD) höhere IL6-Expression, eine 0,7741fache Expression ($\pm 0,2973$ SD) von $\text{TNF}\alpha$ und eine 1,823fache Expression von Lysozym M (LysM) ($\pm 0,8923$ SD). Bei diesen Tieren war CCL2 3,060fach ($\pm 1,167$ SD) und CXCL9 (MIG) 1,054fach ($\pm 0,5671$ SD) höher ausgeprägt im Vergleich zum Wildtyp. Ferner wiesen sie eine 2,292fach höhere Expression von CXCL10 ($\pm 1,226$ SD) und eine 0,02160fache Expression von CXCL11 ($\pm 0,01302$ SD, $p=0,0002^{***}$) auf. Die Herunterregulierung von CXCL11 war statistisch hoch signifikant (siehe Abb. 8 (G)).

Bei den $\text{Trif}^{\text{dps2/lps2}}$ -Tiere konnte man eine statistisch signifikante Hochregulierung von IL6 ($2,437 \pm 0,3530$ SD; $p = 0,0073^{**}$) (siehe Abb. 8 (A)) und eine verminderte Ausprägung von $\text{TNF}\alpha$ ($0,6580 \pm 0,06798$ SD) beobachten. LysM erreichte eine 0,9926fache Expression ($\pm 0,2403$ SD). CCL2 zeigte eine signifikante Hochregulierung mit einer 2,380fachen Expression ($\pm 0,3697$ SD, $p=0,0159^*$) im Vergleich zum Wildtyp. CXCL9 war 0,5129fach ($\pm 0,1848$ SD) und CXCL10 0,5189fach ($\pm 0,1619$ SD) weniger ausgeprägt. Auch bei den $\text{Trif}^{\text{dps2/lps2}}$ -Tieren war CXCL11 hoch signifikant herunterreguliert ($0,01766$ fache Expression $\pm 0,0005388$ SD, $p=0,0004^{***}$) (siehe Abb. 8 (G)).

$\text{MyD88}^{-/-}/\text{Trif}^{\text{dps2/lps2}}$ -Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren eine 2,1fach höhere IL6-Ausprägung ($\pm 0,7648$ SD) und eine niedrigere $\text{TNF}\alpha$ - ($0,4154 \pm 0,08521$ SD) und LysM-Ausprägung ($0,8745 \pm 0,3229$ SD).

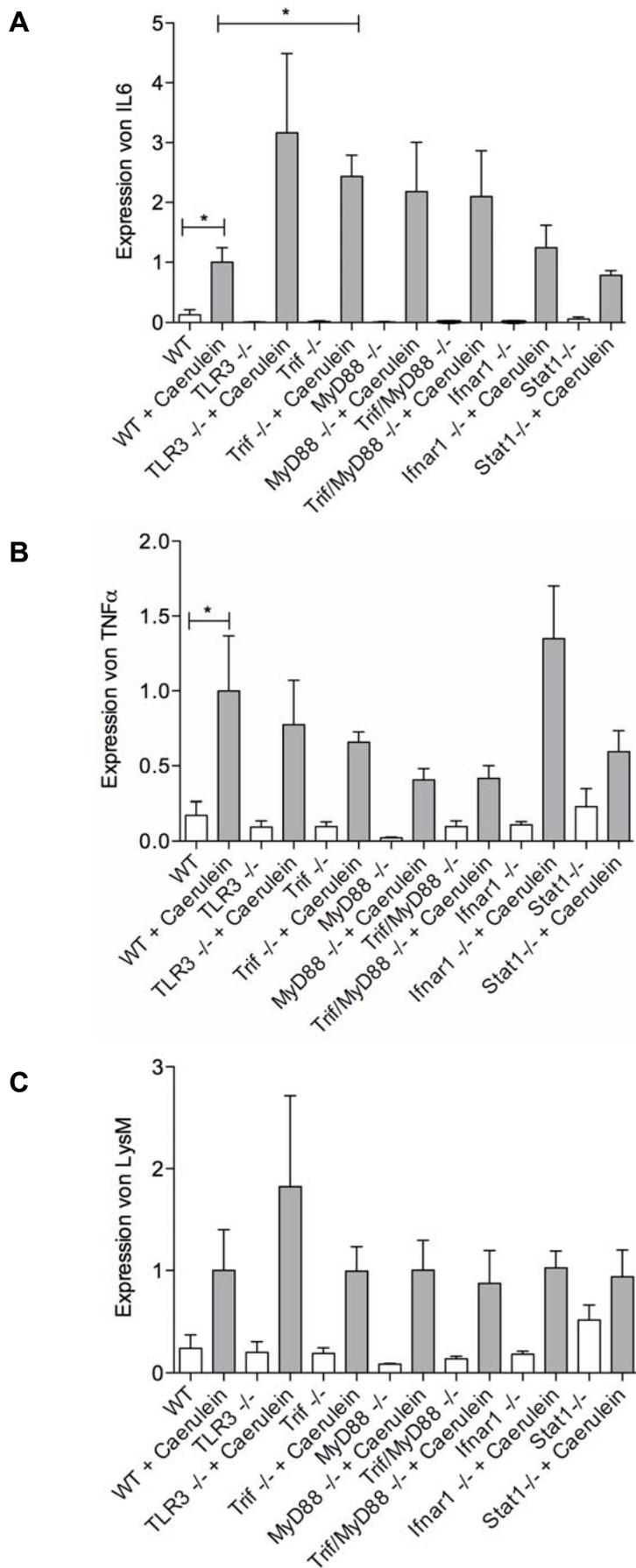
CCL2 wurde von MyD88^{-/-}/Trif^{Δps2/lps2}-Tieren tendenziell verstärkt exprimiert ($2,320 \pm 0,6542$ SD). CXCL9 ($1,23602 \pm 0,7509$ SD) zeigte neben einer größeren Standardabweichung keine eindeutigen Veränderungen und CXCL10 zeigte Tendenzen zur Herunterregulierung bei einer 0,5845fachen Expression ($\pm 0,2164$ SD). Die Expression von CXCL11 war mit einer 0,02077fachen Expression ($\pm 0,007624$ SD) hoch signifikant herunterreguliert ($p=0,0002^{***}$) (siehe Abb. 8 (G)).

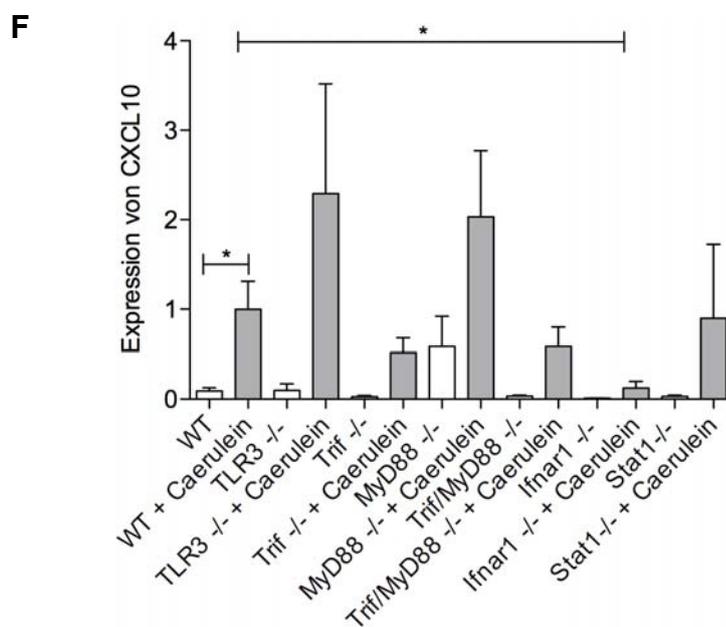
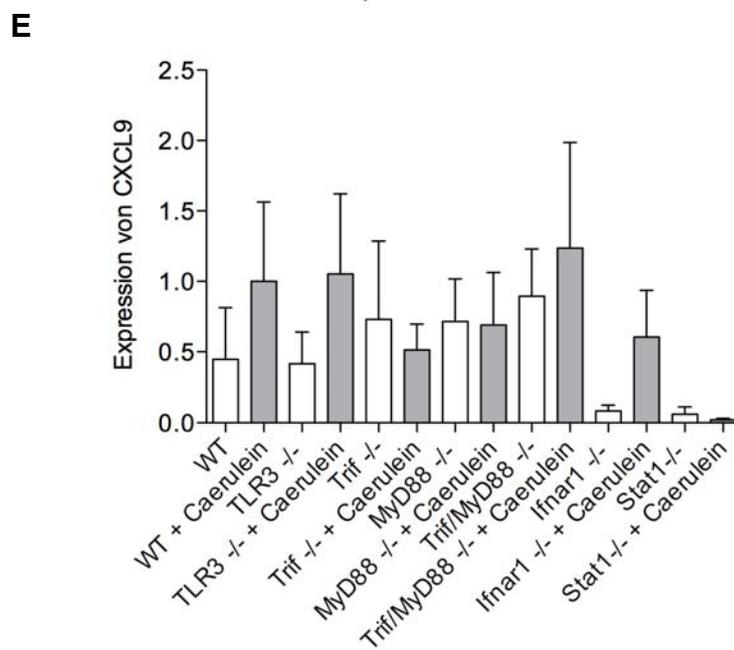
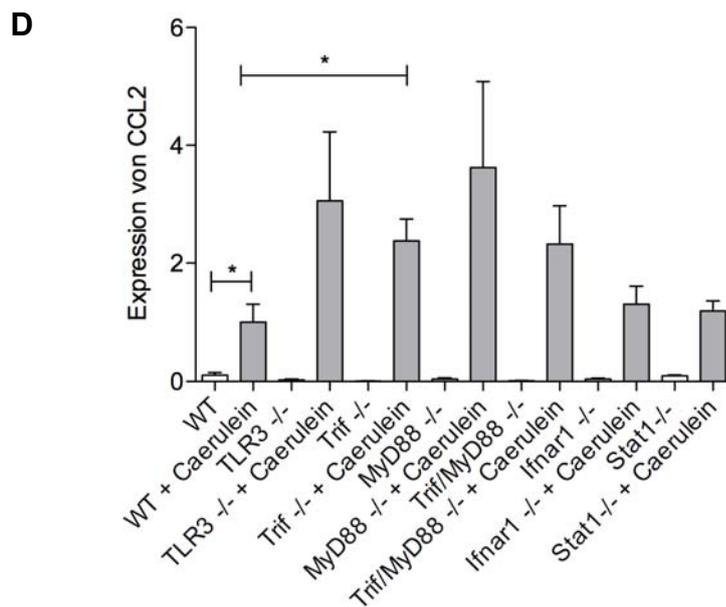
Bei den MyD88^{-/-}-Tieren konnte man eine Hochregulierung von IL6 ($2,182 \pm 0,8250$ SD) und eine Herunterregulierung von TNF α ($0,4063 \pm 0,07432$ SD) ohne statistische Signifikanz beobachten. LysM zeigte bei den MyD88^{-/-}-Tieren kaum Veränderungen in der Expression ($1,003 \pm 0,2921$ SD). Man konnte zwar tendenziell eine verstärkte Expression von CCL2, aber auch eine große Standardabweichung ($3,625 \pm 1,458$ SD) entdecken. CXCL9 wies bei einer 0,6902fachen Expression ($\pm 0,3727$ SD) auch kaum Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auf. MyD88^{-/-} zeigte wiederum eine 2,032fache höhere Expression von CXCL10 ($\pm 0,7289$ SD) verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen. CXCL11 war bei den MyD88^{-/-}-Tieren hoch signifikant herunterreguliert ($0,007617 \pm 0,003562$ SD, $p=0,0004^{***}$) (siehe Abb. 8 (G)).

