



Chirurgische Klinik und Poliklinik  
Pankreasforschungsguppe  
Klinikum rechts der Isar  
Technische Universität München

# Die Rolle des Typ I Interferonrezeptors im adulten murinen Pankreas im Verlauf der Entzündung und Regeneration

---

**Katharina Julia Miller**

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

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.- Prof. Dr. Jürgen Ruland
Prüfer der Dissertation :	Univ.- Prof. Dr. Helmut Friess
	Univ.- Prof. Angelika Schnieke, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 17.06.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 25.02.2016 angenommen.



**Für meine Liebsten**



<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Pankreas</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2</b>	<b>Pankreatitis</b> .....	<b>13</b>
1.2.1	Akute Pankreatitis .....	13
1.2.2	Chronische Pankreatitis.....	14
<b>1.3</b>	<b>Pankreaskarzinom</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Mausmodelle</b> .....	<b>16</b>
1.4.1	Murines Krebsmodell.....	16
1.4.2	Murines Pankreatitismodell.....	17
<b>1.5</b>	<b>Zytokine</b> .....	<b>17</b>
1.5.1	Interleukine.....	18
1.5.2	Koloniestimulierende Faktoren .....	19
1.5.3	Tumornekrosefaktoren .....	20
1.5.4	Chemokine .....	20
1.5.5	Interferone .....	21
<b>1.6</b>	<b>Der Interferon alpha/beta Rezeptor</b> .....	<b>23</b>
<b>1.7</b>	<b>Makrophagen</b> .....	<b>26</b>
1.7.1	Ursprung und Funktion .....	26
1.7.2	Differenzierung und Polarisation in M1/M2 Makrophagen.....	27
<b>1.8</b>	<b>Clodronat basierte Depletion von Makrophagen</b> .....	<b>28</b>
<b>1.9</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>29</b>
2.1.1	Chemikalien.....	29
2.1.2	Verbrauchsmaterial .....	31
2.1.3	Geräte .....	31
2.1.4	Standardlösungen und -puffer .....	32
2.1.5	Zellkulturmedien .....	33
2.1.6	Kommerzielle Kits und Marker .....	33
2.1.7	Oligonukleotide.....	33
2.1.8	Antikörper und Antiseren .....	35
2.1.9	Substanzen für Tierversuche.....	36
2.1.10	Versuchstiere .....	36
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>38</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	38

# Inhaltsverzeichnis

---

2.2.1.1	Arbeiten mit Nukleinsäure.....	38
2.2.1.1.1	Desoxyribonukleinsäure.....	38
2.2.1.1.2	Ribonukleinsäure .....	38
2.2.1.1.3	Konzentrationsbestimmungen von DNA-/RNA-Lösungen .....	38
2.2.1.2	Polymerasekettenreaktion .....	38
2.2.1.3	Agarosegelelektrophorese.....	39
2.2.2	Präparation von Gesamt-RNA.....	40
2.2.2.1	Isolation von RNA aus Mausgewebeproben.....	40
2.2.2.2	Agarosegelelektrophorese zur Prüfung der RNA-Qualität.....	40
2.2.2.3	Reverse Transkription .....	41
2.2.2.4	Quantitative "Real- time PCR" .....	41
2.2.3	<i>In Vivo</i> - Methoden .....	42
2.2.3.1	Umgang mit Versuchstieren .....	42
2.2.3.2	Induktion einer Pankreatitis im Mausmodell.....	42
2.2.3.3	Depletion von Makrophagen.....	43
2.2.3.4	Pankreasresektion.....	43
2.2.3.5	Paraffineinbettung von immersionsfixierten Pankreasgewebe .....	43
2.2.4	Zellbiologische Methoden.....	44
2.2.4.1	Isolation primärer Azinuszellen aus dem adulten Pankreas.....	44
2.2.4.1.1	Enzymatische Isolation azinärer Zellen aus dem Pankreas.....	44
2.2.4.1.2	Mechanische Isolation azinärer Zellen aus dem Pankreas.....	44
2.2.4.2	Isolation von Immunzellen aus dem adulten Pankreas .....	45
2.2.4.2.1	Enzymatische Isolation vom Immunzellen aus dem Pankreas .....	45
2.2.4.2.2	Mechanische Isolation von Immunzellen aus dem Pankreas.....	45
2.2.5	Immunbiologische Methoden.....	45
2.2.5.1	Gewebefärbungen.....	45
2.2.5.1.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung .....	46
2.2.5.1.2	Immunhistochemie.....	46
2.2.5.1.3	Immunhistochemie: abweichende Färbeprotokolle.....	47
2.2.5.1.4	„Alcian Blue“-Färbung .....	49
2.2.5.2	Quantifizierung der Immunhistochemie.....	49
2.2.5.3	Beurteilung der Entzündung und Regeneration anhand H/E-gefärbter Pankreasschnitte.....	49
2.2.5.4	Durchflusszytometrie .....	50
2.2.5.4.1	Färbung isolierter Immunzellen für Durchflusszytometrie-Analysen .....	51
2.2.5.4.2	Durchflusszytometrie-Analysen.....	51
2.2.5.5	Blutserumanalysen.....	51

# Inhaltsverzeichnis

---

2.2.5.6	„Bead Based Immunoassay“ .....	52
2.2.6	Graphische Darstellung und statistische Analysen .....	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Vergleichende Analysen unbehandelter C57-B16/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2</b>	<b>Vergleichende Analysen von C57-B16/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein- induzierter Pankreatitis.....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Histologische Analysen und "Grading" der Entzündungs- und Regenerationsphase .....	55
3.2.2	Analyse der Proliferation und Zellschädigung in C57-B16/J und p48 <sup>Cre/+</sup> ; Ifnar <sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein-Behandlung.....	58
3.2.3	Betrachtung der Immunzellzusammensetzung während der Entzündung und Regeneration.....	60
<b>3.3</b>	<b>Makrophagendepletion und anschließende Analyse der Folgen in der Caerulein-induzierten Pankreatitis.....</b>	<b>62</b>
3.3.1	Etablierung der Depletion von Makrophagen.....	62
3.3.2	Histologische Analysen von depletierten C57-B16/J und p48 <sup>Cre/+</sup> ; Ifnar <sup>fl/fl</sup> Mäuse nach einer Caerulein-induzierten Pankreatitis.....	63
3.3.3	Analysen der Immunzellzusammensetzung im Pankreatitismodell nach Depletion der Makrophagen .....	65
<b>3.4</b>	<b>Phänotypisierung der Makrophagen isoliert aus C57-B16/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.....</b>	<b>66</b>
3.4.1	Etablierung schonender Isolationsmethoden für Immunzellen .....	67
3.4.2	Oberflächenmarker-basierte Phänotypisierung isolierter Makrophagen aus C57-B16/J und p48 <sup>Cre/+</sup> ; Ifnar <sup>fl/fl</sup> Mäusen .....	68
<b>3.5</b>	<b>Analyse des Zytokin- und Chemokinprofils in unbehandelten und behandelten C57-B16/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.....</b>	<b>69</b>
3.5.1	Erstellung eines Zytokinprofils .....	70
3.5.2	Validierung der mRNA-Expression in Serumproben .....	72
3.5.3	Erstellung eines Chemokinprofils.....	72
3.5.4	Validierung der mRNA-Expression des Chemokines <i>Ccl2</i> im Gewebeverband ....	73
<b>3.6</b>	<b>Expressionsanalysen von aktiviertem NF-κB in unbehandelten und behandelten C57-B16/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.....</b>	<b>74</b>
<b>3.7</b>	<b>Vergleichende Analysen von unbehandelten p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup> und p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen .....</b>	<b>77</b>
3.7.1	Histologische Analyse und "Grading" der beiden Genotypen.....	77

# Inhaltsverzeichnis

---

3.7.2	Analyse der Proliferation und der Zellschädigung in unbehandelten p48 <sup>Cre/+</sup> ; Kras <sup>G12D</sup> und p48 <sup>Cre/+</sup> ; Kras <sup>G12D</sup> ; Ifnar <sup>fl/fl</sup> Mäusen .....	80
3.7.3	Analyse der allgemeinen Immunzell- und Makrophagen-einwanderung in den unbehandelten Mausmodellen.....	81
<b>3.8</b>	<b>Vergleichende Analysen von p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup> und p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein-Behandlung .....</b>	<b>82</b>
3.8.1	Histologische Analysen und "Grading" der beiden Genotypen nach Caerulein-Behandlung .....	83
3.8.2	Analyse der Proliferation und der Zellschädigung in p48 <sup>Cre/+</sup> ; Kras <sup>G12D</sup> und p48 <sup>Cre/+</sup> ; Kras <sup>G12D</sup> ; Ifnar <sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein-Behandlung .....	85
3.8.3	Analyse der allgemeinen Immunzell- und Makrophagen-einwanderung in den Caerulein-behandelten Mausmodellen .....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>88</b>
4.1	<b>Vergleichende Analysen unbehandelter C57-BI6/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse .....</b>	<b>88</b>
4.2	<b>Vergleichende Analysen von C57-BI6/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein- induzierter Pankreatitis.....</b>	<b>89</b>
4.3	<b>Analysen der Immunzellzusammensetzung in C57-BI6/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein- induzierter Pankreatitis .....</b>	<b>91</b>
4.4	<b>Analyse des Einfluss der Makrophagen auf den Entzündungsverlauf und die Regeneration .....</b>	<b>92</b>
4.5	<b>Analyse des Zytokinprofils in C57-BI6/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein- induzierter Pankreatitis.....</b>	<b>94</b>
	<b>BI6/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen .....</b>	<b>97</b>
4.7	<b>Vergleichende Analysen von p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup> und p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.....</b>	<b>98</b>
4.8	<b>Ausblick .....</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
	<b>Summary.....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
6.1	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
6.2	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
6.3	<b>Quellenverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>115</b>



## Abkürzungsverzeichnis

---

% (v/v)	Volumenprozent
(w/v %)	Gewichtvolumenkonzentration in Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADM	azinäre-zu-duktales Metaplasie
AFL	atypische flache Läsionen
APC	Allophycocyanin
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ccl	Chemokine (C-C motif)-Ligand
CD	Unterscheidungsgruppen, von engl. "cluster of differentiation"
cDNA	komplementäre DNS, von engl. "complementary DNA"
<i>CFTR</i>	"cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"-Gen
CKK	Cholecystokinin
cm	Zentimeter
CSF	Koloniestimulierende Faktoren; von engl. "colony stimulating factors"
Ct-Werte	"cycle threshold"-Werte
d	Tage
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure, von engl. "deoxyribonucleic acid"
Dr. rer. nat	Doctor rerum naturalium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
ERK	"extracellular-signal regulated"-Kinase
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie, von engl. "fluorescence-activated cell sorting"
FBN	Fibronektin
FcR	Fc-Rezeptor, von engl. "fragment crystallisable receptor"
FCS	Fetales Kälberserum, von engl. "fetal calf serum"
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GAS	Interferon-γ-aktivierte Stellen
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
hCR	"class II helical cytokine"-Rezeptor Interleukin-1β aktivierendes Enzym, von engl. "Interleukin-1β activating enzyme"
ICE	
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-α-Rezeptor
Ifnar <sup>fl/fl</sup> Mäuse	p48 <sup>Cre/+</sup> ; Ifnar <sup>fl/fl</sup> Mäuse
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPMN	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien
IRF	Interferon-regulierender Faktor
ISG	Interferon-stimulierte Gene
ISGF	Interferon-stimulierte Gene-Faktor
ISRE	"Interferon-stimulated response elements"
JAK	Januskinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
<i>KRAS</i>	"Kirsten rat sarcoma"-Onkogen
Kras Mäuse	p48 <sup>Cre/+</sup> ; Kras <sup>G12D</sup> Mäuse
Kras; Ifnar <sup>fl/fl</sup> Mäuse	p48 <sup>Cre/+</sup> ; Kras <sup>G12D</sup> ; Ifnar <sup>fl/fl</sup> Mäuse
l	Liter
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LSL	lox-STOP-lox
M1	klassisch aktivierte Markophagen
M2	alternativ aktivierte Markophagen
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCN	Muzinöse zystische Neoplasien
MCP1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
MCP1	"monocyte chemotactic protein 1"
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, von engl. "major histocompatibility complex"
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNS, von engl. "messenger RNA"
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	"nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells"
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen, von engl. "natural killer"
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid, von engl. "nitric oxide"
OD	optische Dichte
PanIN	Pankreatische interepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, von engl. "phosphate-buffered saline"
PCR	Polymerasekettenreaktion, von engl. "polymerase chain reaction"
PDAC	Pankreaskarzinom, von engl. "pancreatic ductal adenocarcinoma"
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase
Ppib	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase B
<i>PRSSI</i>	Typsinogen-Gen
qRT PCR	Quantitative Echtzeit PCR, von engl. "quantitative real-time PCR"
RNA	Ribonukleinsäure, von engl. "ribonuclein acid"
ROI	Reaktive Sauerstoffspezies, von engl. "reactive oxygen intermediates"
Rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Sub-Domänen
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler, von engl. "standard error of the mean"
SH	"src-homology"

## Abkürzungsverzeichnis

---

SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom, von engl. "systemic inflammatory response syndrome"
<i>SMAD4</i>	"mothers against decapentaplegic homolog 4"-Gen
<i>SPINK-1</i>	Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ 1-Gen
STAT	"Signal Transducers and Activators of Transcription"
sTNF $\alpha$	lösliches TNF- $\alpha$ , von engl. "soluble TNF- $\alpha$ "
Tab.	Tabelle
TACE	TNF- $\alpha$ konvertierendes Enzym, von engl. "TNF- $\alpha$ -converting enzyme"
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TBS	Trisgepufferte Salzlösung, von engl. "Tris-buffered saline"
Th1	Typ1-T-Helferzellen
TLR	Toll like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
V	Volt
WT	Wildtyp