IFN α R^{-/-}-Tiere zeigten kaum Veränderungen in der Expression der proinflammatorischen Zytokine IL6 ($1,242 \pm 0,3776$ SD) und TNF α ($1,350 \pm 0,3519$ SD) und des Enzyms LysM ($1,026 \pm 0,1642$ SD) verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen. Die Expression von CCL2 war 1,301fach ($\pm 0,3062$ SD) und von CXCL9 0,6050fach ($\pm 0,3305$ SD). IFN α R^{-/-}-Mäuse wiesen eine statistisch signifikante Herunterregulierung von CXCL10 ($0,1252 \pm 0,07343$ SD, $p = 0,0207^*$) und von CXCL11 ($0,004547 \pm 0,002332$ SD, $p=0,0004^{***}$) auf (siehe Abb. 8 (G)).

Es konnte eine leichte Herunterregulierung von IL6 ($0,7827 \pm 0,07901$ SD) und von TNF α ($0,5938 \pm 0,1406$ SD) bei den STAT1^{-/-}-Tieren bei fehlender statistischer Signifikanz beobachtet werden. Auch bei den STAT1^{-/-}-Tieren waren die Expression von LysM ($0,9375 \pm 0,2631$ SD) und CCL2 ($1,189 \pm 0,1672$ SD) kaum verändert im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Sie wiesen eine 0,8989fache Expression von

CXCL10 ($\pm 0,8245$ SD) auf. Hoch signifikant war CXCL 11 bei den STAT1^{-/-}-Tieren herunterreguliert ($0,007801 \pm 0,004008$ SD, $p=0,0004^{***}$) (siehe Abb. 8 (G)).





G

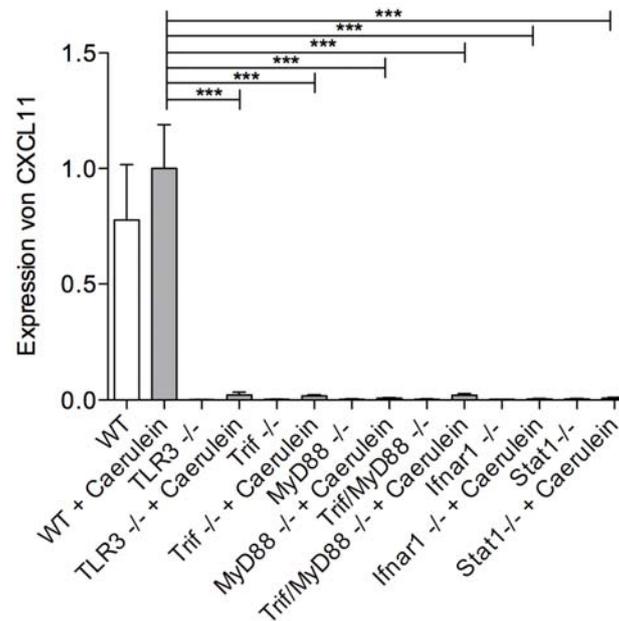


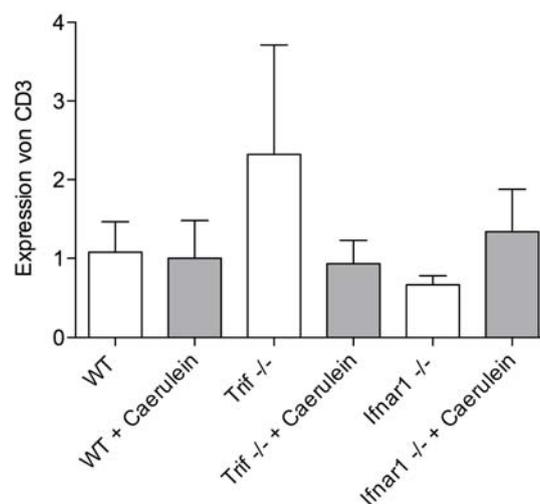
Abb. 8 (A)-(G) Genexpression (normalisiert auf WT + Caerulein) der Zytokine IL6 (A) und $TNF\alpha$ (B), von LysM (C) und der Chemokine und Chemokinrezeptoren CCL2 (D), CXCL9 (E), CXCL10 (F) und CXCL11 (G) in den jeweiligen Gen-defizienten Mausstämmen. Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken stellen Standardfehler der Mittelwerte dar. * zeigt einen statistisch signifikanten, *** einen statistisch höchst signifikanten Unterschied im Vergleich zu WT + Caerulein an.

Zur genaueren Analyse der Immunzellinfiltration und des unter anderem dadurch bedingten Schweregrads der akuten Pankreatitis wurde die Expression der Gene CD3 (Teil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes), CD11b (exprimiert auf Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und natürlichen Killer-Zellen), CD19 (exprimiert auf B-Lymphozyten) und Gr1 (auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Plasmazellen, dendritischen Zellen und T-Zellen exprimiert) mit Hilfe der qRT-PCR gemessen. Diese Messungen wurden vorerst nur bei den Wildtypkontrollen, den $Trif^{ps2/ps2-}$ und den $IFN\alpha R^{-/-}$ Mäusen durchgeführt, um feststellen zu können, ob die Infiltration von Immunzellen in entzündetes Pankreasgewebe mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion überhaupt darstellbar und quantifizierbar war. Zur Quantifizierung von T-Zellen wurde das Protein CD3 ausgewählt, welches als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors (TCR) fungiert und somit auf allen T-Zellen exprimiert wird. Die Expression von CD3 war bei den mit Caerulein behandelten $Trif^{ps2/ps2-}$

Mäusen 0,9313fach so hoch ($\pm 0,2954$ SD) und bei den $\text{IFN}\alpha\text{R}^{-/-}$ 1,338fach so hoch ($\pm 0,5409$ SD) wie bei den Caerulein-behandelten Wildtypkontrollen (siehe Abb. 9 (A)). Die CD11b-Expression wurde zur Erfassung von Phagozytose gemessen und zeigte verglichen mit den Wildtypkontrollen bei den $\text{Trif}^{\text{dps2/lps2}}$ eine 0,9540fache Expression ($\pm 0,1659$ SD) und bei den $\text{IFN}\alpha\text{R}^{-/-}$ eine 0,9550fache Expression ($\pm 0,1492$ SD) (siehe Abb. 9 (B)). Die Infiltration der B-Lymphozyten wurde mit Hilfe der Expression von CD19 gemessen: $\text{Trif}^{\text{dps2/lps2}}$ wiesen im Mittel eine 2,061fache Expression ($\pm 1,654$ SD) und $\text{IFN}\alpha\text{R}^{-/-}$ eine 3,682fache Expression ($\pm 2,509$ SD) auf (siehe Abb. 9 (C)). Die Expression von Gr1 zeigte Tendenzen zur Herunterregulierung bei den Gen-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen : $\text{Trif}^{\text{dps2/lps2}}$ erzielte eine 0,2910fache Expression ($\pm 0,1275$ SD) und $\text{IFN}\alpha\text{R}^{-/-}$ eine 0,2848fache Expression ($\pm 0,07519$ SD) (siehe Abb. 9 (D)). Alle qRT-PCR-Messungen zur Immunzellinfiltration waren nicht statistisch signifikant und deuteten auf ein unverändertes Immunzell-Milieu hin. Nur in der Gr1-Expression zeigten sich statistisch unsignifikante Unterschiede zwischen $\text{Trif}^{\text{dps2/lps2}}$ - bzw. $\text{IFN}\alpha\text{R}^{-/-}$ - und den Wildtyp-Mäusen.