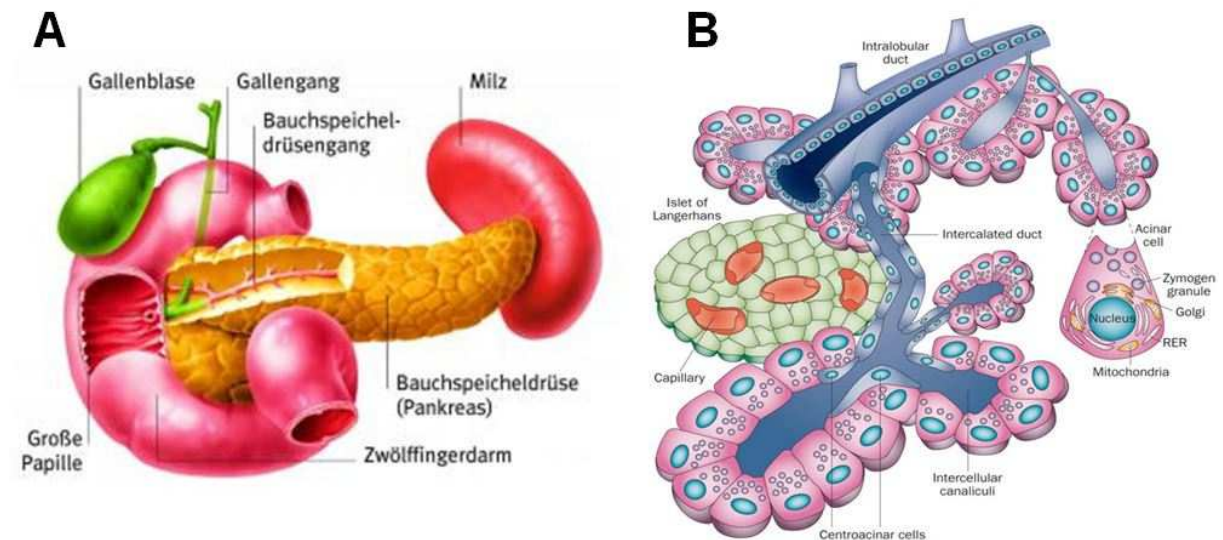
# 1 Einleitung

## 1.1 Pankreas

Das Pankreas (griechisch: πάγκρεας, *pánkreas*, *pán* für „alles“, *kréas* für „Fleisch“), oder auch die Bauchspeicheldrüse, ist ein Drüsenorgan, das beim Menschen etwa 16- 20 cm lang, 3- 4 cm breit und 1-2 cm dick ist und ein Gewicht zwischen 40- 120 g erreichen kann (Drenckhahn, 2008). Das Pankreas befindet sich hinter dem Bauchfell zwischen Magen, Zwölffingerdarm, Milz und Leber. Unterteilt wird das Organ in drei Abschnitte: den Pankreaskopf (*Caput pancreatis*), der vom Zwölffingerdarm umfasst wird; den Pankreaskörper (*Corpus pancreatis*), der horizontal auf Höhe des ersten bis zweiten Lendenwirbels die Wirbelsäule quert; und den Pankreasschwanz (*Cauda pancreatis*), der sich bis zur Milz erstreckt. Der etwa 2 mm Durchmesser umfassende Ausführungsgang der Bauchspeicheldrüse (*Ductus pancreaticus*) mündet gemeinsam mit dem Hauptgallengang (*Ductus choledochus*) in den Zwölffingerdarm (Graumann & Sasse, 2004). Die Bauchspeicheldrüse kann unterteilt werden in ein exokrines und ein endokrines Organ. Der endokrine Anteil des Pankreas liegt überwiegend im Pankreaskörper und -schwanz und besteht aus hormonbildenden Epithelzellen. Abhängig vom synthetisierten Hormon unterscheidet man zwischen  $\alpha$ -Zellen (Glukagon),  $\beta$ -Zellen (Insulin),  $\delta$ -Zellen (Somatostatin), PP-Zellen (pankreatisches Polypeptid) und  $\epsilon$ -Zellen (Ghrelin) (Schiebler & Korf, 2007). Insulin und Glukagon fungieren dabei als Regulatoren des Blutzuckerspiegels. Somatostatin hemmt die exokrinen Zellen des Pankreas, sowie die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen. Ghrelin weist eine appetitanregende Funktion auf, das pankreatische Polypeptid dagegen eine appetithemmende (Doenecke, 2005; Kleine & Rossmanith, 2014). Organisiert sind diese hormonbildenden Zellen in den sogenannten Langerhans'schen Inseln (*Insulae pancreaticae*), die insgesamt etwa 1- 2 % des Gesamtpankreasgewebes ausmachen (Cabrera et al., 2006). Der überwiegende Teil des Organs, ungefähr 80 %, setzt sich aus verdauungssaftbildenden Azini (lateinisch: *acinus* für „Beere“, „Traube“; Plural *acini*) zusammen. Im Verbund mit duktalem und zentroazinären Zellen sind Azini nicht nur in der Lage den Verdauungssaft zu speichern, sondern diesen auch in den Gastrointestinaltrakt weiter zu leiten. Stimuliert vom Geschmack der Nahrung sowie der Dehnung der Magenwand produzieren Azini ein Sekret, das Vorstufen an Verdauungsenzymen enthält: neben eiweißspaltenden Enzymen (Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Proteasen) auch stärkespaltende Enzyme ( $\alpha$ -Amylase, Ribo- und Desoxiribonukleasen) und fettspaltende Lipasen. Diese liegen in den azinären Komplexen in einer inaktiven Form vor, um einen Selbstverdau des Organs zu vermeiden, und werden erst im Zwölffingerdarm aktiviert

# Einleitung

(Lüllmann-Rausch, 2009). Ebenfalls im exokrinen Anteil des Pankreas befinden sich die Pankreassternzellen, denen eine wichtige Rolle bei der Produktion von Bindegewebsfasern und damit bei Reparaturvorgängen zugeschrieben wird (Apte et al., 1998).



**Abb.1: Schematische Darstellung des Pankreas.** (A) Lage des Pankreas, aus ("Wissen-Die Funktion der Bauchspeicheldrüse," 2015). (B) Exokrine und Endokrine Feinstruktur des Pankreas, aus (Logsdon & Ji, 2013).

## 1.2 Pankreatitis

Die Pankreatitis ist eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse und lässt sich in zwei Verlaufsformen unterteilen: in die akute und in die chronische Pankreatitis.

### 1.2.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist eine äußerst schmerzhafte Entzündung und weist eine Inzidenz von 10- 46 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern auf. Damit ist sie der Hauptgrund für Krankenhausaufenthalte verursacht durch gastrointestinale Erkrankungen (Lankisch, Apte, & Banks, 2015). In Abhängigkeit des Schweregrads der Pankreatitis liegt die Letalität zwischen 1- 15 % (Lerch, 2015). Hauptursachen für die Entstehung einer akuten Pankreatitis sind neben Gallensteinen (biliäre Pankreatitis; 50- 60 %) auch Alkoholmissbrauch (30- 40 %). Weitere, aber seltener auftretende Faktoren können Hyperlipidämie, Hyperkalzämie, Virusinfekte oder eine hereditäre Pankreatitis sein. Ebenso ist in 15 -20 % der Fälle eine genaue Ursache nicht zu identifizieren; man spricht dann von einer idiopathischen Pankreatitis (Banks, Freeman, & Practice Parameters Committee of the American College of, 2006; Runzi et al., 2000). Bei einer biliären Pankreatitis führen Gallensteine, die den Gallengang und damit gleichzeitig den Pankreasgang verschließen, zu einem Rückfluss der Gallensäure. Dadurch kommt es zur Beschädigung des Epithelgewebes des Pankreas.

Ebenso führt chronischer Missbrauch von Alkohol zu einer direkten Schädigung der pankreatischen Azini (Apte et al., 1995; Haber, Wilson, Apte, Korsten, & Pirola, 1994). Dies hat eine vorzeitige Aktivierung und Ausschüttung der Verdauungsenzyme zur Folge, was wiederum eine Autodigestion des Gewebes nach sich zieht. Dabei produzieren Azini nicht nur Verdauungsenzyme, sondern sind auch die Quellen entzündungsfördernder Zytokine (Makhija & Kingsnorth, 2002). Nach der initialen Schädigung der azinären Komplexe entsteht so eine lokale Entzündung des Pankreas, gefolgt von einer allgemeinen Immunreaktion. In schweren Verläufen der Krankheit entwickelt sich darüber hinaus eine Sepsis, welche mit einem Multiorganversagen verbunden sein kann (Kambhampati, Park, & Habtezion, 2014).

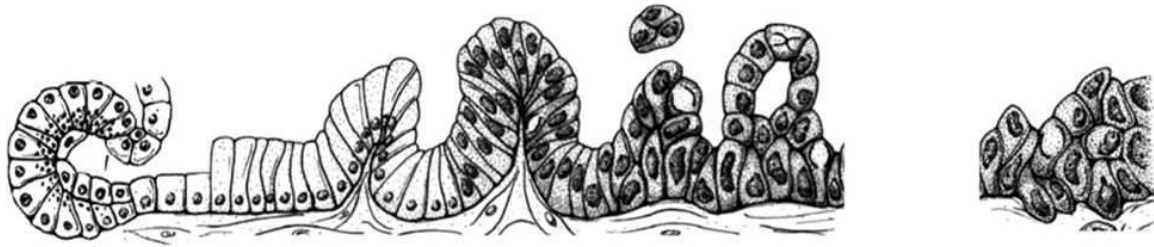
### 1.2.2 Chronische Pankreatitis

Definiert wird eine chronische Pankreatitis als eine dauerhaft anhaltende, entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse. Die Inzidenz dieser Krankheit liegt bei 23 pro 100.000 Einwohnern und betrifft ursachenbedingt überwiegend Männer in der 3.- 4. Lebensdekade (Dufour & Adamson, 2003). Die Letalität in einem Beobachtungszeitraum von 6- 10 Jahren beträgt dabei 13- 20 % (Lankisch, Lohr-Happe, Otto, & Creutzfeldt, 1993). Hauptursache für die Entstehung einer chronischen Bauchspeicheldrüsenentzündung ist der Alkoholmissbrauch. Studien konnten zeigen, dass ein Minimum von 80 g Alkohol pro Tag über einen Zeitraum von 6- 12 Jahren einen ausschlaggebenden Risikofaktor für eine chronische Pankreatitis darstellen kann (Spicak et al., 2007). Als weitere Ursachen zählen übermäßiger Tabakkonsum (Maisonneuve et al., 2005), sowie genetische Faktoren. So tragen 66- 68 % der Patienten mit einer hereditären Pankreatitis eine Mutation im Trypsinogen-Gen (PRSSI) (Rebours et al., 2009). Bei der sporadischen Pankreatitis konnten Mutationen in den Genen Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ 1 (SPINK-1) und "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator" (CFTR) als Risikofaktoren ausfindig gemacht werden (Ellis, Lerch, Whitcomb, & Consensus Committees of the European Registry of Hereditary Pancreatic Diseases, 2001; Weiss et al., 2005; Witt, Soimon, & Lerch, 2015). Im Verlauf der chronischen Pankreatitis wird durch wiederkehrende Entzündungen des Organs Pankreasparenchym durch fibrotisches Bindegewebe ersetzt. Dadurch kommt es zum allmählichen Verlust der exokrinen und der endokrinen Funktion des Pankreas. Als weitere Symptome können neben starken Schmerzen auch Unterernährung und Pseudozysten auftreten (Gress et al., 1994). Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass eine chronische Pankreatitis einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms (PDAC, "pancreatic ductal adenocarcinoma") darstellt (Duell et al., 2012; Yeo, 2015).

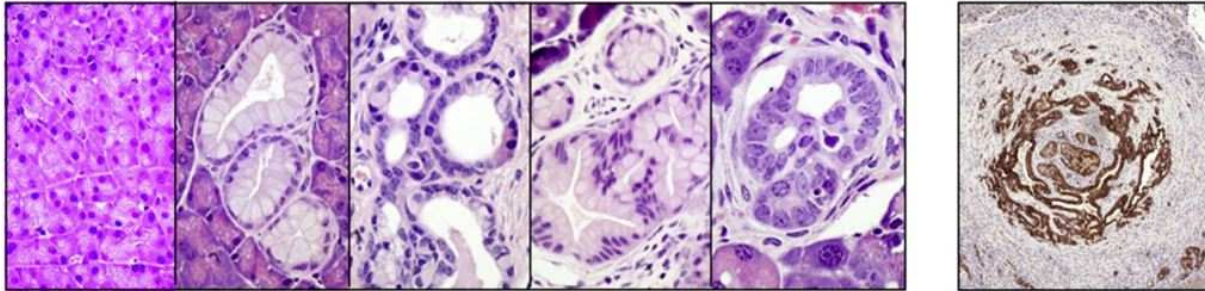
### 1.3 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom (Bauchspeicheldrüsenkrebs) ist eine maligne Veränderung des Pankreas und wird in verschiedene Arten unterteilt: Neben Tumoren, die auf eine azinäre oder endokrine Differenzierung zurückzuführen sind, gibt es auch Krebserkrankungen, die einen duktaalen Ursprung aufweisen. Dazu zählt das duktaale Adenokarzinom (PDAC), das die häufigste Art der Tumorerkrankungen des Pankreas darstellt. Das duktaale Adenokarzinom entwickelt sich aus der azinären-zu-duktaalen Metaplasie (ADM, "acinar-to-ductal metaplasia") aus Zellen des exokrinen Pankreas über neoplastische Vorläuferläsionen zum Karzinom. Es können dabei verschiedene Vorläuferläsionen unterschieden werden: pankreatische interepitheliale Neoplasien (PanIN), intraduktaale papilläre muzinöse Neoplasien (IPMN) und muzinöse zystische Neoplasien (MCN), sowie atypische flache Läsionen (AFL) (Aichler et al., 2012; Morris, Wang, & Hebrok, 2010). Am besten charakterisiert und beschrieben sind dabei die PanINs (Hruban et al., 2001; Kloppel & Luttges, 2001). Diese können wiederum anhand ihrer Differenzierung in drei Grade unterteilt werden: flache duktaale hyperplastische Läsionen (PanIN-1A) und papilläre duktaale Hyperplasien (PanIN-1B), flache und papilläre Hyperplasien mit Zellpolarisationsverlust (PanIN-2), sowie schwere duktaale Hyperplasien (PanIN-3) (Hruban, Maitra, & Goggins, 2008). Während der Entstehung des PDAC kommt es zu einer Akkumulation von Mutationen, sowohl in den Onkogenen als auch in den Tumor-Suppressorgenen. Etwa 90 % der Patienten mit PDAC weisen Mutationen des Onkogens *KRAS* auf (Kanda et al., 2012; Morris et al., 2010). Die Inaktivierung des Tumor-Suppressors p16 tritt in 95 % der Patienten auf, der Verlust des *TP53*-Gens ist in bis zu 75 %, der Verlust des *SMAD4*-Gens in etwa 50 % der Fälle nachweisbar (Maitra & Hruban, 2008). Eine Mutation und die damit verbundene Aktivierung des Proto-Onkogens *KRAS* zum Onkogen kann bereits in frühen Läsionen (PanIN-1) beobachtet werden; die Häufigkeit dieser Mutation nimmt im zeitlichen Verlauf der Tumorprogression zu: von 36 % (PanIN-1A und -1B) über 44 % (PanIN-2) auf bis zu 87 % (PanIN-2-3) (Lohr, Kloppel, Maisonneuve, Lowenfels, & Luttges, 2005). Verluste der Tumor-Suppressorgene lassen sich vor allem ab PanIN-3 beobachten (Kanda et al., 2012; Morris et al., 2010). Dadurch ist das duktaale Adenokarzinom eine genetische Erkrankung.

**A** Acini ► PanIN1A ► PanIN1B ► PanIN2 ► PanIN3 ►►►► PDAC



**B**



**Abb. 2: Darstellung der Karzinogenese im Pankreas.** (A) Schematisches Diagramm pre-neoplastischer Läsionen, die zur Entwicklung von PDAC führen. (B) Repräsentative PanIN-Läsionen, beobachtet in der  $Kras^{G12D}$ -Mauslinie, aus (Guerra & Barbacid, 2013).

Mit einer Inzidenz von 10 (Frauen) bzw. 13,8 (Männern) pro 100.000 Einwohnern ist der Bauchspeicheldrüsenkrebs eine der zehn häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland (Krebsforschungszentrum, 2015). Aufgrund der schlechten Prognose, bedingt vor allem durch die späte Erkennung des Tumors, ist das Pankreaskarzinom mit jährlich etwa 7000 Todesfällen die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache in Deutschland (Krebsregisterdaten, 2015).

## 1.4 Mausmodelle

### 1.4.1 Murines Krebsmodell

Um nicht nur den Entstehungsprozess des PDAC genauer untersuchen zu können, sondern auch um neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln und an der Früherkennung der Krebserkrankung arbeiten zu können, wurde ein spezielles Mausmodell entwickelt: die LSL-(lox-STOP-lox)- $KRAS^{G12D}$ -Mauslinie. Basierend auf der Erkenntnis, dass 98 % der  $KRAS$ -Mutationen im PDAC auf eine Punktmutation des Codon 12G zurück zu führen sind, wurde eine Maus generiert, die eine G12D-Mutation im Exon 2 des endogenen  $Kras$ -Alleles trägt. Durch die Verwendung einer Cre-Rekombinase ist es möglich, die Transkription des mutierten  $Kras$ -Allels gewebe- und zeitabhängig zu starten (Jackson et al., 2001).



## Einleitung

---

Die alleinige Aktivierung des Onkogens *Kras* ist in der adulten Maus für die Entstehung des duktales Adenokarzinoms nicht ausreichend. Ein weiteres Ereignis, wie eine weitere Mutation oder eine Entzündung, werden benötigt, um die Karzinogenese zu starten. Es konnte gezeigt werden, dass *Kras*-mutierte Azinuszellen im adulten Tier erst empfänglich für die Entstehung von intraepithelialen Neoplasien und PDAC werden, wenn die Mutation mit der Induktion einer Pankreatitis kombiniert wird (Guerra et al., 2011; Guerra et al., 2007).

### 1.4.2 Murines Pankreatitismodell

Um den Entzündungsprozess einer Pankreatitis verstehen zu können und daraus folgend Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, wurde eine Methode generiert, um den Ablauf der Krankheit in verschiedenen Mausmodellen nachzustellen: die Caerulein-induzierte Pankreatitis (Niederau, Ferrell, & Grendell, 1985; Saluja et al., 1985; Watanabe, Baccino, Steer, & Meldolesi, 1984). Dabei führen wiederholte Injektionen des humanen Cholecystinin (CKK) Analogons Caerulein zu einer Stimulation der pankreatischen Azini im murinen Modell. Diese Stimulation führt zu einer Ausschüttung von großen Mengen an Verdauungsenzymen und zu einer Dedifferenzierung der azinären Strukturen. Die Induktion der Entzündung ist dabei zunächst durch eine Degranulierung der Azini und der Einwanderung von Immunzellen in das Organ charakterisiert. In Wildtyp-Mäusen ist dieser dedifferenzierte Status transient und die beschädigten und verletzten Zellen können innerhalb einer Woche wieder zurück zu funktionsfähigen Azinuszellen generieren (Folias, Penaranda, Su, Bluestone, & Hebrok, 2014).

Im *Kras*<sup>G12D</sup>-Modell ist die Induktion einer Pankreatitis der entscheidende zweite Schritt für die Entstehung von Vorläuferläsionen und später der Entwicklung des duktales Adenokarzinoms (Guerra et al., 2011; Guerra et al., 2007).

## 1.5 Zytokine

Eine Entzündung, wie die Pankreatitis, ist ein äußerst komplexer Prozess. Entzündungen sind Anzeichen der Aktivierung des Immunsystems und dienen im Allgemeinen der Entfernung von Krankheitserregern und Giftstoffen aus den betroffenen Geweberegionen (*Duden 01. Die deutsche Rechtschreibung*, 2014). In der Vermittlung der Immunantwort spielen Signalproteine, die Zytokine, eine wichtige Rolle. Sie sind die Mediatoren des angeborenen Immunsystems und spielen, unter anderem, eine wichtige Rolle bei der Reifung, Aktivierung und Anlockung von Immunzellen.

Zytokine (altgriechisch: κύτος *kýtos* für "Zelle"; und *kinos* für "Bewegung") sind eine Familie kleiner, zuckerhaltiger Proteine (5- 25 kDa), die nicht nur immunmodulierend wirken, sondern

## Einleitung

---

auch eine regulierende Funktion auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen aufweisen. Die Ausschüttung von Zytokinen erfolgt über Rezeptor-induzierte Stimulation. Sie regulieren nicht nur die Balance zwischen humoraler und zellbasierter Immunantwort, sondern sind auch an der Aktivierung sowie Reifung von verschiedenen Zellpopulationen beteiligt. Ebenso sind diese Signalproteine in der Lage, die Ausschüttung weiterer Zytokine sowohl positiv als auch negativ zu beeinflussen. Die Hauptproduzenten von Zytokinen sind neben Immunzellen wie Makrophagen, B- und T-Lymphozyten und Mastzellen auch endotheliale Zellen, Fibroblasten und stromale Zellen. Unterteilt werden Zytokine in die fünf Hauptgruppen Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren, Chemokine und Interferone (Makhija & Kingsnorth, 2002; Purves, Sadava, Orians, & Heller, 2007).

Jede dieser Hauptgruppen nimmt dabei diverse Funktionen mit unterschiedlichen Auswirkungen ein, die im Folgenden detailliert dargestellt werden.

### 1.5.1 Interleukine

Die Interleukine (griechisch: *inter* für "zwischen" und *leukos* für "weiß") werden hauptsächlich von CD4-positiven T-Lymphozyten, aber auch von Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen produziert. Sie spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von B-Lymphozyten sowie hämatopoetischen Zellen, sondern aktivieren über einen autokrinen Mechanismus auch weitere T-Lymphozyten und andere Immunzellen. Interleukine sind nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert und bezeichnet. Derzeit sind 35 verschiedene Interleukine bekannt, deren Ursprung und Wirkung jedoch noch nicht bei allen geklärt ist. Trotz der ähnlichen Namen haben Interleukine völlig unterschiedliche Wirkungen. Dabei können Immunzellen von einigen Interleukinen aktiviert und von anderen wiederum gehemmt werden (Horn, 2012).

Interleukin 1 (IL-1) wurde als erstes Zytokin entdeckt und kann in die beiden Unterformen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  unterteilt werden. IL-1 spielt eine wichtige Rolle während der frühen Phase der Pankreatitis (Fink & Norman, 1997) und initiiert dabei die Entzündungskaskade (Makhija & Kingsnorth, 2002). Nach Stimulation durch Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder durch Lipopolysaccharide (LPS) wird die Vorläuferform von IL-1, pro-IL $\beta$ -1, von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Fibroblasten oder Epithelzellen ausgeschüttet. Aktiviert wird IL-1 durch ICE ("IL-1 $\beta$  activating enzyme") (Thornberry et al., 1992) und kann anschließend an die beiden Rezeptoren IL-1R-I oder IL-1R-II binden (Sims, Giri, & Dower, 1994). Dadurch wird nicht nur die Kernlokalisierung von NF- $\kappa$ B ("nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells") veranlasst (Kuno & Matsushima, 1994), sondern auch die Expression von Adhäsionsmolekülen, um unter anderem neutrophile Granulozyten anzulocken. Darüber

hinaus wird die Ausschüttung von weiteren Zytokinen wie IL-6 und IL-8 und von Chemokinen vermittelt (Makhija & Kingsnorth, 2002). Obwohl IL-1 keinen direkten Schaden des pankreatischen Gewebes verursacht (Denham et al., 1998), ist dieses Zytokin der Hauptmediator der sterilen Nekrose (C. J. Chen et al., 2007) und an der Entstehung von "SIRS" ("systemic inflammatory response syndrome"), einer systemisch generalisierten Entzündungsantwort (Ganzkörperentzündung) (Dinarello, 1996) beteiligt.

Interleukin 6 (IL-6) wird überwiegend von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten, aber auch von pankreatischen Azini sowie periazinären Myofibroblasten ausgeschüttet. Dabei stimulieren Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der wiederum die Transkription von IL-6 vermittelt (Shimada et al., 2002). Zur Signalweiterleitung kann IL-6 als Ligand entweder an einen membrangebundenen oder einen löslichen Rezeptor binden (Scheller, Garbers, & Rose-John, 2014). Während einer Entzündungsreaktion spielt IL-6 nicht nur eine tragende Rolle bei der Bildung der Akuten-Phasen-Proteine ("acute-phase reactants") (Castell et al., 1989; Geiger et al., 1988). IL-6 vermittelt vor allem den Übergang der angeborenen zur adaptiven Immunantwort (Jones, 2005) und dient ebenso während einer Pankreatitis als wichtiger diagnostischer Faktor (Dambrauskas et al., 2010).

### 1.5.2 Koloniestimulierende Faktoren

Eine weitere Hauptgruppe der Zytokine sind die koloniestimulierenden Faktoren (CSF, "colony stimulating factors"). Koloniestimulierende Faktoren sind Glykoproteine, die von diversen Gewebearten sowie Immunzellen synthetisiert werden und deren Hauptfunktion die Stimulation der Ausdifferenzierung von hämatopoetischen Stammzellen ist (Metcalf, 1986). Unterschieden wird dabei zwischen vier verschiedenen koloniestimulierenden Faktoren:

M-CSF (Makrophagen CSF oder CSF-1) ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Proliferation, Differenzierung sowie das Überleben von Makrophagen und Monozyten vermittelt (Stanley et al., 1997). Darüber hinaus beeinflusst M-CSF ausgereifte Makrophagen, indem es die Phagozytose-Aktivität und die Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen erhöht (Nemunaitis, 1993).

GM-CSF (Granulozyten Makrophagen CSF oder CSF-2) wird unter anderem von Makrophagen, Mastzellen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet und stimuliert die Produktion von neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie von Makrophagen (Metcalf, 1986).

G-CSF (Granulozyten CSF oder CSF-3) initiiert hauptsächlich die Proliferation und Differenzierung von Neutrophilen (Nicola & Metcalf, 1986). Daneben konnte noch eine neurotrophische Funktion gezeigt werden. Im zentralen Nervensystem induziert G-CSF die

## Einleitung

---

Neurogenese und erhöht die Neuroplastizität (Pitzer et al., 2008; A. Schneider et al., 2005). Multi-CSF, oder IL-3, wird von T-Lymphozyten produziert und stimuliert die Bildung von Granulozyten und Makrophagen. Multi-CSF hat aber auch einen proliferativen Effekt auf Megakaryozyten, sowie Erythrozyten, Mastzellen, Stammzellen und multipotente Zellen (Metcalf, 1986).

### 1.5.3 Tumornekrosefaktoren

Die Tumornekrosefaktoren (TNF, "tumor necrosis factor"), oder die Tumornekrose Familie, ist eine Gruppe von 19 Zytokinen und Zelloberflächenmarkern, die unter anderem bei der Vermittlung des programmierten Zelltods (Apoptose) eine wichtige Rolle spielen (M. Sun & Fink, 2007). Das bekannteste Mitglied dieser Familie ist der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  wird von einer Vielzahl an Immunzellen, vor allem aber von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet (Makhija & Kingsnorth, 2002). Sezerniert wird dabei ein Transmembranprotein. Durch die Abspaltung der extrazellulären Domäne mittels der Metalloprotease TACE ("TNF- $\alpha$ -converting enzyme") entsteht die lösliche Form sTNF- $\alpha$  ("soluble" TNF- $\alpha$ ) (Black et al., 1997). TNF- $\alpha$  kann seine pleiotropische Wirkung über die Bindung an zwei Rezeptoren entfalten: den TNFR-I (TNF Rezeptor) und den TNFR-II (Engelmann, Novick, & Wallach, 1990). Dies kann sowohl zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, als auch zum Anschalten des MAPK-("mitogen-activated protein kinases") Signalwegs führen. Dadurch trägt TNF- $\alpha$  nicht nur zur Zelldifferenzierung und -proliferation bei, sondern ist einer der Hauptmediatoren der Apoptose (Wajant, Pfizenmaier, & Scheurich, 2003). Dieser Effekt spielt auch im Krankheitsverlauf der Pankreatitis eine ausschlaggebende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass pankreatische Azini während der Entzündung des Organs nicht nur vermehrt TNF- $\alpha$  produzieren, sondern auch mit der Einleitung der Apoptose auf das TNF- $\alpha$ -Signal reagieren (Gukovskaya et al., 1997). Außerdem agiert TNF $\alpha$  während der Pankreatitis als Regulator für die Freisetzung weiterer entzündungsfördernder Zytokine und führt zur Aktivierung von Makrophagen sowie neutrophilen Granulozyten (Papachristou, 2008). Diese sind als Hauptbestandteile des angeborenen Immunsystems für die erste Gegenreaktion des Wirtes auf die Entzündungsreaktion verantwortlich (Silva, 2010).

### 1.5.4 Chemokine

Die Chemokine sind kleine Moleküle der Zytokinfamilie, deren Hauptaufgabe die Navigation von Immunzellen darstellt. Basierend auf der Anzahl und Lokalisation des Cysteinrestes am N-Terminus des Moleküls können Chemokine strukturell in vier Unterfamilien eingeteilt

## Einleitung

---

werden: CXC-, CC-, CX<sub>3</sub>C- und C-Chemokine (Rollins, 1997). Daneben ist eine funktionelle Einteilung dieser Zytokine in homöostatische und entzündliche Chemokine möglich. Homöostatische Chemokine werden fortwährend produziert. Sie vermitteln Reinigungsfunktionen im gesunden Organismus und sind verantwortlich für die Steuerung von Leukozyten während der Hämatopoese und Homöostase. Die Ausschüttung von entzündlichen Chemokinen wird dagegen erst durch entzündungsfördernde Signale wie TNF- $\alpha$  ausgelöst (Wagner et al., 2007). Diese Chemokin-Freisetzung veranlasst eine selektive Rekrutierung von Monozyten, Neutrophilen sowie Lymphozyten in die entzündeten oder verletzten Areale. Die gerichtete Migration von Immunzellen, die die entsprechenden Chemokinrezeptoren exprimieren, erfolgt dabei entlang eines Chemokingradienten (Callewaere, Banisadr, Rostene, & Parsadaniantz, 2007).

CCL2 ("chemokine (C-C-motif) ligand 2"), auch MCP1 ("monocyte chemotactic protein 1") ist ein Mitglied der CC-Familie und ein starker chemotaktischer Faktor für Monozyten. Obwohl die Hauptquelle für CCL2 Monozyten und Makrophagen sind (T. Yoshimura et al., 1989), wird dieses Chemokin von einer Vielzahl weiterer Zelltypen produziert; darunter Endothelzellen, Mikroglia, Fibroblasten, Zellen der glatten Muskulatur sowie die Azini des Pankreas (Cushing et al., 1990; Grady, Liang, Ernst, & Logsdon, 1997; Saurer et al., 2000). Initiiert wird die Ausschüttung von CCL2 durch entzündungsfördernde Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-6 (L. K. Sun et al., 2007). CCL2 wird bereits sehr früh im Verlauf der akuten Pankreatitis ausgeschüttet und hohe Level dieses Chemokines korrelieren in schweren Fällen der Krankheit mit dem Versagen weiterer Organe (Papachristou, 2008; Rau, Baumgart, Kruger, Schilling, & Beger, 2003).