Diese Versuche machten deutlich, dass sowohl die Infiltration von Immunzellen an sich als auch die Charakterisierung der einzelnen Immunzellreihen in entzündetem Pankreasgewebe mit Hilfe der quantitativen „real-time Reverse Transkriptase“ Polymerasekettenreaktion nur schwierig zu erfassen waren, und wurden somit nicht bei den anderen untersuchten Gen-defizienten Mausstämmen angewendet.

A



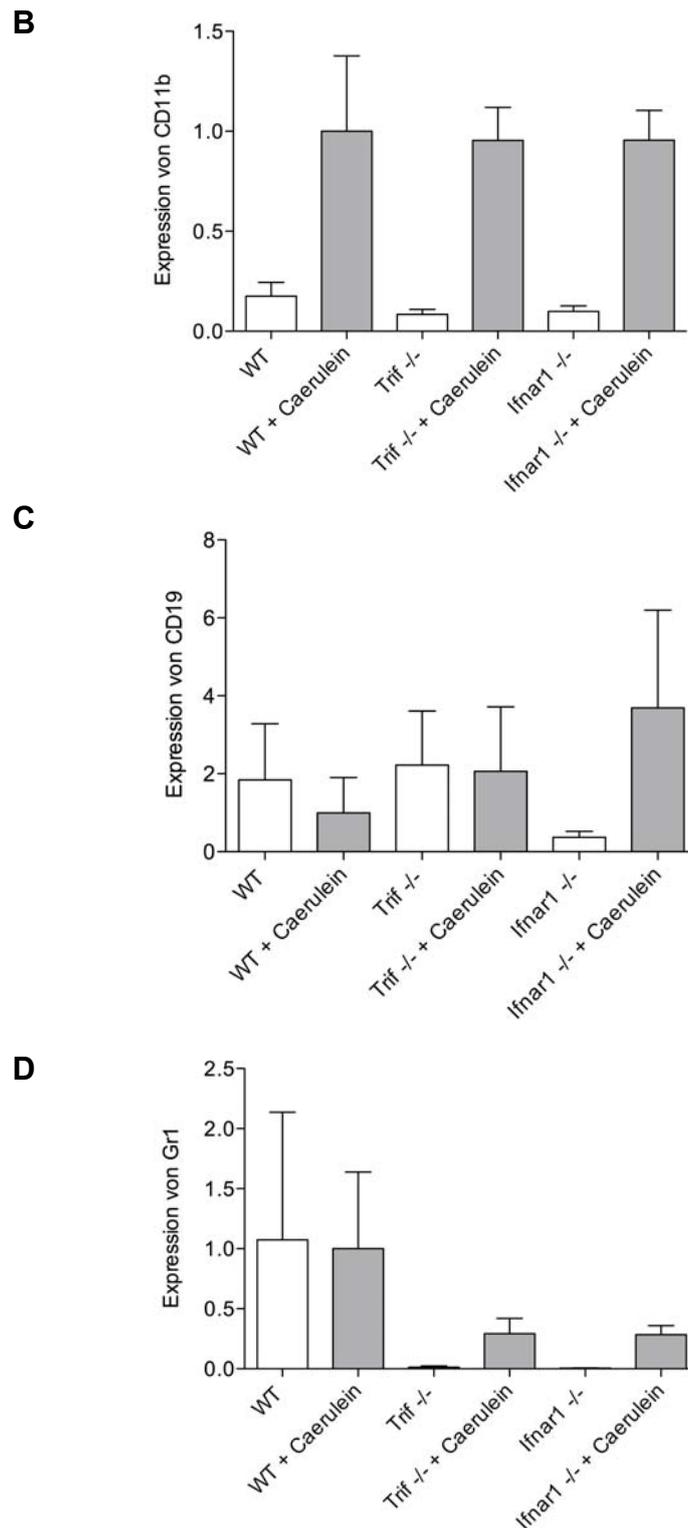


Abb. 9 (A)-(D) Genexpression (normalisiert auf WT + Caerulein) einzelner Immunzellmarker: CD3 (A), CD11b (B), CD19 (C) und Gr1 (D) in den jeweiligen Gendefizienten Mausstämmen. Die Balken stellen Mittelwerte und die Fehlerbalken stellen Standardfehler der Mittelwerte dar. Alle Messungen waren nicht statistisch signifikant.

Anschließend wurden verschiedene Gene, die im Signalweg der Apoptose entweder pro-apoptotisch oder anti-apoptotisch wirken, auf ihre Expression in Pankreasgewebe von Wildtyp-Kontrollen und $\text{Trif}^{\text{ps2/lps2}}$ -Tieren nach Behandlung mit Caerulein gemessen. Das Apoptose-fördernde bzw. -induzierende Protein BIM zeigte verglichen mit dem Wildtyp eine 0,7916fache Expression ($\pm 0,0639$ SD), FasL eine 0,8298fache Expression ($\pm 0,1589$ SD), Noxa eine 1,385fache Expression ($\pm 0,4996$ SD), Puma eine 0,6689fache Expression ($\pm 0,5904$ SD) und Trail eine 0,6158fache Expression ($\pm 0,2091$ SD). Alle Ergebnisse waren nicht statistisch signifikant. Anti-apoptotische Gene zeigten ebenfalls keinen einheitlichen Trend. Die Expression von BCL2 war im Durchschnitt 0,7232fach ($\pm 0,06811$ SD), während die von BCL2L1 1,245fach ($\pm 0,6434$ SD) und die von BCL2L2 1,665fach ($\pm 0,5105$ SD) im Vergleich zu den Wildtypkontrollen erhöht waren. Die Expression von Birc2, Birc3 und Birc4 waren niedriger als beim Wildtyp (Birc2 0,5673fache Expression $\pm 0,1758$ SD, Birc3 0,5440fache Expression $\pm 0,03473$ SD und Birc4 0,7461fache Expression $\pm 0,2784$ SD). Auch Flip1 und Flip2 waren leicht herunterreguliert bei den $\text{Trif}^{\text{ps2/lps2}}$ -Tieren, Flip1 zeigte eine 0,4382fache Expression ($\pm 0,1368$ SD) und Flip2 eine 0,4987fache Expression ($\pm 0,01086$ SD) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Auch diese Messungen waren nicht statistisch signifikant.

5 Diskussion

Der TLR-Signalweg ist äußerst komplex und wurde in der Vergangenheit mit Hilfe verschiedenster Methodik sowohl *in vitro* als auch *in vivo* näher untersucht. Obwohl die meisten beteiligten „downstream“ Moleküle der TLR bereits gut charakterisiert sind, verbleiben die exakten Mechanismen, wie die TLR die Genexpression induzieren, bis heute noch größtenteils unerforscht (Medzhitov et al., 2011).

Mithilfe verschiedenster Krankheitsmodelle wurden einzelne der am TLR-Signalweg beteiligten Gene bei Mäusen genauer untersucht und ihre Rolle in dem jeweiligen Modell evaluiert. In der vorliegenden Arbeit wurde zum Teil erstmalig der Einfluss verschiedener Moleküle des TLR-Signalwegs in der akuten Caerulein-induzierten Pankreatitis im Mausmodell untersucht.

Das in dieser Arbeit gewählte Caerulein-Pankreatitis-Modell an der Maus ist das am häufigsten verwendete Verfahren, um die akute Pankreatitis im Tiermodell zu untersuchen (Perides et al., 2005). Hierbei entwickeln die Versuchstiere nach zehnmaliger, in stündlichen Abständen durchgeführten intraperitonealen Injektion von Caerulein eine interstitiell-ödematöse Form der akuten Bauchspeicheldrüsenentzündung (Frossard et al., 2011), (Koh et al., 2011).