### 1.5.5 Interferone

Die letzte Hauptgruppe der Zytokine sind die Interferone. Interferone (lateinisch: *interferre* für "sich einmischen, eingreifen") sind Glykoproteine, die von einer Vielzahl von Zellen, überwiegend von Immunzellen und Fibroblasten gebildet werden. Dies geschieht nach Kontakt mit Pathogenen wie Viren, Bakterien, Parasiten oder auch Tumorzellen. Interferone weisen vor allem eine antivirale sowie antitumorale Wirkung auf und stimulieren die zytotoxische Aktivität von Immunzellen (Ortaldo et al., 1983; Rehberg, Kelder, Hoal, & Pestka, 1982). Dadurch erhöhen diese Zytokine die Expression tumorassoziierter Oberflächenmarker (Greiner et al., 1987; Greiner et al., 1984) sowie weiterer Oberflächenmoleküle, wie der MHC I-("major histocompatibility complex class I") Antigene (Greiner et al., 1984; Ozzello, Derosa, Habif, Cantell, & Pestka, 1995). Ebenso initiieren Interferone die Apoptose durch die Induktion und Aktivierung proapoptotischer Gene (Clemens, 2003) sowie der Inhibierung antiapoptotischer Gene (Keay & Grossberg, 1980).

## Einleitung

Desweiteren wirken Interferone hemmend auf die Angiogenese (Fidler, 2001; Kerbel & Folkman, 2002).

Interferone lassen sich in mehrere Typen unterteilen: Typ I und Typ II Interferone sowie interferonähnliche Zytokine (Tab. 1). Eingeteilt werden diese Typen entsprechend der Rezeptoren, an denen die Interferone andocken. Die Typ I Interferone umfassen insgesamt sieben Klassen, dargestellt in Tabelle 1. Zur Klasse der Typ II Interferone zählt dagegen nur IFN- $\gamma$ . Die drei  $\lambda$ -Interferone zählen zu den interferonähnlichen Zytokinen (Pestka, Krause, & Walter, 2004).

**Tab. 1: Typ I, Typ II Interferone und Interferon-ähnliche Zytokine**

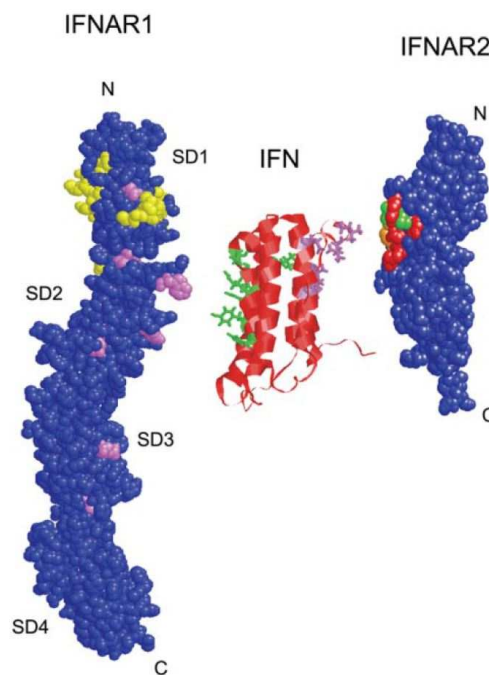
Ligand	Name	Rezeptor-Untereinheit 1	Rezeptor-Untereinheit 2
Typ I IFN	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$ R1	IFN- $\alpha$ R2
	IFN- $\beta$		
	IFN- $\delta$		
	IFN- $\epsilon$		
	IFN- $\kappa$		
	IFN- $\tau$		
	IFN- $\omega$		
Typ II IFN	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ R1	IFN- $\gamma$ R2
IL-28A	IFN- $\lambda$ 1	IFN-28R1	IFN-10R
IL-28B	IFN- $\lambda$ 2		
IL-29	IFN- $\lambda$ 3		

Eines der bekanntesten Interferone ist Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). IFN- $\alpha$  wird hauptsächlich von plasmazytoiden dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten produziert. Das nicht glykolisierte Protein kommt in verschiedenen Varianten vor (Ortaldo et al., 1984; Pestka et al., 2004) und kann unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen. IFN- $\alpha$  hat einen antiviralen Effekt, indem es hemmend auf die Synthese viraler Proteine wirkt und gleichzeitig den Abbau viraler mRNA fördert (Eife et al., 1981; Masters & Samuel, 1983; Panet & Falk, 1983). Seine antiproliferative Wirkung entfaltet IFN- $\alpha$  vor allem in Tumorzellen (Exley, Gordon, Nathan, Walker, & Clemens, 1987; Gastl et al., 1985; van den Berg, Leahey, Lynch, Clarke, & Nelson, 1987). Immunmodulierend wirkt dieses Typ I Interferon über die Aktivierung der zytotoxischen Aktivität in NK-("natural killer") Zellen und T-Lymphozyten (Ortaldo et al., 1983; Spektrum, 2015). Dadurch kommt IFN- $\alpha$  nicht nur in der Behandlung diverser Krebserkrankungen zum Einsatz; es ist auch ein oft verwendetes Therapeutikum für die Behandlung von Viruserkrankungen wie Hepatitis C. Bei dieser Therapie tritt oftmals eine Pankreatitis als Nebenwirkung auf (Bilar, Carvalho-Filho, Mota, Fucuta Pda, & Ferraz, 2014).

Ein konkreter Zusammenhang zwischen der Entzündung der Bauchspeicheldrüse und den Interferonen ist dabei bisher noch nicht geklärt.

### 1.6 Der Interferon alpha/beta Rezeptor

Die Signalweiterleitung der Typ I Interferone wird über den heterodimeren Interferon- $\alpha$  Rezeptor (IFNAR) vermittelt. Dieser besteht aus zwei Untereinheiten: IFN- $\alpha$ R1 (IFN- $\alpha$  Rezeptor, IFNAR1) und IFN- $\alpha$ R2 (IFNAR2). IFNAR1 sowie IFNAR2 zählen zur hCR-("class II helical cytokine receptor") Familie (Bazan, 1990) und sind aus mehreren Domänen zusammengesetzt. Dabei besteht der humane IFNAR1 aus vier Sub-Domänen (SD1- 4), von denen jede eine eigene Fibronektin-Domäne ("FBN-III-like") besitzt. SD1, SD2 sowie SD3 beherbergen desweiteren Liganden-Bindedomänen; SD4 ist für die spätere Formung des Gesamtzeptorkomplexes von Bedeutung (Lamken et al., 2005).



**Abb. 3: Typ I Interferon Rezeptor (IFNAR)-Komplex.** Dargestellt sind die Untereinheiten des humanen Interferonrezeptors hIFNAR1 und hIFNAR2 mit deren Ligand hIFN $\alpha$ 2), aus ((de Weerd, Samarajiwa, & Hertzog, 2007).

HuIFNAR1 besteht aus einer langer Transmembranform (de Weerd et al., 2007). HuIFNAR2 dagegen kann in drei verschiedenen Varianten auftreten: als lange Transmembranform (IFNAR2c), als kurze Transmembranform (IFNAR2b) und als lösliche Form (sIFNAR2a). Dabei ist für die Vermittlung der antiviralen Wirkung des IFN eine Interaktion zwischen IFNAR1 mit IFNAR2c ausschlaggebend (Cohen, Novick, Barak, & Rubinstein, 1995).

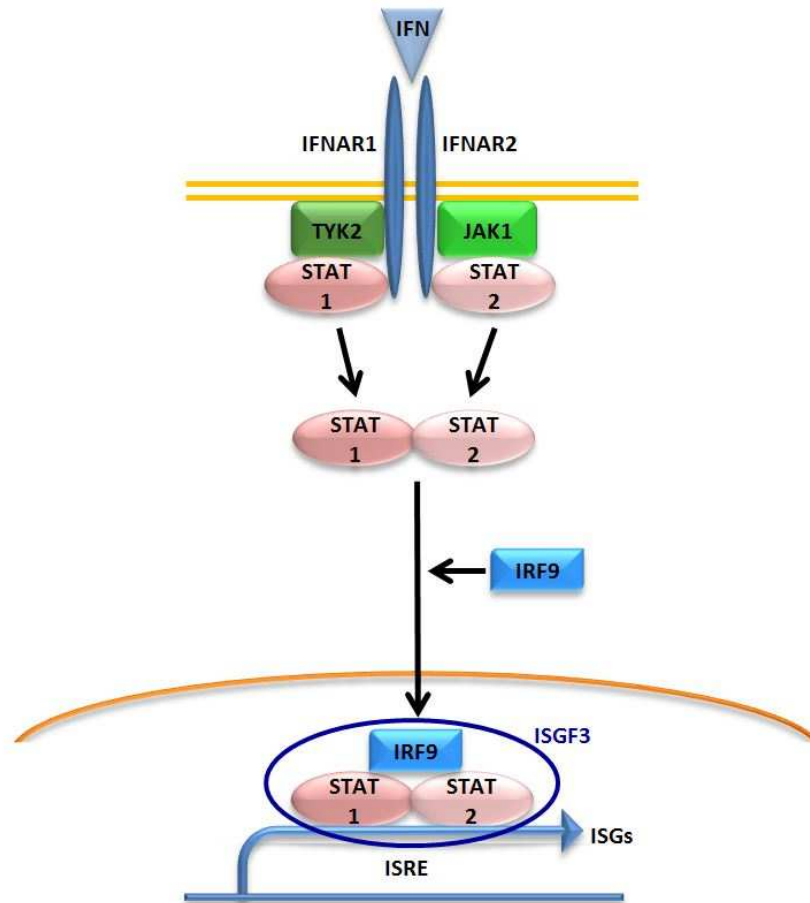
## Einleitung

---

In der Maus wurde, im Gegensatz zum Menschen, keine Ifnar2b Untereinheit entdeckt; dafür gibt es hier zwei Varianten der löslichen Isoform slfnar2a und slfnar2b (de Weerd et al., 2007).

Der am häufigsten vorkommende Signalweg, der durch Typ I Interferone aktiviert wird, ist der "Janus activated kinase–signal transducer and activation of transcription"-(JAK-STAT) Signalweg (Platanias, 2005). IFNAR1 ist dabei konstitutiv mit der Tyrosin Kinase 2 (TYK2) verbunden, IFNAR2 dagegen ist mit der Janus Kinase 1 (JAK1) assoziiert. Die Ligandenbindung an die Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 führt zu einer Trans-Phosphorylierung von JAK1 und TYK2. Die dadurch aktivierten Janus Kinasen phosphorylieren anschließend Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil des IFNAR. Diese Phospho-Tyrosinreste dienen danach als Dockingstation für SH2-("src-homology 2") enthaltende Signalmoleküle wie STAT1 und STAT2 ("Signal Transducers and Activators of Transcription"). Erst einmal an den Rezeptor gebunden verwandeln sich die STAT-Proteine in Substrate für JAK. STAT1 sowie STAT2 werden an einem einzelnen Tyrosin (Y701 bei STAT1 und Y690 bei STAT2) phosphoryliert. Nach dieser Phosphorylierung bilden die beiden STAT-Proteine ein Dimer und wandern anschließend in den Nukleus. Dort bindet diese Einheit an IRF9 ("IFN-regulatory factor 9") und formt den ISGF3-("IFN- stimulated gene factor 3") Transkriptionsfaktorkomplex; dieser bindet schließlich an die ISRE ("IFN-stimulated response elements") was schließlich zur Transkription von IFN-stimulierten Genen (ISGs) führt (Abb. 4) (Hervas-Stubbs et al., 2011). ISGs weisen ein sehr breites Spektrum an Funktionen auf. Durch die Manipulation von Signalwegen, die für das Überleben der Parasiten bedeutend sind, spielen sie nicht nur eine Rolle bei der Bekämpfung viraler und bakterieller Infektionen. ISGs vermitteln ebenso die Rekrutierung von Immunzellen durch die Hochregulierung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren. Darüber hinaus sind ISGs auch bei der Rückkehr zur Homöostase nach einer Entzündungsreaktion beteiligt (W. M. Schneider, Chevillotte, & Rice, 2014).





**Abb. 4: Der Typ I Interferon-Signalweg.** Das Typ 1 IFN Signal wird über den JAK-STAT-("Janus activated kinase–signal transducer and activation of transcription") Signalweg vermittelt und führt zur Transkription von IFN-stimulierten Genen, modifiziert nach (Hervas-Stubbs et al., 2011).

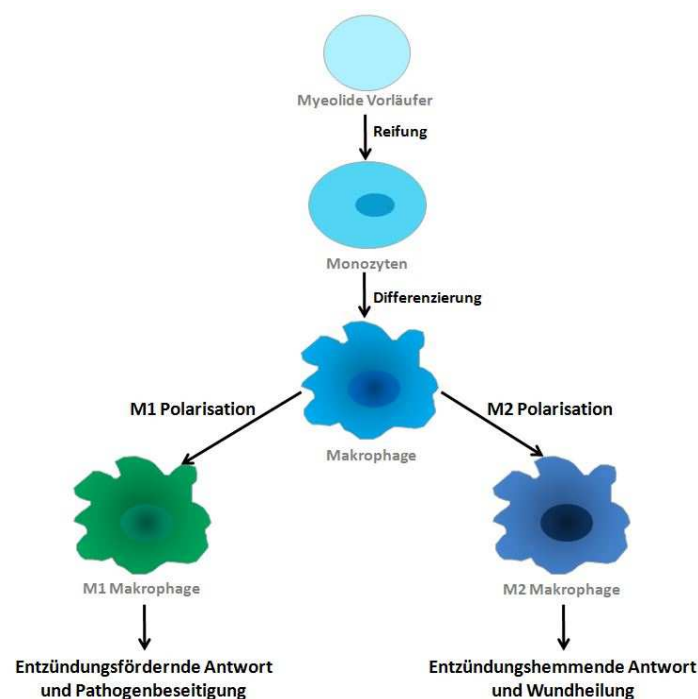
Obwohl STAT1/STAT2 die bedeutendsten Mediatoren des Typ I IFN-Signals sind, konnte auch eine Phosphorylierung weiterer STATs beobachtet werden. So führt die Aktivierung von STAT3/4/5/6 zur Transkription weiterer regulatorischer Sequenzen, wie den GAS ("IFN- $\gamma$ -activated sites"). Das Interessante dabei ist, dass durch die Aktivierung verschiedener STATs entgegengesetzt wirkende Effekte hervorgerufen werden: Während STAT3 das Zellwachstum stimuliert, inhibiert es STAT1 (Aaronson & Horvath, 2002; Darnell, 1997). Weitere alternative Signalwege, die durch IFNAR angeschaltet werden, erklären die diversen Effekte des Typ I Interferons. So ist der, durch IFN aktivierte, PI3K-("Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase") Signalweg an der Zellteilung und -proliferation beteiligt. NF- $\kappa$ B, ebenfalls aktiviert durch IFN, reguliert Überlebenssignale und ist in der Antigenpräsentation involviert. Der MAPK-ERK-("extracellular-signal regulated kinases") Signalweg reguliert ebenfalls das Zellwachstum und die Differenzierung der Zelle nach einem IFN-Signal (Du et al., 2007; Plataniias, 2005).

## 1.7 Makrophagen

### 1.7.1 Ursprung und Funktion

Die Makrophagen (altgriechisch: *makrós* für „groß“ und *phagein* für „essen“) zählen zu den Leukozyten und sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Stimuliert, aktiviert und rekrutiert werden Makrophagen hauptsächlich über die Mediatoren der Immunreaktion, die Zytokine (Canton, Neculai, & Grinstein, 2013; Gordon & Taylor, 2005; Mosser & Edwards, 2008).

Makrophagen entwickeln sich aus myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks, die in das Blut einwandern. Dort entwickeln sie sich weiter zu zirkulierenden Monozyten. Diese migrieren als Antwort auf eine Entzündung, aber auch entzündungsunabhängig, aus dem Blutstrom in verschiedene Gewebetypen, wo sie in gewebespezifische Makrophagen ausdifferenzieren (Gordon & Taylor, 2005; Stefater, Ren, Lang, & Duffield, 2011).



**Abb. 5: Reifung, Differenzierung und Polarisation von Makrophagen.** Modifiziert nach (Canton et al., 2013).

Makrophagen halten die Homöostase aufrecht, indem sie apoptotische bzw. nekrotische Zellen sowie Zelltrümmer, die bei der Gewebeerneuerung oder bei Entzündungsreaktionen entstehen, beseitigen. Die Hauptaufgabe der Makrophagen besteht allerdings in der Phagozytose von Pathogenen und der damit verbundenen Modulation des adaptiven Immunsystems durch die Aufnahme und Präsentation von Antigenen (Mosser & Edwards, 2008).

### 1.7.2 Differenzierung und Polarisation in M1/M2 Makrophagen

Eine hohe Diversität und Plastizität sind die Markenzeichen der Makrophagen. Diese Immunzellen können auf endogene Stimuli mit der Änderung ihrer Physiologie und der Polarisierung in verschiedene Phänotypen reagieren (Mosser & Edwards, 2008; O'Shea & Paul, 2010). Die Klassifikation in klassisch aktivierte M1 und alternativ aktivierte M2 Makrophagen repräsentiert dabei zwei extreme Seiten der Dynamik der Makrophagenaktivierung.

Während mikrobielle Produkte wie LPS oder entzündungsfördernde Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  eine Polarisierung in Richtung M1 Makrophagen anstoßen, kommt es zu einer Differenzierung zu M2 Makrophagen durch TLR-("Toll like receptor") Liganden, IL-4, IL-10, IL-13 sowie GM-CSF (Sica et al., 2008; Verreck et al., 2004).

Aktiviert M1 Makrophagen schütten große Menge an entzündungsfördernden Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 oder CXCL5 aus; ebenso produzieren sie Stickstoffoxide (NO, "nitric oxide") und reaktive Sauerstoffzwischenprodukte (ROI, "reactive oxygen intermediates") und stoßen die Typ I Interferon Immunantwort an (Sica et al., 2008; Sica & Mantovani, 2012). Im Gegensatz dazu generieren M2 Makrophagen entzündungshemmende Zytokine, wie IL-10 (Mosser, 2003), um Entzündungsreaktionen zu verringern und entgegenzuwirken.

Durch eine stark ausgeprägte Antigen-Präsentation nach Phagozytose von Pathogenen begünstigen M1 Makrophagen die Typ1-T-Helferzellen-(Th1) vermittelte Immunantwort und wirken auch dadurch immunstimulierend; des Weiteren haben M1 Makrophagen antimikrobielle sowie tumorsuppressive Wirkung. M2 Makrophagen dagegen aktivieren die adaptive Typ2-T-Helferzellen-(Th2) Immunantwort. Diese Makrophagen haben eine reinigende Funktion durch Phagozytose geschädigter Zellen und von Zelltrümmern. Darüber hinaus unterstützen M2 Makrophagen die Angiogenese und tragen zur Gewebereparatur sowie -erneuerung nach Entzündungen bei (Gordon & Taylor, 2005; Mantovani, Germano, Marchesi, Locatelli, & Biswas, 2011; Sica et al., 2008).

Zu erwähnen ist dabei noch, dass der Prozess der M1/M2-Polarisation der Makrophagen hoch plastisch ist und der Phänotyp der polarisierten Makrophagen unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen auch wieder umgekehrt werden kann (Guiducci, Vicari, Sangaletti, Trinchieri, & Colombo, 2005; Saccani et al., 2006).

Erste Studien haben während der Pankreatitis eine Polarisierung der vorhandenen Makrophagen in klassisch aktivierte M1 Makrophagen gezeigt (Folias et al., 2014). Genauere Untersuchungen zur Klassifikation von Makrophagen im Verlauf der Entzündung und Regeneration des Pankreas gibt es bisher jedoch noch nicht.

### 1.8 Clodronat basierte Depletion von Makrophagen

Um den Einfluss von Makrophagen auf den Entzündungs- sowie Regenerationsprozess analysieren zu können, gibt es die Möglichkeit, diese Immunzellen durch Verwendung von Clodronat gefüllten Liposomen zu eliminieren. Bei Clodronat handelt es sich um ein Biphosphat, das in größeren Mengen eine toxische Wirkung auf Makrophagen aufweist. Eine spezifische Wirkung auf Makrophagen wird hierbei durch die Einkapselung des Wirkstoffes in Liposomen erzielt. Die mit Clodronat gefüllten Liposome werden speziell von Makrophagen phagozytiert und aufgelöst, wodurch es zur Ausschüttung des Wirkstoffes innerhalb der Makrophagen kommt. Wird dabei die toxische Schwelle überschritten, führt dies zur Apoptose der Makrophagen. Freies Clodronat, beispielsweise ausgeschieden von sterbenden Makrophagen, weist eine sehr kurze Halbwertszeit auf und hat dadurch keine Wechselwirkungen mit anderen Zelltypen (Buiting, Zhou, Bakker, van Rooijen, & Huang, 1996; Monkkonen, van Rooijen, & Ylitalo, 1991; van Rooijen & van Nieuwmegen, 1984).

### 1.9 Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, den Einfluss des Typ I Interferon-Signalwegs im Verlauf der murinen Pankreatitis und der darauf folgenden Regeneration zu analysieren. Hierzu wurde die neuartige Mauslinie  $p48^{Cre/+}; Ifnar^{fl/fl}$  ( $Ifnar^{fl/fl}$ ) generiert; diese Mauslinie trägt einen "knockout" des Typ I Interferonrezeptors, genauer der Untereinheit 1 dieses Rezeptors. Dies führt zu einer Unterbrechung der Weiterleitung des Interferonsignalwegs spezifisch in den Azinuszellen des Pankreas. Um Folgen des "knockout" in der gesunden Maus ausschließen zu können, sollten zunächst  $Ifnar^{fl/fl}$  mit C57-Bl6/J (WT) Mäusen im unbehandelten Zustand verglichen werden (Punkt 3.1). Darüber hinaus sollte durch die gezielte Induktion einer Pankreatitis durch Caerulein die Auswirkungen der Unterbrechung des Interferonsignalwegs während der Entzündungs- und Regenerationsphase im Mausmodell betrachtet werden. Dazu sollte neben der Histologie der Tiere auch die Proliferation, die Zellschädigung sowie die Immunantwort der  $Ifnar^{fl/fl}$  und der WT Mäuse analysiert und verglichen werden (Punkt 3.2-3.6). Des Weiteren sollte betrachtet werden, ob die Unterbrechung des Interferonsignalwegs Auswirkungen auf die Tumorprogression im  $p48^{Cre/+}; Kras^{G12D}$ -Mausmodell aufweist. Dazu sollten wiederum zunächst die unbehandelten  $p48^{Cre/+}; Kras^{G12D}$  (Kras) und  $p48^{Cre/+}; Kras^{G12D}; Ifnar^{fl/fl}$  (Kras;  $Ifnar^{fl/fl}$ ) Mäuse miteinander verglichen werden (Punkt 3.7). Und im Anschluss daran sollte die Gewebeveränderung und Immunantwort in Caerulein-behandelten Kras und Kras;  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen analysiert werden (Punkt 3.8).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die in den folgenden Kapiteln gelisteten Materialien wurden entweder von der Apotheke des Klinikum rechts der Isar in München oder von den jeweilig genannten Herstellern bezogen. Die standardmäßig im Pankreaslabor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik verwendeten Lösungen wurden eigens angesetzt.

#### 2.1.1 Chemikalien

Tab. 2: Chemikalien

Substanz	Hersteller
AEC + High Sensitivity Substrate-Chromogen	Dako, Hamburg
Agarose Broad Range Roti@garose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamid, 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Alcian Blue 8GX powder	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Avidin/Biotin Blocking Kit SP-2001	Vector Laboratories, Burlingame, Californien, USA
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Braun H <sub>2</sub> O	Braun Melsungen AG, Melsungen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau, Na-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA, bovine serume albumine	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Citronensäure (Monohydrat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete Mini EDTA-free: protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
DAB (Liquid DAB +Substrate Chromogen System)	Dako, Hamburg
DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
6xDNA-Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Eosin Y	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol, 100%, 90%, 70%, 50%	Apotheke Klinikum r. d. Isar
Ethidiumbromidlösung, 1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum, 10%	Sigma-Aldrich, Steinheim

## Material und Methoden

Formaldehyd, 37%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Formamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck-Millipore, Darmstadt Apotheke Klinikum r. d. Isar
Isofluran	CP Pharma, Burgdorf
Jumpstart™ REDTaq, Ready PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, Steinheim
Light Cycler® 480 SYBR-Green/ Master	Roche, Basel, Schweiz
1xLysis/Binding/Wash Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natronlauge	Apotheke Klinikum r. d. Isar
Nuclear Fast Red H-3403	Vector Laboratories, Burlingame, Californien, USA
Page Ruler Prestained Protein ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PBS Dulbecco Instamed	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin, 1%	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PFA (Paraformaldehyd)	Apotheke Klinikum r. d. Isar
PhosStop: Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel, Schweiz
Proteinase K	Dako, Hamburg
Quick Load Purple 2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
Retrivagen A	BD Diagnostic Systems, Heidelberg
Roticlear®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfate (SDS) Polyacrylamide	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Super Signal® West Femto	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Temed	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trizma®base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizol®Reagent	Life Technologies, Carlsbad
Tween20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Vecta Mount	Vector Laboratories, Burlingame, Californien, USA
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

## 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
LightCycler ® 480 Multiwell Plate 96	Roche, Basel, Schweiz
LightCycler ® 480 Sealing Foil	Roche, Basel, Schweiz
Plastikware	greiner-bio-one, Frickenhausen Starlabgroup, Hamburg Eppendorf, Hamburg Biozym Scientific GmbH, Oldendorf Sarsted, Nümbrecht Simpart, Bernard Pillon, Canada
Röntgenfilm	GE Healthcare, München
Whatman Membran	GE Healthcare, München
Objektträger	Th Greyer Gruppe, Renningen
Dispenser-Kugeln	Quagen, Hilden
Parafilm M	American National CanTM, Chicago USA

## 2.1.3 Geräte

Tab. 4: Geräte

Geräte	Hersteller
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Compact XS/S Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Biometra, Göttingen
Compact M Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Biometra, Göttingen
Einbettgerät Leica E61160	Leica Biosystems, Solms
Elektrophorese Biometra Power Pack	Biometra, Göttingen
Entwässerungsmaschine Leica Asp 200S	Leica Biosystems, Solms
GenoSmart gel documentation system	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Heraeus Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Multifuge 3SR+ Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kühlplatte COP30	Melite Medizintechnik, Burgdorf
LightCycler®480	Roche, Basel, Schweiz
Mikroskop Axio Imager M2	Zeiss, Oberkochen
Mikrotom Leica RM 2255	Leica Biosystems, Solms
Mikrowelle HF37020	Siemens, München
Nano Drop 2000 Spektralphotometer	peqlab, Erlangen Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Röntgenfilmgerät: Optimax	Protec, Oberstenfeld

## Material und Methoden

pH-Electrode SenTix® 41	WTW, Weilheim
Plattformschüttler Titramax100	Heidolph, Schwabach
Power Pack P25 Low Voltage Power Supply	Biometra, Göttingen
System VX 75 Autoklav	System GmbH, Wetzlar
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermo Scientific Multiskan Ex	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tissue Lyser LT	Qiagen, Hilden
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
VW Collection Doppio Thermal Cycler	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Waage 3702	Sartorius, Göttingen
Wasserbad GFL 1052	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Western Blot Kammer Mini-Protean Tetra Cell	Biorad, Hercules, Californien, USA

### 2.1.4 Standardlösungen und -puffer

Tab. 5: Standardlösungen und -puffer

Citratpuffer	21,0 g Citronensäure, 300 ml ddH <sub>2</sub> O, mit 5 M NaOH auf pH 6 einstellen, mit ddH <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 ml 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 180 ml Methanol
4 % PFA	80,0 g Paraformaldehyd, 9,55 g PBS Pulver, 700 ml ddH <sub>2</sub> O, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, auffüllen auf 1 l ddH <sub>2</sub> O	10 x PBS	9,88 g PBS Salz, 1 l ddH <sub>2</sub> O
20 x TBE Puffer	484,4 g Tris Base, 0,48 g EDTA, 220,1 g Borsäure, 2 l Braun H <sub>2</sub> O	10 x TBS	12,1 g Tris Base, 85,0 g NaCl, 700 ml ddH <sub>2</sub> O, mit 5 M HCL auf pH 7,4 einstellen, auffüllen auf 1 l ddH <sub>2</sub> O
0,005 % TBST		0,5 % Triton X in TBS	



## Material und Methoden

100 ml 10 xTBS, 900 ml ddH <sub>2</sub> O, 50 µl Tween 20		2,5 ml Triton X, 300 ml TBS
---	--	--------------------------------

### 2.1.5 Zellkulturmedien

Tab. 6: Zellkulturmedien

Medium	Hersteller
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Steriles PBS	PAA, Cölbe

### 2.1.6 Kommerzielle Kits und Marker

Tab. 7: Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthase Kit	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
miRNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse IL-6 (TNF-alpha; IL-1b) Enhanced Sensitivity Flex Set	BD Diagnostic Systems, Heidelberg

Tab. 8: Marker

Marker	Hersteller
Gene Ruler 100 kb DNA Ladder	Fermentas, St.- Leon-Rot
Gene Ruler 1 kB DNA Ladder	Fermentas, St.- Leon-Rot
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

### 2.1.7 Oligonukleotide

Tab. 9: Oligonukleotidsequenzen für die qRT PCR

Oligonukleotide	Sequenz (5'→3')
Interleukin-1α	CGCTTGAGTCGGCAAAGAAAT TGGCAGAACTGTAGTCTTCGT
Interleukin-1β	GACCCCAAAGATGAAGGGCT TGATGTGCTGCTGCGAGATT