Unter anderem wurde dieses Modell auch bei Mäusen angewandt, denen das Gen für den TLR4 global fehlte, und der Schweregrad der akuten Pankreatitis bei diesen Tieren mit dem von Wildtyp-Kontrollen verglichen. Hier kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen: 2004 zeigte Pastor et al., dass der Schweregrad der Erkrankung bei TLR4^{-/-} und den TLR4^{+/+}-Wildtyp-Kontrollen nach Caerulein-Applikation (im 10-Stundenprotokoll mit supramaximal stimulierender Dosis) der gleiche war (Pastor et al., 2004). Andererseits beschrieb Sharif et al. 2009, dass sich in Anwesenheit von TLR4 eine schwerere Pankreatitis nach Caerulein-Induktion entwickelte, und dass TLR4^{-/-}-Mäuse eine mildere Form der Entzündung zeigten (Sharif et al., 2009).

Außerdem konnte im septischen Peritonitis-Modell gezeigt werden, dass MyD88^{-/-}/Trif^{Δps2/lps2}-Mäuse aufgrund der fehlenden überschießenden Produktion von proinflammatorischen Zytokinen im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen länger überlebten (Reim et al., 2011). Eine Hypothese in diesem Resultat ist, dass es bei Sepsis zu einer disregulierten Immunantwort kommt, die zur defekten Keimabwehr und Hyperinflammation mit einer exzessiven Zytokin-Sekretion (dem sog. „Zytokinsturm“) führt.

In dieser Dissertation wurde der Fokus auf die Entzündungsantwort des MyD88-unabhängigen Signalwegs von TLR3 und TLR4 über das *downstream* Molekül TRIF gelegt. Es wurde dazu bei TLR3^{-/-}- und Trif^{ps2/lps2}-Mäusen durch Caerulein eine akute Pankreatitis induziert. Um die genauen Effekte dieser Genverluste und ihren daraus resultierenden Einfluss auf die akute Entzündung in Bezug auf den TLR4-Signalweg differenzieren zu können, wurde gleiches Verfahren auch bei Mäusen durchgeführt, denen nur das Gen MyD88 (MyD88^{-/-}) und denen sowohl das MyD88-Gen als auch Trif-Gen (MyD88^{-/-}/Trif^{ps2/lps2}) gentechnisch ausgeschaltet wurden. Durch die Verwendung dieser doppelten Gen-Defizienz kann die Einflussnahme von TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 und TLR9 auf das Entzündungsgeschehen ausgeschlossen werden. Außerdem wurde dieses Verfahren auch bei Mäusen mit fehlendem IFN α R-Gen (IFN α R^{-/-}) und Mäusen mit fehlendem Gen für STAT1 (STAT1^{-/-}) angewandt, um die aus dem Genverlust resultierenden Veränderungen der Typ I Interferon-Antwort während der akuten Pankreatitis beobachten zu können.

In den Blutserumanalysen wurden die Enzymaktivitäten von Amylase und Lipase gemessen, zwei Serumparameter, die bei einer akuten Pankreatitis um ein Vielfaches des Normalwertes erhöht sind. Beide Parameter sind nach wie vor aufgrund ihrer guten technischen Durchführ- und Verfügbarkeit und ihrer hohen Sensitivität unabdingbare Tests in der Diagnostik beim Menschen auch wenn ihre Spezifität eher gering ist (Yadav et al., 2002), (Matull et al., 2006). Auch im Tierversuch nimmt man sich diese diagnostischen Tests zu Nutze.

Bei allen mit Caerulein behandelten Tieren waren sowohl Amylase als auch Lipase um ein Vielfaches erhöht (siehe Abb. 4 (A) und (B)). Im Gegensatz zu den mit Caerulein behandelten Wildtyp-Mäusen zeigten alle Gen-defizienten Tiere höhere Amylase- und Lipase-Serumwerte. Statistisch signifikant war dieser Unterschied bei MyD88^{-/-}/Trif^{ps2/lps2} (Amylase und Lipase), IFN α R^{-/-} (Lipase) und STAT1^{-/-} (Amylase und Lipase).

LDH, das zur Ermittlung des Zelluntergangs und des Schweregrades im Serum gemessen wurde, zeigte sich relativ unverändert, was darauf schließen ließ, dass der Zelluntergang des Pankreasgewebes im Gegensatz zur histologischen Beurteilung zu diesem Zeitpunkt noch nicht durch LDH-Messung quantifiziert werden konnte bzw. dass die Zellschäden nicht so gravierend waren, als dass sie im Blut durch LDH-Bestimmung messbar gewesen wären.

Ein für die Prognose entscheidender Faktor ist die Serum-Calciumkonzentration, die bei niedrigen Werten auf eine nekrotisierende Pankreatitis hinweisen kann. Einen signifikanten Unterschied zur Calciumkonzentration von Caerulein-behandelten C57BL/6N-Mäuse wiesen $\text{Trif}^{\text{dps2/ps2}}$ - und $\text{STAT}^{-/-}$ -Tiere auf. Dies weist bei Verlusten des TRIF-Gens oder des STAT1-Gens auf einen prognostisch ungünstigeren Verlauf der akuten Pankreatitis hin (siehe Abb. 4 (C)).

Im Rahmen der histologischen Begutachtung der HE-gefärbten Gewebeschnitte konnte man eine stärkere Bauchspeicheldrüsenentzündung bei allen Gen-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtypkontrollen, die durch Caerulein-Stimulation nur eine milde akute Pankreatitis ausbildeten, beobachten (siehe Abb. 5). Besonders stark betroffen waren die $\text{IFN}\alpha\text{R}^{-/-}$ - und $\text{STAT1}^{-/-}$ -Mäuse, die eine schwere akute Pankreatitis aufwiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass der Typ I Interferon-Signalweg eine protektive Rolle in der Pankreatitis einnimmt. Noch gravierender im Schweregrad der Pankreatitis wirkte sich allerdings der Verlust von STAT1 aus, das sowohl für Typ I IFN als auch für $\text{IFN}\gamma$ als wichtiges Signalmolekül in der Signaltransduktion fungiert. $\text{STAT1}^{-/-}$ -Mäuse zeigten ein besonders schweres Bild der akuten Pankreatitis, analog zu den Ergebnissen von der Arbeitsgruppe um Hayashi, die $\text{IFN}\gamma$ eine protektive Rolle in der akuten Pankreatitis zuschrieben (Hayashi et al., 2007).

Alle Mäuse zeigten bei Verlusten von Genen des TRIF-abhängigen oder MyD88-abhängigen Signalwegs einen stärkeren Phänotyp der akuten Entzündung: ein stärkeres Ödem, vermehrt Zelluntergang und eine Zunahme der Immunzellinfiltration im Vergleich zum Wildtyp. Die verstärkte Infiltration von Immunzellen konnte auch in der Zählung der einzelnen Zellen auf HE-Schnitten gefunden werden, allerdings waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant. Zusammenfassend konnte man zeigen, dass sich TLR3, Trif und MyD88 ebenfalls protektiv in der akuten Pankreatitis verhalten.

In Annahme bei stärkerem histologischen Schweregrad auch eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine auf mRNA-Ebene (Makhija und Kingsnorth, 2002) zu finden, wurden qRT-PCR- Messungen von Pankreasgewebe durchgeführt. Allerdings wiesen nur $\text{Trif}^{\text{dps2/ps2}}$ -Tiere eine statistisch signifikante IL6-Erhöhung im Pankreasgewebe auf während bei den restlichen Mausstämmen keine wesentliche Erhöhung zu finden war. Somit scheint es trotz Inhibierung der TRIF-abhängigen

IRF3- Aktivierung, und dadurch verminderten Zytokin-Produktion, zu einer erhöhten IL6-Expression kommen. Dies könnte u.a. durch eine MyD88-abhängige Aktivierung von Proteinen der IRF-Familie (IRF3 oder IRF5) oder von MAP-Kinasen bei einem Verlust des TRIF-abhängigen Signalwegs verursacht sein.

TNF α war insgesamt tendenziell weniger stark ausgeprägt, wobei dies besonders bei der Inhibierung des MyD88-Signalwegs beobachtet werden konnte: besonders niedrig war die TNF α -Expression bei den MyD88^{-/-}- und Trif^{flps2/lps2}/MyD88^{-/-}-Tieren, allerdings waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant. Das Enzym LysM zeigte keine großen Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen.

Fraglich ist, ob man mithilfe von Messungen der proinflammatorischen Zytokine wie IL6 oder TNF α im Blutserum eindeutiger Ergebnisse erzielt hätte, anhand derer man u.a. die Bemessung des Schweregrads eindeutiger hätte durchführen können (Pezzilli et al., 1995). Beim Menschen kann der IL6-Blutserumspiegel zur Prognoseabschätzung herangezogen werden, doch finden diese Messungen aufgrund ihrer Komplexität kaum Einzug in den klinischen Alltag (Matull et al., 2006). Auch bei dem durchgeführten Versuchsmodell der murinen akuten Pankreatitis ist eine Prognoseabschätzung mithilfe von IL6-Serumspiegel denkbar. Allerdings gilt dies nicht für TNF α : auch ein niedriger bis fehlender Serumspiegel von TNF α hätte aufgrund der kurzen Plasma-Halbwertszeit des Moleküls und seines schnellen Abbaus keinen Aufschluss auf den eigentlichen Schweregrad gegeben (Makhija und Kingsnorth, 2002).

Obwohl die Expression des Chemokins CCL2 bei Verlust des TRIF Gens und somit entstandener Blockierung des TRIF-abhängigen Signalwegs statistisch signifikant hochreguliert war, waren die anderen Chemokine CXCL9 und CXCL10 tendenziell weniger stark exprimiert, und man fand eine höchst signifikante Herunterregulierung des Chemokins CXCL11. Diese signifikant niedrige Expression von CXCL11 ließ sich auch bei allen anderen untersuchten Gen-defizienten Tieren beobachten. Man könnte diesen Effekt durch die Ausschaltung des NF κ B-Signalwegs erklären, da NF κ B sowohl durch den MyD88-abhängigen als auch durch den TRIF-abhängigen TLR-Signalweg über TRAF6 aktiviert wird (O'Neill und Bowie, 2007), und es so bei fehlendem TLR-Signal zu einer verminderten Expression von NF κ B-gesteuerten Genen wie Chemokinen und anderen Zytokinen kommen kann. Dies könnte auch die

verminderte Expression von $\text{TNF}\alpha$ erklären, denn auch $\text{TNF}\alpha$ ist, wie fast alle Zytokine, ein durch $\text{NF}\kappa\text{B}$ exprimiertes Protein.

Zur weiteren Charakterisierung der akuten Entzündung bei den TRIF-defizienten Tieren wurden Gene, die zur Differenzierung der einzelnen Immunzellen in Frage kamen, mittels qRT-PCR in Pankreasgewebe gemessen. Allerdings stellte sich dies als besonders diffizil heraus, da man keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen feststellen konnte und sich somit die histomorphologischen Befunde nicht auf mRNA-Ebene widerspiegeln ließen.

Um den histologisch festgestellten verstärkten Zelltod bei den TRIF-defizienten Mäusen besser einschätzen zu können, wurden auch Gene, die in der Apoptose von großer Bedeutung sind, für qRT-PCR-Messungen verwendet. Da TRIF über RIP1 und FADD die Induktion von Apoptose einleiten kann (O'Neill und Bowie, 2007), erwartete man durch den Verlust von TRIF Veränderungen in der Genexpression von pro- bzw. anti-apoptotischen Proteinen. Hier zeigte sich allerdings die Schwierigkeit eine Aussage über die Veränderung durch den Verlust von TRIF zu machen, denn diese Gene ließen sich in keinem eindeutigen Expressionsmuster erfassen (siehe Tabelle 14).

Man darf sicherlich nicht vergessen, dass das Pankreas an sich ein enzymreiches Organ ist, dessen Enzymsekretion im Caerulein-induzierten Pankreatitis-Modell zum äußersten gesteigert wird, was wiederum zu einem schnelleren Abbau und Proteolyse von diversen Proteinen, u.a. den mittels qRT-PCR gemessenen Genen, führt. Dies könnte natürlich neben vielen weiteren Faktoren auch die großen Schwankungsbreiten innerhalb der einzelnen Mausstämme erklären, die zum Teil in den qRT-PCR-Versuchen und Serum-Analysen zu finden waren.

Insgesamt ist es fraglich woher der stärkere histomorphologische Schaden der Azinuszellen im Pankreasgewebe stammt, den man bei dem Verlust von Genen des TLR-Signalwegs finden kann. Sehr wahrscheinlich scheint dies durch eine Störung der Gewebshomöostase bedingt zu sein. Durch den Verlust von TLR3 und seinem *downstream* Molekül TRIF bzw. durch den Verlust von TRIF und MyD88 (im Fall des TLR4-Signalwegs) kommt es zu einer verminderten Aktivierung von Zellproliferations- bzw. Zellregenerationsmechanismen wie Aktivierung der Cyclooxygenase (COX) 2, die u.a. in der Akutphase der Entzündung für die Regeneration eine wichtige Rolle spielt (Fukata et al., 2006). Somit könnte der Wegfall dieses protektiven Mechanismus den verstärkten Gewebeschaden erklären.

6 Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLR), deren zentrale Aufgabe in der Abwehr pathogener Erreger und in der Induktion einer inflammatorischen Immunreaktion liegt, gehören als transmembranöse *Pattern Recognition Receptors* zum angeborenen Immunsystem. Die Bedeutung der Signaltransduktionsmoleküle TRIF und MyD88 im TLR3- bzw. TLR4-abhängigen Signalweg in der murinen Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis und den Veränderungen in der Entzündungsantwort bei Wegfall von Genen dieses Signalwegs sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Deshalb wurde das Caerulein-Pankreatitis-Modell bei globalen TLR3^{-/-}, Trif^{ps2/lps2-}, MyD88^{-/-}, MyD88^{-/-}/Trif^{ps2/lps2-}, IFN α ^{-/-} und STAT1^{-/-}-Mäusen mit C57BL/6N-Mäusen als Wildtyp-Kontrollen angewendet. Zunächst wurde mittels Blutserumanalysen die Enzymaktivitäten von Amylase und Lipase gemessen. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Caerulein-behandelten Gen-defizienten Mausstämme höhere Serumspiegel von Amylase und Lipase aufwiesen als die jeweiligen Caerulein-behandelten Wildtyp-Kontrolltiere. Im Rahmen der histologischen Begutachtung der HE-gefärbten Gewebeschnitte konnte man eine stärkere Pankreatitis bei allen Gen-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtypkontrollen beobachten. Besonders starke histologisch-morphologische Veränderungen einer schweren akuten Pankreatitis zeigten IFN α ^{-/-} und STAT1^{-/-}-Mäuse. In Annahme bei stärkerem histologischen Schweregrad auch eine Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen auf mRNA-Ebene zu finden, wurden qRT-PCR-Messungen von Pankreasgewebe durchgeführt, wobei nur Trif^{ps2/lps2-}-Tiere eine statistisch signifikante IL6-Erhöhung aufwiesen und eine Expression von TNF α bei der Inhibierung des MyD88-Signalwegs tendenziell weniger stark ausgeprägt war. Es konnte eine statistisch höchst signifikante Herunterregulierung des Chemokins CXCL11 bei allen untersuchten Gen-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden, was evtl. durch die Ausschaltung des NF κ B-Signalwegs, der sowohl durch den MyD88-abhängigen als auch durch den TRIF-abhängigen TLR-Signalweg über TRAF6 aktiviert wird, zu erklären ist. Zur weiteren Charakterisierung der akuten Entzündung wurden bei den TRIF-defizienten Tieren Gene zur Differenzierung der einzelnen Immunzellen mittels qRT-PCR in Pankreasgewebe gemessen, was sich als besonders diffizil herausstellte und keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen feststellen ließ. Außerdem wurden weitere qRT-

PCR-Messungen mit pro- und anti-apoptischen Genen durchgeführt, um den histologisch festgestellten verstärkten Zelltod bei TRIF-defizienten Mäusen besser einschätzen zu können. Allerdings ließ sich auch hier kein eindeutiges Expressionsmuster erfassen. Zusammenfassend konnte man sowohl histologisch-morphologisch als auch in den Serumanalysen starke Veränderungen nach Verlusten von Genen des TRIF- und MyD88-abhängigen Signalwegs erkennen, was für einen protektiven Effekt des TLR3- und TLR4- abhängigen Signalweg spricht. Es ist weiter zu untersuchen, woher genau der stärkere histomorphologische Schaden der Azinuszellen stammt, den man bei dem Verlust von Genen des TLR-Signalwegs finden kann.

7 Literaturverzeichnis

Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131–144.

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., und Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143–150.

Akira, S., und Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., und Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738.

Ammori, B.J., Barclay, G.R., Larvin, M., und McMahon, M.J. (2003). Hypocalcemia in patients with acute pancreatitis: a putative role for systemic endotoxin exposure. *Pancreas* 26, 213–217.

Anderson, K.V., Jürgens, G., und Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42, 779–789.

Bakker, O.J., van Santvoort, H.C., Hagenaars, J.C., Besselink, M.G., Bollen, T.L., Gooszen, H.G., und Schaapherder, A.F. (2011). Timing of cholecystectomy after mild biliary pancreatitis. *Br J Surg* 98, 1446–1454.

Bem, J., und Bradley, E.L., 3rd (1998). Subcutaneous manifestations of severe acute pancreatitis. *Pancreas* 16, 551–555.

Bhatia, M. (2004). Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G189–196.

Bhatia, M. (2005). Inflammatory response on the pancreatic acinar cell injury. *Scand J Surg* 94, 97–102.

Bhatia, M. (2009). Acute pancreatitis as a model of SIRS. *Front. Biosci.* 14, 2042–2050.

Bhatia, M., Saluja, A.K., Singh, V.P., Frossard, J.L., Lee, H.S., Bhagat, L., Gerard, C., und Steer, M.L. (2001). Complement factor C5a exerts an anti-inflammatory effect in acute pancreatitis and associated lung injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G974–978.

Bhatia, M., Wong, F.L., Cao, Y., Lau, H.Y., Huang, J., Puneet, P., und Chevali, L. (2005). Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 5, 132–144.