## Material und Methoden

Interleukin-6	TCCTCTCTGCAAGAGACTTCCATCC CCTCTGTGAAGTCTCCTCTCCGG
Interleukin-10	GGCCCAGAAATCAAGGAGCA AGGGGAGAAATCGATGACAGC
Interleukin-13	TTGCTTGCCTTGGTGGTCTC GGGGAGTCTGGTCTTGTGTG
Interferon- $\alpha$	CCTGACCCAGGAAGATGCCCTGCTGG AGCACATTGGCAGAGGAAGACAGGGCT
Interferon- $\gamma$	ACAGGTCCAGCGCCAAGCAT TCCCCACCCCGAATCAGCAG
Tumor necrosis factor- $\alpha$	TCGGGGTGATCGGTCCCCAA TGGTTTGCTACGACGTGGGCT
Transforming growth factor- $\beta$ 1	GGTGGACCGCAACAACGCCAT GGGTTCCGGGCACTGCTTCCC
Transforming growth factor- $\beta$ 2	GAAGGCAAGCCGGAGGGCAG TGGGCGGGATGGCATTTCGG
Transforming growth factor- $\beta$ 3	GGGACTGGCGGAGCACAATGA ACCCGGA ACTCTGCCCGGAA
Lipopolysaccharid binding protein	TCCAGACTCTGCCAGTCACA GCAACTGGAGAGCGGTGATT
Macrophage colony-stimulation factor	CTCTAGCCGAGGCCATGTG GCTCCTCCACTTCCACTTGT
Granulocyte colony-stimulation factor	CAGGGTCTACGGGGCAATTT ACAGTCCGTTTCCGGAGTTG
Chemokine (C-C-motif) ligand 1	TTGGCTCCACCAGACATTCG GTAAGCATGCTCTTGCTGTCAA
Chemokine (C-C-motif) ligand 2	AGCTGTAGTTTTTGTCAACAAGC GACCTTAGGGCAGATGCAGT
Chemokine (C-C-motif) ligand 4	TCTGTGCAAACCTAACCCCG GAGGGTCAGAGCCCATTGGT
Chemokine (C-C-motif) ligand 5	GACAGCACATGCATCTCCCA GTGTCCGAGCCATATGGTGA
Chemokine (C-C-motif) ligand 24	CAAGGCAGGGGTCATCTTCA TTGGCCCCTTTAGAAGGCTG
Chemokine (C-C-motif) ligand 25	ATGCCCAAGGTGCCTTTGAA GCTTCCACTCACTTCTGCT
Chemokine (C-X-C-motif) ligand 9	TCGGACTTCACTCCAACACAG AGGGTTCCTCGAACTCCACA
Interferon (alpha beta) receptor 1	TGTATAAGCACACAGTGGCA GCAGACGCAATGTAGTCCCA
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	GGAGCGCAATATGAAGGTGC CTTATCGTTGGCCACGGAGG

## 2.1.8 Antikörper und Antiseren

Tab. 10: Erstantikörper

Erstantikörper	Herkunft	Konzentration	Methode	Hersteller
α-Amylase	Kaninchen	1:5000	IHC	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
BrdU	Ratte	1:500	IHC	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
B220 (MAB1217)	Ratte	1:500	IHC	BD, Franklin Lakes, Heidelberg
CD3 (ab16669)	Kaninchen	1:100	IHC	abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
CD11b PE Clone M1/70	Ratte	1 µl/ 1x10 <sup>6</sup> Zellen	FACS	eBioscience, San Diego, USA
CD206 FITC Clone C068C2	Ratte	1 µl/ 1x10 <sup>6</sup> Zellen	FACS	BioLegend, San Diego, USA
CD45 (550539)	Ratte	1:10	IHC	BD, Franklin Lakes, Heidelberg
F4/80 [BM8] (ab16911)	Ratte	1:160	IHC	abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
F4/80 Alexa Fluor® 647 Clone BM8	Ratte	1 µl/ 1x10 <sup>6</sup> Zellen	FACS	eBioscience, San Diego, USA
Ly6C PE Cyanine7 Clone HK1.4	Ratte	1 µl/ 1x10 <sup>6</sup> Zellen	FACS	eBioscience, San Diego, USA
Myeloperoxidase (289A-78)	Kaninchen	Ready-to-use	IHC	CellMarque Corporation, California
MCP1 (ab25124)	Kaninchen	1:100	IHC	abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
NFκB	Kaninchen	1:100	IHC	NeoMarkers, Fremont, Kanada
p53 (NCL-p53-CM5p)	Kaninchen	1:1000	IHC	Leica Biosystems, Solms

## Material und Methoden

Tab. 11: Zweitantikörper

Zweitantikörper	Herkunft	Konzentration	Methode	Hersteller
EnVision + System- HRP Labelled Polymer Anti- Rabbit	Ziege	unverdünnt	IHC	Dako Deutschland, Hamburg
Polyclonal Rabbit Anti- Rat Immunoglobulins / HRP	Kaninchen	1:50	IHC	Dako Deutschland, Hamburg
Polyclonal Rabbit Anti- Goat Immunoglobulins / HRP	Kaninchen	1:50	IHC	Dako Deutschland, Hamburg
EnVision + System- HRP Labelled Polymer Anti- Mouse	Ziege	unverdünnt	IHC	Dako Deutschland, Hamburg

### 2.1.9 Substanzen für Tierversuche

Tab. 12: Substanzen für Tierversuche

Substanz	Konzentration	Injektion	Hersteller
Caerulein	1,0 mg/kg KG	intraperitoneal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Buprenodale	0,1 mg/kg Kg	subkutan	Dechra, Albrecht GmbH, Aulendorf
Clodronat-Liposome	0,5 mg/kg KG	intraperitoneal	ClorionateLiposomes.org, Amsterdam, The Netherlands
PBS-Liposome	0,5 mg/kg KG	intraperitoneal	ClorionateLiposomes.org, Amsterdam, The Netherlands

#### 2.1.10 Versuchstiere

Alle angegebenen Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durch den Bescheid mit dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2532-116-2013 genehmigt. Die Versuchstiere wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich des Zentrums für präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten.

## Material und Methoden

Tab. 13: Mauslinien mit Hintergrund, Herkunft und Eigenschaften

Mausstamm	Hintergrund	Herkunft	Eigenschaften
WT	C57-BI6/J	Charles Rivers, Willmington, USA Janvier Labs, Saint Berthevin Cedex, Frankreich	Wildtyp
p48 <sup>Cre/+</sup> ; Ifnar <sup>fl/fl</sup>	C57-BI6/J	Zentrum für präklinische Forschung, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Deutschland	defizient im Interferon $\alpha/\beta$ -1 Rezeptor; spezifisch in den Azinuszellen des Pankreas
p48 <sup>Cre/+</sup> ; Kras <sup>G12D</sup>	C57-BI6/J	The Jackson Laboratory, Maine, USA	Punktmutation in einem Allel des <i>Kras2</i> - ( <i>KrasG12D</i> ) Gens
p48 <sup>Cre/+</sup> ; Kras <sup>G12D</sup> ; Ifnar <sup>fl/fl</sup>	C57-BI6/J	Zentrum für präklinische Forschung, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Deutschland	Kombination aus pankreasspezifischer Interferon $\alpha/\beta$ -1 Rezeptor Defizienz und Punktmutation des <i>Kras2</i> - Gens

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Arbeiten mit Nukleinsäure

##### 2.2.1.1.1 Desoxyribonukleinsäure

Desoxyribonukleinsäure- („deoxyribonucleic acid“; DNA) Lösungen wurden bei 4 °C aufbewahrt. Arbeiten mit DNA-Molekülen sollten nach Möglichkeit immer auf Eis durchgeführt werden. Zur Kontrolle der Reinheit von DANN-Lösungen wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient der beiden Werte ( $A_{260}/A_{280}$ ) sollte dabei  $\geq 1,70$  betragen.

##### 2.2.1.1.2 Ribonukleinsäure

Bei Arbeiten mit Ribonukleinsäure- („ribonucleic acid“; RNA) Lösungen besteht die Gefahr von enzymatischem Abbau durch RNasen. Daher wurden nur RNase-freie Lösungen (DEPC-behandelt), Verbrauchsmaterialien und Geräte verwendet und es wurde darauf geachtet, möglichst alle Arbeitsschritte auf Eis durchzuführen. Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei -20 °C, die langfristige Lagerung, ab 24- 48 h, bei -80 °C.

##### 2.2.1.1.3 Konzentrationsbestimmungen von DNA-/RNA-Lösungen

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde über die OD bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des Photometers NanoDrop® ND-1000 bestimmt.

Nach der Kalibrierung mit dem entsprechenden DNA/RNA-Puffer wurden 1,0 µl der DNA/RNA-Lösung zur Messung aufgetragen.

#### 2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“; PCR) ist ein enzymatisches Verfahren zur selektiven *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Fragmente aus einem DNA-Gemisch. Bei dem verwendeten Enzym handelt es sich um eine thermostabile *Taq*-Polymerase. Außerdem werden zur Synthese der neuen DNA-Moleküle alle vier Basen in Form von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten, sowie zwei einzelsträngige Oligonukleotidprimer (ein *Forward* und ein *Reverse* Primer) benötigt. Mit Hilfe von zwei flankierenden Primern kann ein gewünschtes Fragment von einer extrem geringen DNA-

## Material und Methoden

Menge in einem nachweisbaren Maßstab vermehrt werden. Die Amplifikation erfolgt dabei durch die zyklische Abfolge der drei Schritte Denaturierung, Kühlung (engl. „Annealing“) und Verlängerung (engl. „Elongation“), die in einem programmierbaren Thermocycler ablaufen. Die Denaturierung erfolgt bei 94 °C und bewirkt die Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge. Im zweiten Schritt wird die Temperatur abgesenkt, wodurch die Primer an den jeweiligen komplementären Einzelstrang hybridisieren können. Die Temperatur hierfür wird entsprechend des Schmelzpunktes der jeweiligen Primer gewählt. Beim letzten Schritt beträgt die Temperatur 72 °C. Bei dieser Temperatur synthetisiert die *Taq*-Polymerase den neuen Strang komplementär zur Matrize in 5' → 3'-Richtung.

Tab. 14: Verwendete PCR-Programme

<b>lfnar- Genotypisierung</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Wiederholungen</b>
Erste Denaturierung	94 °C	1 min	40x
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Kühlung	58 C	30 sec	
Verlängerung	72 °C	1 min	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	
<b>Primervalidierung</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Wiederholungen</b>
Erste Denaturierung	95 °C	5 min	40x
Denaturierung	95 °C	20 sec	
Kühlung	55 °C	20 sec	
Verlängerung	72 °C	20 sec	
Finale Verlängerung	72 °C	5 min	
Kühlung	10 °C	∞	

### 2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse von DNA-Lösungen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, bei der DNA-Moleküle in einem konstanten elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Aufgrund ihrer Phosphatgruppen sind DNA-Moleküle 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, wobei kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Gels gelangen und es zu einer Auftrennung nach Größe kommt.

## Material und Methoden

---

Zur analytischen Auftrennung der PCR-Ansätze wurden in dieser Arbeit 2,0 % (w/v) Agarosegele (Agarose in TBE) verwendet. Um die DNA später sichtbar zu machen, wurde in die DNA interkalierendes Ethidiumbromid (0,05 % (v/v)) zu der aufgekochten und kurz abgekühlten Agarose gegeben, und anschließend in eine horizontale Flachbettkammer gegossen. Die Taschen des vollständig erstarrten Gels wurden mit einem Referenzmarker und den vorbereiteten Proben beladen. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (TBE) bei einer Spannung zwischen 120 und 150 V durchgeführt. Das durch das Ethidiumbromid sichtbar gemachte Bandenmuster konnte durch einen Transilluminator mit einer Kamera dokumentiert werden.

### 2.2.2 Präparation von Gesamt-RNA

#### 2.2.2.1 Isolation von RNA aus Mausgewebeproben

Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden etwa 10- 30 mg große Gewebestücke in ein mit einer Dispenser-Kugel gefülltes, steriles Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von RLT-Puffer versetzt mit  $\beta$ -Mercaptoethanol wurde das Gewebe für 4 min bei einer Frequenz von 30/sec im „Tissue Lyser“ (QIAGEN) homogenisiert. Der Überstand wurde abgenommen und anschließend 1 Volumen 70 % Ethanol in DEPC H<sub>2</sub>O zugegeben, die Probe auf das Säulchen aufgetragen und abzentrifugiert (10.000 rpm, 30 sec). Nach zwei Waschschritten mit 700  $\mu$ l und 350  $\mu$ l RW1-Puffer folgten zwei weitere mit je 500  $\mu$ l RPE-Puffer. Nachdem die Säule 1 min trocken zentrifugiert wurde, konnte die RNA mit 30  $\mu$ l RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert werden.

#### 2.2.2.2 Agarosegelelektrophorese zur Prüfung der RNA-Qualität

Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese getestet. Dabei wurde ein denaturierendes Gel verwendet. Da RNA durch intramolekulare Basenpaarung komplexe Sekundärstrukturen erzeugt, müssen diese erst wieder aufgelöst werden, um eine Wanderung der RNA durch die Matrix gemäß ihrer Größe zu ermöglichen. Intakte RNA sollte dabei auf einem denaturierenden Gel deutliche 28S und 18S rRNA (ribosomale RNA) Banden erzeugen und die Intensität der 28S zur 18S Bande im Verhältnis 2:1 stehen. Bei degradiertem RNA erscheinen dagegen keine deutlich abgrenzbaren Banden. Zur analytischen Auftrennung der RNA wurden in dieser Arbeit 0,8 % (w/v) Agarosegele (Agarose in TBE) versetzt mit Formaldehyd verwendet. Dazu wurde die Agarose in TBE aufgekocht, auf 65 °C durch Schwenken abgekühlt und mit 1 ml 37 % Formaldehyd versetzt. Um die RNA später sichtbar machen zu können, wurde Ethidiumbromid (0,05 % (v/v)) zu der



## Material und Methoden

---

Agarose gegeben. Von der isolierten RNA wurde 1 µg mit 4 µl Formamid und 2 µl 6 x "loading dye" versetzt und mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt und anschließend für 10 min auf 60 °C erhitzt. Die Gelelektrophorese fand wie unter Punkt 2.2.1.3 beschrieben statt.

### 2.2.2.3 Reverse Transkription

Bei der Synthese von cDNA („complementary DNA“) wird die mRNA („messenger RNA“) durch das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Dabei wurden Oligo-dTs, welche an die PolyA-Schwänze der mRNA-Moleküle binden, verwendet.