- Binker, M.G., Binker-Cosen, A.A., Gaisano, H.Y., und Cosen-Binker, L.I. (2008). Inhibition of Rac1 decreases the severity of pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice. *Exp. Physiol* 93, 1091–1103.
- Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., und Martin, M. (2011). TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* 90, 417–427.
- Clemens, D.L., und Mahan, K.J. (2010). Alcoholic pancreatitis: lessons from the liver. *World J. Gastroenterol.* 16, 1314–1320.
- Dambrauskas, Z., Giese, N., Gulbinas, A., Giese, T., Berberat, P.O., Pundzius, J., Barauskas, G., und Friess, H. (2010). Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 16, 1845–1853.
- Darnell, J.E., Jr (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630–1635.
- Diehl, A.K., Holleman, D.R., Jr, Chapman, J.B., Schwesinger, W.H., und Kurtin, W.E. (1997). Gallstone size and risk of pancreatitis. *Arch. Intern. Med.* 157, 1674–1678.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., und Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 836–848.
- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C., und Levy, D.E. (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, 443–450.
- Frey, C.F., Zhou, H., Harvey, D.J., und White, R.H. (2006). The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994–2001. *Pancreas* 33, 336–344.
- Frossard, J.-L., Steer, M.L., und Pastor, C.M. (2008). Acute pancreatitis. *Lancet* 371, 143–152.
- Frossard, J.L., Lenglet, S., Montecucco, F., Steffens, S., Galan, K., Pelli, G., Spahr, L., Mach, F., und Hadengue, A. (2011). Role of CCL-2, CCR-2 and CCR-4 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *J. Clin. Pathol.* 64, 387–393.
- Fukata, M., Chen, A., Klepper, A., Krishnareddy, S., Vamadevan, A.S., Thomas, L.S., Xu, R., Inoue, H., Arditi, M., Dannenberg, A.J., et al. (2006). Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 131, 862–877.
- Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A.S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., Hsu, D., Xu, R., Harpaz, N., Dannenberg, A.J., et al. (2007). Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* 133, 1869–1881.

Gerondakis, S., Grumont, R.J., und Banerjee, A. (2007). Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol. Cell Biol.* 85, 471–475.

Ghosh, S., May, M.J., und Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225–260.

Gorelick, F.S. (2003). Alcohol and zymogen activation in the pancreatic acinar cell. *Pancreas* 27, 305–310.

Gross, V., Leser, H.G., Heinisch, A., und Schölmerich, J. (1993). Inflammatory mediators and cytokines--new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis? *Hepatogastroenterology* 40, 522–530.

Gukovskaya, A.S., Gukovsky, I., Jung, Y., Mouria, M., und Pandol, S.J. (2002). Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis. *J. Biol. Chem.* 277, 22595–22604.

Hayashi, T., Ishida, Y., Kimura, A., Iwakura, Y., Mukaida, N., und Kondo, T. (2007). IFN-gamma protects cerulein-induced acute pancreatitis by repressing NF-kappa B activation. *J. Immunol.* 178, 7385–7394.

Hochman, D., Louie, B., und Bailey, R. (2006). Determination of patient quality of life following severe acute pancreatitis. *Can J Surg* 49, 101–106.

Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabet, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., et al. (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424, 743–748.

Hofbauer, B., Saluja, A.K., Lerch, M.M., Bhagat, L., Bhatia, M., Lee, H.S., Frossard, J.L., Adler, G., und Steer, M.L. (1998). Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am. J. Physiol.* 275, G352–362.

Imrie, C.W., Carter, C.R., und McKay, C.J. (2002). Enteral and parenteral nutrition in acute pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16, 391–397.

Inokuchi, S., Aoyama, T., Miura, K., Osterreicher, C.H., Kodama, Y., Miyai, K., Akira, S., Brenner, D.A., und Seki, E. (2010). Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 844–849.

Iwasaki, A., und Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987–995.

Iwasaki, A., und Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291–295.

- Kaiser, A.M., Saluja, A.K., Sengupta, A., Saluja, M., und Steer, M.L. (1995). Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am. J. Physiol.* 269, C1295–1304.
- Kawai, T., und Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373–384.
- Koh, Y.-H., Moochhala, S., und Bhatia, M. (2011). The role of neutral endopeptidase in caerulein-induced acute pancreatitis. *J. Immunol.* 187, 5429–5439.
- Lampel, M., und Kern, H.F. (1977). Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 373, 97–117.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., und Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983.
- Lindkvist, B., Appelros, S., Manjer, J., und Borgström, A. (2004). Trends in incidence of acute pancreatitis in a Swedish population: is there really an increase? *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 831–837.
- Lund, H., Tønnesen, H., Tønnesen, M.H., und Olsen, O. (2006). Long-term recurrence and death rates after acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 41, 234–238.
- Makhija, R., und Kingsnorth, A.N. (2002). Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9, 401–410.
- Martinelli, C., und Reichhart, J.-M. (2005). Evolution and integration of innate immune systems from fruit flies to man: lessons and questions. *J. Endotoxin Res.* 11, 243–248.
- Matull, W.R., Pereira, S.P., und O'Donohue, J.W. (2006). Biochemical markers of acute pancreatitis. *J. Clin. Pathol.* 59, 340–344.
- Mayerle, J., Hlouschek, V., und Lerch, M.M. (2005). Current management of acute pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2, 473–483.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., und Janeway, C.A., Jr (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
- Medzhitov, R., Shevach, E.M., Trinchieri, G., Mellor, A.L., Munn, D.H., Gordon, S., Libby, P., Hansson, G.K., Shortman, K., Dong, C., et al. (2011). Highlights of 10 years of immunology in *Nature Reviews Immunology*. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 693–702.
- Meyers, M.A., Feldberg, M.A., und Oliphant, M. (1989). Grey Turner's sign and Cullen's sign in acute pancreatitis. *Gastrointest Radiol* 14, 31–37.

- Michelsen, K.S., und Arditi, M. (2007). Toll-like receptors and innate immunity in gut homeostasis and pathology. *Curr. Opin. Hematol.* 14, 48–54.
- Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., und Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918–1921.
- Niederau, C., Ferrell, L.D., und Grendell, J.H. (1985). Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology* 88, 1192–1204.
- Noppert, S.J., Fitzgerald, K.A., und Hertzog, P.J. (2007). The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol Cell Biol* 85, 446–457.
- Norman, J.G., Fink, G.W., Messina, J., Carter, G., und Franz, M.G. (1996). Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. *Surgery* 120, 515–521.
- O'Neill, L.A.J. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* 226, 10–18.
- O'Neill, L.A.J., und Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 353–364.
- Pastor, C.M., Pugin, J., Kwak, B., Chanson, M., Mach, F., Hadengue, A., und Frossard, J.L. (2004). Role of Toll-like receptor 4 on pancreatic and pulmonary injury in a mice model of acute pancreatitis associated with endotoxemia. *Crit. Care Med.* 32, 1759–1763.
- Perides, G., Sharma, A., Gopal, A., Tao, X., Dwyer, K., Ligon, B., und Steer, M.L. (2005). Secretin differentially sensitizes rat pancreatic acini to the effects of supramaximal stimulation with caerulein. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G713–721.
- Petersen, O.H., Gerasimenko, O.V., und Gerasimenko, J.V. (2011). Pathobiology of acute pancreatitis: focus on intracellular calcium and calmodulin. *F1000 Med Rep* 3, 15.
- Pezzilli, R., Billi, P., Miniero, R., Fiocchi, M., Cappelletti, O., Morselli-Labate, A.M., Barakat, B., Sprovieri, G., und Miglioli, M. (1995). Serum interleukin-6, interleukin-8, and beta 2-microglobulin in early assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with serum C-reactive protein. *Dig. Dis. Sci.* 40, 2341–2348.
- Pezzilli, R., Zerbi, A., Di Carlo, V., Bassi, C., und Delle Fave, G.F. (2010). Practical guidelines for acute pancreatitis. *Pancreatology* 10, 523–535.
- Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 375–386.

- Poch, B., Gansauge, F., Rau, B., Wittel, U., Gansauge, S., Nüssler, A.K., Schoenberg, M., und Beger, H.G. (1999). The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation. *FEBS Lett.* *461*, 268–272.
- Rakoff-Nahoum, S., und Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 57–63.
- Rakonczay, Z., Jr, Hegyi, P., Takács, T., McCarroll, J., und Saluja, A.K. (2008). The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* *57*, 259–267.
- Reim, D., Rossmann-Bloeck, T., Jusek, G., Prazeres da Costa, O., und Holzmann, B. (2011). Improved host defense against septic peritonitis in mice lacking MyD88 and TRIF is linked to a normal interferon response. *Journal of Leukocyte Biology* *90*, 613–620.
- Salazar-Mather, T.P., Lewis, C.A., und Biron, C.A. (2002). Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1 α delivery to the liver. *J Clin Invest* *110*, 321–330.
- Sand, J., Lankisch, P.G., und Nordback, I. (2007). Alcohol consumption in patients with acute or chronic pancreatitis. *Pancreatology* *7*, 147–156.
- Sandberg, A.A., und Borgström, A. (2002). Early prediction of severity in acute pancreatitis. Is this possible? *JOP* *3*, 116–125.
- Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., und Akira, S. (2003). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* *171*, 4304–4310.
- Sharif, R., Dawra, R., Wasiluk, K., Phillips, P., Dudeja, V., Kurt-Jones, E., Finberg, R., und Saluja, A. (2009). Impact of toll-like receptor 4 on the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice. *Gut* *58*, 813–819.
- Shrivastava, P., and Bhatia, M. (2010). Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* *16*, 3995–4002.
- Shuai, K., und Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* *3*, 900–911.
- Singh, V.P., Saluja, A.K., Bhagat, L., van Acker, G.J., Song, A.M., Soltoff, S.P., Cantley, L.C., und Steer, M.L. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest* *108*, 1387–1395.