Um eventuelle Sekundärstrukturen der mRNA aufzulösen, wurde 1 µg mRNA mit je 1 µl Oligo(dT)-Primer [0,5 µg/µl] in einem Gesamtvolumen von 12 µl für 5 min auf 68 °C erhitzt und dann kurz auf Eis wieder abgekühlt. Nach der Zugabe von 4 µl RT-Puffer (5x), 2 µl dNTP-Mix [10 mM], 1 µl Ribonuklease Inhibitor [40 U/µl] und 1 µl Reverse Transkriptase [200 U/µl] folgte die Umschreibung für 60 min bei 42 °C. Die Reaktion wurde durch 5 minütiges Erhitzen bei 70 °C abgestoppt. Die entstandene cDNA wurde 1:2,5 mit PCR-Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.4 Quantitative "Real-time PCR"

Die quantitative "Real-time PCR" (qRT PCR) nutzt spezielle Fluoreszenzfarbstoffe, um die Amplifikation von DNA von Zyklus zu Zyklus in Echtzeit zu verfolgen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, die amplifizierte DNA-Menge im Reaktionsansatz zu quantifizieren. In Kombination mit einer Reversen Transkription lässt sich diese Methode auch zur Quantifizierung von mRNA/cDNA verwenden. Dabei gibt es zwei verschiedene Strategien der mRNA-Quantifizierung: Zum einen kann mit Hilfe einer Kalibrierkurve die mRNA-Menge absolut quantifiziert werden. Zum anderen gibt es die Möglichkeit der relativen Quantifizierung, bei der die Genexpression eines Zielgens mit der eines oder mehrerer Referenzgene verglichen wird. Referenzgene kodieren für Proteine der grundlegenden Stoffwechselfvorgänge, die in jeder lebenden Zelle ablaufen (Pfaffl, Tichopad, Prgomet, & Neuvians, 2004). In dieser Arbeit wurde die letztere Methode angewandt. Dabei interkaliert der fluoreszierende Marker „SYBR Green“ in die synthetisierte DNA. Dadurch kommt ein Leuchtsignal zu Stande, über das die amplifizierte cDNA quantitativ gemessen werden kann. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 2 µl [15 ng/µl] cDNA, 6 µl ddH<sub>2</sub>O, jeweils 1 µl „forward“ und „reverse“ Primer [10 nm] sowie 10 µl Light Cycler 480 SYBR Green Mastermix eingesetzt. Die Reaktionszyklen umfassen die in Tab. 15 aufgeführten Schritte. Die qRT

## Material und Methoden

---

PCR wurde im LightCycler 480 II durchgeführt und mit dem Programm LightCycler® 480 SW 1.5 von Roche ausgewertet.

**Tab. 15: Verwendetes qRT PCR-Programm:**

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Erste Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	40x
Kühlung	55 °C	55 sec	
Verlängerung	68 °C	20 sec	
Kühlung	4 °C	∞	

Für die Quantifizierung wurde die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode nach Pfaffl verwendet. Dabei wird der Ct-Wert jedes Gens gemessen, der den Beginn der exponentiellen Phase während der qRT PCR beschreibt. Für die Auswertung der Analyse wird dabei zunächst die relative Genexpression ( $\Delta Ct$ ) im Vergleich zum Referenzgen ausgerechnet. Die Berechnung erfolgt über eine exponentielle Funktion, bei der der Ct-Mittelwert des zu betrachtenden Gens vom Ct-Mittelwert des Referenzgens subtrahiert wird. Danach wird über eine weitere exponentielle Funktion die normalisierte Genexpression ( $\Delta\Delta Ct$ ) im Vergleich zu den Kontrollproben berechnet. Dabei beschreibt ein Wert  $<1$  eine Hochregulation des analysierten Gens, während ein Wert  $>1$  eine Herunterregulation des Gens im Vergleich zu den ausgewählten Kontrollen bedeutet.

$$\Delta Ct = 2^{-(Ct(\text{Analysegen}) - Ct(\text{Referenzgen}))}$$

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-(\text{Probe } (Ct(\text{Analysegen}) - Ct(\text{Referenzgen}))) - \text{Kontrolle } (Ct(\text{Analysegen}) - Ct(\text{Referenzgen}))}$$

### 2.2.3 *In Vivo*-Methoden

#### 2.2.3.1 Umgang mit Versuchstieren

Die Versuchstiere wurden generell im Alter von acht Wochen und geschlechtsunabhängig in die Experimente aufgenommen. Als Kontroll- bzw. Vergleichstiere wurden C57-BI6/J Wildtypiere desselben Alters verwendet.

#### 2.2.3.2 Induktion einer Pankreatitis im Mausmodell

Die Induktion der Pankreatitis erfolgte über die intraperitoneale Injektion von Caerulein. Caerulein ist ein Analogon des Peptidhormons Cholecystokinin, welches im

## Material und Methoden

---

Gastrointestinaltrakt des Menschen die Fett- und Proteinverdauung sowie die Ausschüttung pankreasspezifischer Enzyme stimuliert. Die Injektion des Caeruleins führt zu einer verstärkten Ausschüttung dieser Verdauungsenzyme, was einen Selbstverdau des Organs und damit eine Pankreatitis nach sich zieht.

Für das Regenerationsmodell erfolgte die Injektion des Caerulein einmal stündlich, für acht Stunden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in einer Konzentration von 1,0 mg/kg KG pro Injektion. Gleichzeitig mit der jeweils ersten Caeruleininjektion wurde den Tieren das Schmerzmittel Buprenodale in einer Konzentration von 0,1 mg/kg KG subkutan verabreicht.

### **2.2.3.3 Depletion von Makrophagen**

Die Depletion der Makrophagen erfolgte durch Gabe von Clodronat gefüllten Liposomen. Bei Clodronat handelt es sich um ein Biphosphat, das in größeren Mengen eine toxische Wirkung auf Makrophagen aufweist (siehe Punkt 1.8). Die Liposome wurden den Tieren intraperitoneal einmal täglich alle zwei Tage in einer Konzentration von 5,0 mg/kg KG injiziert; beginnend vier Tage vor der Induktion der Pankreatitis bis zum Ende der einzelnen Experimente.

### **2.2.3.4 Pankreasresektion**

Für die Entnahme des Pankreas und weiterer Organe wurden die Tiere zunächst in einer luftdichten Kammer mit dem Anästhetikum „Isofluran“ betäubt und zur Tötung der Tiere eine zervikale Dislokation (Genickbruch) durchgeführt. Nach Besprühung mit Alkohol wurden die Mäuse fachgerecht durch einen Schnitt durch Fell und Bauchdecke geöffnet und zügig die Organe entnommen. Aus WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen wurden neben dem Pankreas noch die Milz sowie die Leber entfernt; aus  $Kras$  und  $Kras; lfnar^{fl/fl}$  Mäusen wurden zusätzlich Niere und Lunge entnommen. Die Proben wurden nach Entnahme in 4 % PFA/PBS fixiert, Teile davon in -80 °C eingefroren oder zur Isolation von Zellen oder mRNA weiter verarbeitet. Zur Gewinnung von Blutserum wurde direkt nach Tötung der Tiere Blut aus der Bauchvene abgenommen.

### **2.2.3.5 Paraffineinbettung von immersionsfixierten Pankreasgewebe**

Nach der Resektion wurde das gewonnene Pankreasgewebe in 4 % PFA/PBS für 24 h bei 4 °C fixiert und bis zur Entwässerung in 70 % Ethanol gelagert. Anschließend wurden die Proben entwässert und in Paraffin eingebettet. Zur Anfertigung von Gewebeschnitten wurden

die Paraffinblöcke auf -20 °C gekühlt, danach Mikrotomschnitte von 2,5 µm Dicke gefertigt und auf Objektträgern fixiert.

### 2.2.4 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.4.1 Isolation primärer Azinuszellen aus dem adulten Pankreas

##### 2.2.4.1.1 Enzymatische Isolation azinärer Zellen aus dem Pankreas

Nach Entnahme des Pankreas wurde dieses zunächst in eiskaltem 1 x PBS gewaschen und anschließend in 5 ml RPMI-1640 Medium mit 0,1 % BSA und 1,2 mg/ml Collagenase TypVIII in eine 6 cm Petrischale überführt. Mit einer feinen Insulinspritze wurde etwa 1 ml Collagenaselösung injiziert und das Gewebe mit der Spritze durchlöchert. Danach wurde das Pankreas mit zwei Skalpellens in 1 mm große Stücke zerschnitten und für 10 min bei 37 °C verdaut. Durch Zugabe von 5 ml RPMI Medium mit 0,1 % BSA und 5% FCS wurde der Verdau gestoppt. Um die Azini von leichteren Fibroblasten und andern Schwebstoffen zu trennen folgte ein Zentrifugationsschritt (1000 rpm, 5 min, RT). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet in dem Collagenasemedium gelöst und für weitere 10 min bei 37 °C verdaut. Die wie oben beschrieben abgestoppte Lösung wurde mit einer 10 ml Pipette mehrere Male auf- und abpipettiert, um die azinären Zellen nochmals mechanisch voneinander zu trennen. Um noch verbliebene Bindegewebsreste zu entfernen und die Zellen weiter zu vereinzeln, wurde die Lösung auf ein Sieb mit 100 µm Porengröße gegeben und mit weiteren 5 ml RPMI Medium nachgespült. Die gefilterte Lösung wurde anschließend abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet ein weiteres Mal mit 10 ml RPMI Medium gewaschen.

##### 2.2.4.1.2 Mechanische Isolation azinärer Zellen aus dem Pankreas

Neben der enzymatischen wurde auch eine mechanische Isolation von azinären Zellen aus dem Pankreasgewebe durchgeführt. Da diese Methode schonender zu den Oberflächenmarkern der Zelle ist, wurde diese vor allem für anschließende FACS-Analysen verwendet. Dazu wurde ebenfalls das Pankreas, wie unter Punkt 2.2.3.4 beschrieben, entnommen, in kaltes 1 x PBS überführt und darin gewaschen. Anschließend wurde das Organ in RPMI Medium mit 0,1 % BSA und 5 % FCS gegeben. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgte dann durch die Zerreibung zwischen zwei Objektträgern, bis eine homogene Lösung entstand. Diese wurde dann mit einer 10 ml Pipette mehrere Male auf- und abpipettiert, um die Zellen noch weiter zu vereinzeln. Diese Lösung wurde danach

## Material und Methoden

---

zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen, das Pellet in RPMI Medium gelöst, auf ein Sieb mit 100 µm Porengröße gegeben und mit weiteren 5 ml PRMI Medium nachgespült. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet nochmals in 10 ml Medium gewaschen.

### **2.2.4.2 Isolation von Immunzellen aus dem adulten Pankreas**

#### **2.2.4.2.1 Enzymatische Isolation vom Immunzellen aus dem Pankreas**

Neben Azniuszellen wurden auch Immunzellen für weitere Analysen aus dem Pankreasgewebe isoliert. Die enzymatische Isolation von Immunzellen erfolgte dabei nach demselben Verfahren wie unter Punkt 2.2.4.1.1 dargestellt, mit den im Folgenden beschriebenen Abweichungen. Während die Inkubation des Gewebeverdaus bei der Isolation der Azini in einer 6 cm Petrischale stehend im Inkubationsschrank durchgeführt wurde, erfolgte dieser Arbeitsschritt bei der Isolation der Immunzellen in einem 50 ml Falconröhrchen unter Schütteln in einem 37 °C warmen Wasserbad. Des Weiteren wurden die Zellen durch ein Sieb mit einer Porengröße von nur 70 µm gespült. Die einzelnen Zentrifugationsschritte erfolgten hier bei nur 750 rpm, anstatt der oben beschriebenen 1000 rpm.

#### **2.2.4.2.2 Mechanische Isolation von Immunzellen aus dem Pankreas**

Zur Erhaltung der Oberflächenmarker wurden Immunzellen nicht nur enzymatisch, sondern auch mechanisch isoliert. Die mechanische Isolation erfolgte wie unter Punkt 2.2.4.1.2 dargestellt, mit den im Folgenden beschriebenen Abweichungen. Das Filtern der Zellen erfolgte durch ein Sieb mit nur 70 µm Porengröße und ohne weiteres Durchdrücken der Zellen. Ebenso wurden die Zellen hier nicht bei 1000 rpm zentrifugiert, sondern nur bei 750 rpm.

### **2.2.5 Immunbiologische Methoden**

#### **2.2.5.1 Gewebefärbungen**

In der Histologie gibt es verschiedene Färbeverfahren, die zur Analyse von Gewebeschnitten dienen. Dabei kann man zwischen Übersichtsfärbungen, wie der Hämatoxilin/Eosin-(H/E) Färbung und spezifischen Färbungen, wie der immunhistochemischen Färbung oder der „Alcian Blue“-Färbung, unterscheiden. Die H/E-Färbung dient dabei der Unterscheidung

## Material und Methoden

---

verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild für morphologische Untersuchungen. Mittels immunhistochemischen Färbungen können Proteine spezifisch sichtbar gemacht werden. Dadurch kann zum einen bestimmt werden, ob ein Protein in dem zu untersuchenden Gewebe vorhanden ist und darüber hinaus, an welcher Stelle des Gewebeverbands oder in welchem Zellkompartiment das Protein exprimiert wird. Die „Alcian Blue“-Färbung dient auf Grund ihrer Färbeeigenschaften zur Unterscheidung zwischen Metaplasien und Neoplasien und spielt damit eine wichtige Rolle in onkologischen Analysen.

### **2.2.5.1.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung**

Für erste morphologische Analysen der Feinstruktur des fixierten Gewebes wurde die aus zwei Einzelfärbungen bestehende Hämatoxylin/Eosin-Färbung durchgeführt. Dabei erfolgt zunächst die Färbung basophiler Strukturen, wie des Zellkerns mit der darin enthaltenen DNA oder der Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums, mit dem natürlichen Farbstoff Hämatoxylin in blau. Die anschließende Behandlung des Gewebes mit dem synthetischen Farbstoff Eosin färbt alle acidophilen bzw. eosinophilen Strukturen, wie Zellplasmae, Kollagen, Kreatin oder Mitochondrien, in rot.

Zu Beginn der Färbung wurde zunächst die Deparaffinierung des nach Punkt 2.2.3.5 auf Objektträgern fixierten Gewebes durch 3 x 10 min Inkubation in dem organischen Lösungsmittel Roticlear durchgeführt. Die Rehydratation des Gewebes erfolgte in einer absteigenden Ethanolreihe; dafür wurden die Schnitte jeweils für 2 min in 3 x 100 % Ethanol, 1 x in 96 %, 70 % und 50 % Ethanol bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte für 30 sec mit Hämalaun gefärbt und unter fließendem Leitungswasser für etwa 10 min gebläut und überschüssiges Hämalaun abgewaschen. Für die anschließende Eosin-Färbung wurden die Objektträger zunächst kurz in destilliertem Wasser geschwenkt und dann für 2- 3 sec in Eosin getaucht. Durch kurzes Schwenken in destilliertem Wasser wurde überschüssiges Eosin entfernt. Die abschließende Dehydratation wurde durch eine Inkubation für 3 sec in 70% Ethanol, 30 sec in 96% Ethanol, 3 x 2 min in 100% Ethanol und anschließend in Roticlear für 3 x 5 min durchgeführt. Eingedeckt wurden die gefärbten Schnitte mit Vectashield Eindeckmedium.

### **2.2.5.1.2 Immunhistochemie**

Bei der Immunhistochemie können Proteine in Gewebeschnitten mittels Antikörper-Antigen-Reaktion sichtbar gemacht werden. Dabei bindet in einem ersten Schritt ein spezifischer Erstantikörper an das Epitop. In dem darauffolgenden Schritt kommt es zu einer spezifischen

## Material und Methoden

---

Bindung zwischen dem Erstantikörper und einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper. Die Enzym-Substrat-Bindung löst eine Reaktion aus, wodurch ein sichtbarer Farbstoff generiert wird. In der hier beschriebenen Immunhistochemie dient als Enzym eine Peroxidase, welche durch eine Wasserstoffperoxidreaktion ein Chromogen (hier: DAB = 3,3'-Diaminobenzidin) durch Oxidation in einen braunen Farbstoff umsetzt.