- Suzuki, S., Miyasaka, K., Jimi, A., und Funakoshi, A. (2000). Induction of acute pancreatitis by cerulein in human IL-6 gene transgenic mice. *Pancreas* 21, 86–92.
- Takaoka, A., und Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell. Microbiol.* 8, 907–922.
- Taniguchi, T., und Takaoka, A. (2002). The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 111–116.
- Tonsi, A.F., Bacchion, M., Crippa, S., Malleo, G., und Bassi, C. (2009). Acute pancreatitis at the beginning of the 21st century: The state of the art. *World J Gastroenterol* 15, 2945–2959.
- Toouli, J., Brooke-Smith, M., Bassi, C., Carr-Locke, D., Telford, J., Freeny, P., Imrie, C., und Tandon, R. (2002). Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17 Suppl, S15–39.
- Tough, D.F., Sun, S., Zhang, X., und Sprent, J. (1999). Stimulation of naïve and memory T cells by cytokines. *Immunol. Rev.* 170, 39–47.
- Uhl, W., Warshaw, A., Imrie, C., Bassi, C., McKay, C.J., Lankisch, P.G., Carter, R., Di Magno, E., Banks, P.A., Whitcomb, D.C., et al. (2002). IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. *Pancreatology* 2, 565–573.
- Wada, K., Takada, T., Hirata, K., Mayumi, T., Yoshida, M., Yokoe, M., Kiriya, S., Hirota, M., Kimura, Y., Takeda, K., et al. (2010). Treatment strategy for acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 17, 79–86.
- Wang, G.-J., Gao, C.-F., Wei, D., Wang, C., und Ding, S.-Q. (2009). Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 15, 1427–1430.
- Werner, J., Feuerbach, S., Uhl, W., und Büchler, M.W. (2005). Management of acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care. *Gut* 54, 426–436.
- Whitcomb, D.C. (2006). Clinical practice. Acute pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* 354, 2142–2150.
- Yadav, D. (2011). Recent advances in the epidemiology of alcoholic pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 13, 157–165.
- Yadav, D., und Lowenfels, A.B. (2006). Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas* 33, 323–330.
- Yadav, D., und Lowenfels, A.B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 144, 1252–1261.
- Yadav, D., Agarwal, N., und Pitchumoni, C.S. (2002). A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 1309–1318.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., et al. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640–643.

8 Tabellarischer Anhang

Tabelle 10: Histologische Analysen

Maus Nummer	Ödem 0 - 4	Leukozyteninfiltration 0 - 4	Hämorrhagie 0 - 4	Zelluntergang 0 - 4	Summe
C-WT 1	1	1	0	1	3
C-WT 2	2	1	0	1	4
C-WT 3	0	0	0	0	0
C-WT 4	0	0	0	0	0
C-WT 5	0	0	0	0	0
C-WT 6	1	1	0	1	3
C-WT 7	2	2	0	1	5
C-WT 8	1	1	0	1	3
C-WT 9	2	1	0	1	4
C-WT 10	0	0	0	0	0
C-WT 11	0	0	0	0	0
C-WT 12	0	0	0	0	0
C-TT 1	3	1	0	2	6
C-TT 2	3	1	0	2	6
C-TT 3	2	2	0	2	6
C-TT 4	2	1	0	3	6
C-TT 5	0	0	0	0	0
C-TT 6	0	0	0	0	0
C-TT 7	0	0	0	0	0
C-TT 8	1	1	0	1	3
C-TT 9	3	2	0	2	7
C-TT 10	0	0	0	0	0
C-TT 11	0	0	0	0	0
C-TT 12	0	0	0	0	0
C-TT 13	3	2	0	2	7
C-TT 14	2	2	0	2	6
C-TR 1	2	2	0	2	6
C-TR 2	2	2	0	1	5
C-TR 3	0	0	0	0	0
C-TR 4	0	0	0	0	0
C-TR 5	1	2	0	2	5
C-TR 6	1	1	0	1	3
C-TR 7	0	0	0	0	0
C-TR 8	2	1	0	2	5
C-TR 9	0	0	0	0	0
C-TR 10	2	1	0	2	5
C-TR 11	0	0	0	0	0
C-TR 12	0	0	0	0	0
C-TR 13	0	0	0	0	0
C-MT 1	2	2	0	2	6
C-MT 2	3	2	0	3	8
C-MT 3	0	0	0	0	0
C-MT 4	0	0	0	0	0
C-MT 5	3	2	0	2	7
C-MT 6	2	2	0	2	6
C-MT 7	2	1	0	2	5
C-MT 8	0	0	0	0	0
C-MT 9	0	0	0	0	0
C-MT 10	2	1	0	2	5
C-MT 11	2	1	0	2	5
C-MT 12	0	0	0	0	0
C-MT 13	0	0	0	0	0
C-MY 1	2	2	0	2	6
C-MY 2	2	2	0	2	6
C-MY 3	2	2	0	1	5
C-MY 4	2	2	0	2	6
C-MY 5	2	2	0	2	6
C-MY 6	2	2	0	2	6
C-MY 7	0	0	0	0	0
C-MY 8	0	0	0	0	0
C-MY 9	0	0	0	0	0
C-IN 1	3	2	0	3	8
C-IN 2	3	2	0	2	7

C-IN 3	3	3	0	2	8
C-IN 4	0	0	0	0	0
C-IN 5	0	0	0	0	0
C-IN 6	0	0	0	0	0
C-IN 7	2	2	0	2	6
C-IN 8	3	2	1	3	9
C-IN 9	3	3	1	2	9
C-IN 10	0	0	0	0	0
C-IN 11	0	0	0	0	0
C-IN 12	0	0	0	0	0
C-ST 1	3	3	1	3	10
C-ST 2	3	2	0	3	8
C-ST 3	3	3	0	3	9
C-ST 4	0	0	0	0	0
C-ST 5	0	0	0	0	0
C-ST 6	0	0	0	0	0
C-ST 7	3	2	1	3	9
C-ST 8	3	2	0	3	8
C-ST 9	2	3	2	3	10
C-ST 10	0	0	0	0	0
C-ST 11	0	0	0	0	0
C-ST 12	0	0	0	0	0

Akute Pankreatitis – Grading

- 0 = kein Anzeichen einer Pankreatitis
 1 = 25% des Gewebes betroffen = mild
 2 = 50% des Gewebes betroffen = moderat
 3 = 75% des Gewebes betroffen = schwer
 4 = 100% des Gewebes betroffen = sehr schwer

Tabelle 11: Einzelne Cp-Werte und der Mittelwert der getesteten Referenzgene bei C57BL/6N-Mäusen

C-WT	Beta Actin	PPIB	HPRT1	RPL13A	C-WT (Caerulein)	Beta Actin (Caerulein)	PPIB (Caerulein)	HPRT1 (Caerulein)	RPL13A (Caerulein)
3	27,62441	24,72066	31,91117	25,18489	1	24,90627	26,59949	31,01277	25,46444
4	27,08291	25,37018	31,37992	25,27815	2	24,26555	25,70407	30,33608	24,63465
5	25,96378	21,87526	29,82293	21,97097	6	21,3968	22,81003	30,42916	21,66671
10	27,29505	24,29595	32,11917	24,16469	7	20,36103	23,1089	27,14454	20,99502
11	24,86897	24,85077	30,78858	24,47086	8	23,79295	25,84721	30,32596	24,79322
12	26,25315	23,69268	31,09209	23,45394	9	24,3466	25,03262	30,84244	23,49139
MW	26,51471	24,13425	31,185643	24,08725	MW	23,1782	24,8503867	30,0151583	23,507572

C57BL/6N: C-WT 3, 4, 5, 10, 11, 12 erhielten Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert, C-WT 1, 2, 6, 7, 8, 9 wurden mit Caerulein behandelt.

Tabelle 12: Expressionsunterschiede zwischen mit Caerulein behandelten C57BL/6N und TLR3^{-/-}

Genotyp	IL6 (MW ± SD)	p-Wert
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2425	0,1657
TLR3 ^{-/-} + Caerulein	3,164 ± 1,325	
	TNF α (MW ± SD)	

C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3682	0,6386
TLR3 ^{-/-} + Caerulein	0,7741 ± 0,2973	
	LysM (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,4013	0,4449
TLR3 ^{-/-} + Caerulein	1,823 ± 0,8923	
	CCL2 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3003	0,1411
TLR3 ^{-/-} + Caerulein	3,060 ± 1,167	
	CXCL9 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,5626	0,9479
TLR3 ^{-/-} + Caerulein	1,054 ± 0,5671	
	CXCL10 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3103	0,3636
TLR3 ^{-/-} + Caerulein	2,292 ± 1,226	
	CXCL11 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,1888	0,0002***
TLR3 ^{-/-} + Caerulein	0,02160 ± 0,01302	

Tabelle 13: Expressionsunterschiede zwischen mit Caerulein behandelten C57BL/6N und Trii^{lps2/lps2}

Genotyp	IL6 (MW ± SD)	p-Wert
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2425	0,0073**
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	2,437 ± 0,3530	
	TNF α (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3682	0,3825
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	0,6580 ± 0,06798	
	LysM (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,4013	0,9876
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	0,9926 ± 0,2403	
	CCL2 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3003	0,0159*
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	2,380 ± 0,3697	
	CXCL9 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,5626	0,4300
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	0,5129 ± 0,1848	
	CXCL10 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3103	0,2001
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	0,5198 ± 0,1619	
	CXCL11 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,1888	0,0004***
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	0,01766 ± 0,005388	
	CD3 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,4815	0,9056
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	0,9313 ± 0,2954	
	CD11b (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3775	0,9133
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	0,9540 ± 0,1659	
	CD19 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	0,9999 ± 0,9026	0,5859
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	2,061 ± 1,654	
	GR1 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,6388	0,3020
Trii ^{lps2/lps2} + Caerulein	0,2910 ± 0,1275	
	BIM (MW ± SD)	

C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2107	0,5245
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,7916 ± 0,06390	
	FasL (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2241	0,6361
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,8298 ± 0,1589	
	Noxa (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3303	0,5305
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	1,385 ± 0,4996	
	Puma (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,4004	0,6515
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,6689 ± 0,5904	
	Trail (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2499	0,3581
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,6158 ± 0,2091	
	BCL2 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2000	0,3810
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,7232 ± 0,06811	
	BCL2L1 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2414	0,6687
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	1,245 ± 0,6434	
	BCL2L2 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,1319	0,1285
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	1,665 ± 0,5105	
	Birc2 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3520	0,4394
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,5673 ± 0,1758	
	Birc3 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,1944	0,1543
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,5440 ± 0,03473	
	Birc4 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,4199	0,7039
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,7461 ± 0,2784	
	Flip1 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3076	0,2607
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,4382 ± 0,1368	
	Flip2 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2356	0,1894
Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,4987 ± 0,01086	

Tabelle 14: Expressionsunterschiede zwischen mit Caerulein behandelten C57BL/6N und MyD88^{-/-}/Trif^{ips2/ips2}

Genotyp	IL6 (MW ± SD)	p-Wert
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2425	0,2277
MyD88 ^{-/-} /Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	2,100 ± 0,7648	
	TNF α (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3682	0,1237
MyD88 ^{-/-} /Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,4154 ± 0,08521	
	LysM (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,4013	0,8098
MyD88 ^{-/-} /Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,8745 ± 0,3229	
	CCL2 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3003	0,1114
MyD88 ^{-/-} /Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	2,320 ± 0,6542	
	CXCL9 (MW ± SD)	

C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,5626	0,8119
MyD88 ^{-/-} /Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	1,236 ± 0,7509	
	CXCL10 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3103	0,2849
MyD88 ^{-/-} /Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,5845 ± 0,2164	
	CXCL11 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,1888	0,0002***
MyD88 ^{-/-} /Trif ^{ips2/ips2} + Caerulein	0,02077 ± 0,007624	

Tabelle 15: Expressionsunterschiede zwischen mit Caerulein behandelten C57BL/6N und MyD88^{-/-}

Genotyp	IL6 (MW ± SD)	p-Wert
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2425	0,1994
MyD88 ^{-/-} + Caerulein	2,182 ± 0,8250	
	TNF α (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3682	0,1450
MyD88 ^{-/-} + Caerulein	0,4063 ± 0,07432	
	LysM (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,4013	0,9953
MyD88 ^{-/-} + Caerulein	1,003 ± 0,2921	
	CCL2 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3003	0,1083
MyD88 ^{-/-} + Caerulein	3,625 ± 1,458	
	CXCL9 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,5626	0,6560
MyD88 ^{-/-} + Caerulein	0,6902 ± 0,3727	
	CXCL10 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3103	0,2266
MyD88 ^{-/-} + Caerulein	2,032 ± 0,7389	
	CXCL11 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,1888	0,0004***
MyD88 ^{-/-} + Caerulein	0,007617 ± 0,003562	

Tabelle 16: Expressionsunterschiede zwischen mit Caerulein behandelten C57BL/6N und IFNaR^{-/-}

Genotyp	IL6 (MW ± SD)	p-Wert
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2425	0,6015
IFNaR ^{-/-} + Caerulein	1,242 ± 0,3776	
	TNF α (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3682	0,5081
IFNaR ^{-/-} + Caerulein	1,350 ± 0,3519	
	LysM (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,4013	0,9527
IFNaR ^{-/-} + Caerulein	1,026 ± 0,1642	
	CCL2 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3003	0,4991
IFNaR ^{-/-} + Caerulein	1,301 ± 0,3062	
	CXCL9 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,5626	0,5584
IFNaR ^{-/-} + Caerulein	0,6050 ± 0,3305	

		CXCL10 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein		1,000 ± 0,3103	0,0207*
IFNaR ^{-/-} + Caerulein		0,1252 ± 0,07343	
		CXCL11 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein		1,000 ± 0,1888	0,0004***
IFNaR ^{-/-} + Caerulein		0,007617 ± 0,003562	
		CD3 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein		1,000 ± 0,4815	0,6504
IFNaR ^{-/-} + Caerulein		1,338 ± 0,5409	
		CD11b (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein		1,000 ± 0,3775	0,9140
IFNaR ^{-/-} + Caerulein		0,9550 ± 0,4059	
		CD19 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein		0,9999 ± 0,9026	0,3382
IFNaR ^{-/-} + Caerulein		3,682 ± 2,509	
		GR1 (MW ± SD)	
C57BL/6N + Caerulein		1,000 ± 0,6388	0,2922
IFNaR ^{-/-} + Caerulein		0,2848 ± 0,07519	

Tabelle 17: Expressionsunterschiede zwischen mit Caerulein behandelten C57BL/6N und STAT1^{-/-}

Genotyp	IL6 (MW ± SD)	p-Wert
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,2425	0,4141
STAT1 ^{-/-} + Caerulein	0,7827 ± 0,07901	
		TNF α (MW ± SD)
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3682	0,3270
STAT1 ^{-/-} + Caerulein	0,5938 ± 0,1406	
		LysM (MW ± SD)
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,4013	0,8990
STAT1 ^{-/-} + Caerulein	0,9375 ±	
		CCL2 (MW ± SD)
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3003	0,5936
STAT1 ^{-/-} + Caerulein	1,189 ± 0,1672	
		CXCL9 (MW ± SD)
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,5626	0,1131
STAT1 ^{-/-} + Caerulein	0,02277 ± 0,009828	
		CXCL10 (MW ± SD)
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,3103	0,9109
STAT1 ^{-/-} + Caerulein	0,8989 ± 0,8245	
		CXCL11 (MW ± SD)
C57BL/6N + Caerulein	1,000 ± 0,1888	0,0004***
STAT1 ^{-/-} + Caerulein	0,007801 ± 0,004008	

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. J. Kleeff für die freundliche Aufnahme in seiner Forschungsgruppe und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können. Herzlichen Dank für die großartige Unterstützung und für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. C. Michalski bedanken, für die Begeisterung und das Interesse für wissenschaftliches Arbeiten, das er in mir geweckt hat. Vielen Dank für die Überlassung dieses spannenden Themas und für die stets hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie ausdauernde Korrektur dieser Dissertation.

Herrn Dr. med. S. Rieder danke ich ganz besonders für die tägliche exzellente Betreuung und für seine große Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Darüber hinaus danke ich sehr herzlich für seine Geduld und die stetige Hilfestellung bei jeglichen Problemen.

Bei Frau Dipl. biol. S. Raulefs, PhD, bei Herrn Dr. B. Kong und bei Herrn PD Dr. rer. nat. K.-P. Janssen möchte ich mich herzlichst für ihre hilfreichen Änderungsvorschläge, Korrekturen und die unermüdliche Betreuung bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. B. Holzmann für die Möglichkeit an diesem Projekt beteiligt gewesen zu sein und die freundliche Aufnahme im Labor. Darüber hinaus möchte ich mich ganz besonders bei ihm für die Bereitstellung der Versuchstiere bedanken, und dafür, dass er bei jeglichen Problemen mit zahlreichen Hilfestellungen und Unterstützung zur Seite stand. Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. T. Adler vom Helmholtz-Zentrum München für die freundliche Bereitstellung der IFNaR^{-/-}- und STAT1^{-/-}-Tiere.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der AG Kleeff und allen Mitarbeitern der AG Holzmann, ohne deren Hilfe im Labor ich meine Arbeit nicht hätte durchführen können.

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Freunden danke ich für ihre mentale und moralische Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt meinem Mann für seine stets motivierende und aufmunternde Begleitung, seine Unterstützung und Fürsorge.