Die Rehydratation des Gewebes erfolgte wie bereits unter Punkt 2.2.5.1.1 beschrieben. Für die Antikörperdemaskierung wurden die Schnitte in einer Mikrowelle für 10 min bei 100 °C in Citratpuffer (pH 6.0) aufgekocht und anschließend für etwa 20 min abgekühlt. Das Waschen der Schnitte erfolgte jeweils für 5 min in 1 x TBST. Für die bei Kernfärbungen nötige Permeabilisierung der Membran wurden die Schnitte anschließend für 5 min in 0,1 % Triton X-100 / 1 x PBS inkubiert und danach wiederum gewaschen. Um die endogene Peroxidaseaktivität zu minimieren und somit unspezifische Hintergrundfärbungen zu reduzieren wurden die Schnitte in 3 % Wasserstoffperoxid / Methanol für 5 min inkubiert und wiederum gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden für 1 h mit 3 % BSA / TBS blockiert. Alle bisher aufgelisteten Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Inkubation des ersten Antikörpers in der antikörperspezifischen Verdünnung (siehe Tab. 10) wurde über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer durchgeführt, um das Austrocknen der Schnitte zu vermeiden.

Am darauf folgenden Tag wurde zunächst der Erstantikörper für 3 x 10 min mit TBST abgewaschen und der Zweitantikörper in seiner spezifischen Verdünnung (siehe Tab. 11) für 1 h bei RT auf die Schnitte gegeben. Nach dem nächsten Waschschrift erfolgte die Sichtbarmachung des Signals in der DAB-Reaktion. Dafür wurden die Schnitte unter dem Mikroskop mit jeweils 80 µl DAB-Reagenz inkubiert, bis sich eine spezifische Braunfärbung der gewünschten Strukturen beobachten lies. Diese Farbreaktion wurde durch die Inkubation der Schnitte in Leitungswasser abgestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte für 30 sec in Hämalaun. Das anschließende Bläuen sowie die Rehydratation und das Eindecken der Objektträger wurden wie unter Punkt 2.2.5.1.1 durchgeführt.

### **2.2.5.1.3 Immunhistochemie: abweichende Färbeprotokolle**

Einige der in dieser Arbeit benutzten Antikörper der Immunhistochemie konnten nicht mit dem oben beschriebenen Standardprotokoll verwendet werden. Im Folgenden sind die betroffenen Antikörper mit den jeweiligen Änderungen aufgelistet.

### **2.2.5.1.3.1 Immunzellfärbung mit dem Antikörper CD45**

Bei der allgemeinen Immunzellfärbung mit dem Antikörper CD45 wurde die absteigende Ethanolreihe stark verkürzt; die Schnitte wurden nur 2 x für 2 min in 100 % Ethanol getaucht und anschließend direkt in destilliertes Wasser überführt. Danach erfolgte die Hydrogen Peroxidase für 10 min, bevor nach einem Waschschrift die Antikörperdemaskierung in Retievagen A-Lösung für 20 min bei 100 °C durchgeführt wurde.

### **2.2.5.1.3.2 Makrophagenfärbung mit dem Antikörper F4/80**

Bei der Färbung der Makrophagen mit dem Antikörper F4/80 wurde mit Proteinase K für 5 min bei RT demaskiert. Die Hydrogen Peroxidase wurde bei dieser Färbung für 10 min durchgeführt. Um unspezifische Bindestellen abzublocken wurden die Schnitte in 3 % BSA / Avidin / TBS geblockt und der Erstantikörper wurde in 3 % BSA / Biotin / TBS verdünnt.

### **2.2.5.1.3.3 Neutrophilenfärbung mit dem Antikörper Myeloperoxidase**

Für die Antikörperdemaskierung der Neutrophilenfärbung mit dem Myeloperoxidase-antikörper wurden die Schnitte für 30 min aufgekocht. Unspezifischen Bindestellen wurden für 30 min bei RT mit 3 % Ziegenserum / TBS geblockt. Nach der Inkubation des Erstantikörpers über Nacht bei RT erfolgte eine Weitere für 30 min bei 37 °C zur Intensivierung des Signals.

### **2.2.5.1.3.4 Färbung des Transkriptionsfaktors NF-κB**

Die Deparaffinierung des Gewebes wurde mit dem Lösungsmittel Xylol durchgeführt und die anschließende Rehydratation erfolgte durch kurzes Schwenken der Schnitte in 100 % Ethanol und einer darauffolgenden Inkubation in 100 % Ethanol für 5 min. Die absteigende Alkoholreihe wurde durch weitere Inkubationen in 96 % und 70 % EtOH für 5 min abgeschlossen, bevor die Schnitte in destilliertem Wasser gespült wurden. Für die Antigendemaskierung wurden die Objektträger für 20 min in Citratpuffer gekocht. Nach einer 20-minütigen Abkühlung wurden die Schnitte in 1 x PBS gewaschen und für 3 min mit 3 % Wasserstoffperoxid / Methanol benetzt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 x PBS wurde das Gewebe für 30 min bei RT mit dem verdünnten Erstantikörper inkubiert. Nach Abspülen des Erstantikörpers mit 1 x PBS folgte die 30-minütige Inkubation des Zweitantikörpers ebenfalls bei RT. Nach erneutem Abspülen der Antikörperlösung wurde das AEC-Substrat auf die Schnitte gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch die Überführung der Schnitte in Leitungswasser abgestoppt. Die Gegenfärbung



mit Hämalun erfolgte wie unter Punkt 2.2.5.1.1 beschrieben. Nach dem Bläuen der Schnitte wurden die Objektträger direkt mit einem wasserbasierten Eindeckmedium eingedeckt.

### **2.2.5.1.4 „Alcian Blue“-Färbung**

Zur Veranschaulichung von Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, den intraepithelialen Neoplasien (PanIN =“pancreatic intraepithelial neoplasia“) wurde die „Alcian Blue“-Färbung durchgeführt. Bei „Alcian Blue“ handelt es sich um eine polyvalente basische Färbelösung, die saure Polysaccharide, wie Glykosaminglykane im Knorpel oder Mukopolysaccharide muzinbildender Zellen anfärbt. Da PanINs in hohem Grade Muzine bilden, werden diese Zellen mittels „Alcian Blue“ spezifisch in einem satten Türkisblau bis Türkisviolett angefärbt. Zur Gegenfärbung des Gewebes wurde „Nuclear Fast Red“ verwendet, das Nukleinsäuren anfärbt. Dadurch erscheinen Zellkerne in einem kräftigen Pink bis Rot und das Zytoplasma in einem helleren Rosa.

Die Rehydratation der Gewebeschnitte erfolgte wie bereits unter Punkt 2.2.5.1.1 beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min bei RT in einer „Alcian Blue“-Lösung inkubiert und danach für 5 min in fließendem Leitungswasser gewaschen. Die folgende 5-minütige Inkubation in „Nuclear Fast Red“ wurde durch erneutes Waschen in fließendem Leitungswasser für 1 min beendet. Die abschließende Dehydratation wurde durch jeweils eine 2-minütige Inkubation in 70%, 96% und 3 x in 100% Ethanol und anschließend in Roticlear für 3 x 5 min durchgeführt. Eingedeckt wurden die gefärbten Schnitte mit Vectashield Eindeckmedium.

### **2.2.5.2 Quantifizierung der Immunhistochemie**

Für die Auswertung der verschiedenen immunhistochemischen Färbungen wurden von den gefärbten Gewebeschnitten Bilder in 200-facher Vergrößerung angefertigt. Fünf repräsentative Bildausschnitte wurden für die Evaluierung ausgewählt und die Gesamtzahl der gefärbten Zellen gezählt.

### **2.2.5.3 Beurteilung der Entzündung und Regeneration anhand H/E-gefärbter Pankreasschnitte**

Die Quantifizierung des Gewebeschadens sowie der Regeneration erfolgte anhand eines Pankreaskomplettschnitts per Maus von jeweils mindestens drei Mäusen pro Gruppe. Dabei wurden die Verteilung des Normalgewebes, die azinäre-zu-duktales-Metaplasie (ADM), Ödeme, Nekrosen sowie Grad und Verteilung der Pankreatitis mit Punkten von 0 (nicht

ausgeprägt) bis 3 (stark ausgeprägt) bewertet. Die Gesamtpankreatitis wurde durch die Multiplikation des Grads mit der Verteilung der Entzündung berechnet. Durchgeführt wurde die Punktevergabe von Dr. med. vet. Katja Steiger vom Institut für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie unter der Leitung von Prof. Dr. Irene Esposito am Klinikum rechts der Isar.

### **2.2.5.4 Durchflusszytometrie**

Ein Durchflusszytometer ist ein Instrument zur qualitativen und quantitativen Untersuchung unterschiedlichster Zellpopulationen. Da es in den meisten Fällen mit einem zusätzlichen Zellseparator ausgestattet ist, wird das Durchflusszytometer im allgemeinen Sprachgebrauch auch kurz FACS („Fluorescence-activated cell sorter“) genannt.

Durch eine durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse) können einzelne Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz, die durch Bindung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern entsteht, charakterisiert werden. Aus der Intensität der Fluoreszenz kann auf die Menge der gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper geschlossen werden. So ist eine Aussage über die Expressionsdichte von markierten Oberflächenantigenen auf der Zelloberfläche möglich. Fluoreszenzkonjugierte Antikörper werden hierbei in einem Überschuss an isotonem Puffer durch eine Düse gepresst, die einen feinen Flüssigkeitsstrahl generiert, in dem die Zellen einzeln und durch Intervalle getrennt vorliegen. Die Zellen passieren einen Laserstrahl und streuen hierbei je nach Größe oder Granularität das Laserlicht. Dabei werden die an die Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren wiederum Licht einer bestimmten Wellenlänge. Sensible, sogenannte Photomultiplier detektieren sowohl die Lichtstreuung, die Aufschluss über Größe und Granularität der Zelle gibt, als auch die Fluoreszenzemissionen, die auf an die Zelle gebundene Antikörper und damit auf Expression entsprechender Oberflächenmarker hinweisen. Die Kombination von geeigneten Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Antigene auf der Oberfläche einer Zelle. Voraussetzung sind zum einen Farbstoffe, die sich in ihren Emissionsspektren unterscheiden und deshalb getrennt voneinander gemessen werden können, zum anderen eine adequate Kompensation der Fluorochrome vor der Messung, um spektrale Überlappungen zu korrigieren. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden FITC-(530 nm), PE-(585 nm), PerCP-(682 nm) und APC-(650 nm) konjugierte Antikörper verwendet.

### **2.2.5.4.1 Färbung isolierter Immunzellen für Durchflusszytometrie-Analysen**

Für die Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurden die isolierten Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern angefärbt. Dafür wurden die isolierten Zellen zunächst zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in kaltem 1 x PBS gelöst. Um die Zellen zu vereinzeln, wurde die Zellsuspension durch ein Sieb mit 70 µm Porengröße gefiltert und mit 5 ml PBS nachgespült. Die gefilterten Zellen wurden nochmals zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml 1 x PBS mit 0,5 % FCS gelöst. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden wurde ein FcR-Block für 15 min bei 4 °C in einer Verdünnung von 1:10 durchgeführt. Danach erfolgte die Inkubation der Proben mit den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern für weitere 10 min bei RT im Dunklen. Dabei wurde jeweils 1 µl Antikörper für je  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde zusätzlich noch mit DAPI gefärbt. Diese Färbung erfolgte für 5 min bei RT ebenfalls im Dunklen. Um den FcR-Block, die Antikörper sowie das DAPI-Reagenz zu entfernen, wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und die Zellen für die nachfolgende FACS-Analyse in 500 µl FACS-Puffer gelöst und in FACS-Röhrchen überführt.

### **2.2.5.4.2 Durchflusszytometrie-Analysen**

Die in dieser Arbeit durchgeführten FACS-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Andreas Gewies und Markus Utzt in der Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie unter Prof. Dr. Jürgen Ruland, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar durchgeführt. Dabei wurden die Geräte BD FACS Aria<sup>TM</sup> III und BD FACS Canto<sup>TM</sup> II sowie die Software BD FACSDiva<sup>TM</sup> Version 7 verwendet.

### **2.2.5.5 Blutserumanalysen**

Für die Gewinnung von Blutserum wurde den Mäusen, wie unter Punkt 2.2.3.4 beschrieben, Blut abgenommen. Das Vollblut wurde zunächst für 30 min bei RT inkubiert, was zu einer ersten Gerinnung des Blutes führte. Anschließend wurde das geronnene Blut zentrifugiert (5000 rpm, 20 min, RT), um zelluläre Bestandteile, wie Erythrozyten, Leukozyten sowie Thrombozyten vom Serum zu trennen. Der Serumüberstand wurde anschließend vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Die Analyse der Seren von WT sowie *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen wurde durch die Routineabteilung der Klinischen Chemie des Klinikums rechts der Isar durchgeführt. Dafür wurden die Serumproben aufgetaut, im Verhältnis von 1:2 mit NaCl verdünnt und an die Klinische

Chemie übergeben. Gemessen wurden die Level von Amylase, Lipase, Kalzium und LDH (Laktat-Dehydrogenase).

### **2.2.5.6 „Bead Based Immunoassay“**

Die „Bead Based Immunoassays“ dienen der Messung verschiedener löslicher und intrazellulärer Proteine wie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren oder phosphorylierter Zellsignalproteine mittels sogenannter „capture beads“ und anschließender Analyse im Durchflusszytometer. Das Besondere an diesem Verfahren ist die Möglichkeit, mehrere Proteine in einer Probe gleichzeitig messen zu können.

Dabei hat jedes „capture bead“ eine einzigartige Fluoreszenzintensität und ist überzogen mit Antikörpern, die speziell nur für ein einziges Zytokin oder Chemokin passen. Eine Kombination verschiedener „capture beads“ wird mit der gewünschten Probe oder einem Standard sowie mit einer Mischung aus Detektionsantikörpern, die an ein Reportermolekül (Fluoreszenzfarbstoff) gekoppelt sind, vermengt. Nach mehreren Inkubations- und Waschschritten werden die Proben anschließend an einem Durchflusszytometer analysiert. Bei der Analyse der Proben grenzt eine Software jede individuelle „bead“-Population ein und ermittelt gleichzeitig den Median der Fluoreszenzintensität jedes Analyten im Auswertungsfeld. Daraus wird eine Standardkurve generiert und eine Interpolation der Probenkonzentration im Vergleich zu dieser Standardkurve ermittelt.

Für die Durchführung des „Bead Based Assay“ wurden die Blutseren aufgetaut und die Proben nach Herstellerprotokoll für die nachfolgende durchflusszytometrische Auswertung vorbereitet. Die Durchführung und Analyse des „Bead Based Immunoassays“ erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. Nat. Andreas Gewies in der Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie unter Prof. Dr. Jürgen Ruland, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar.

### **2.2.6 Graphische Darstellung und statistische Analysen**

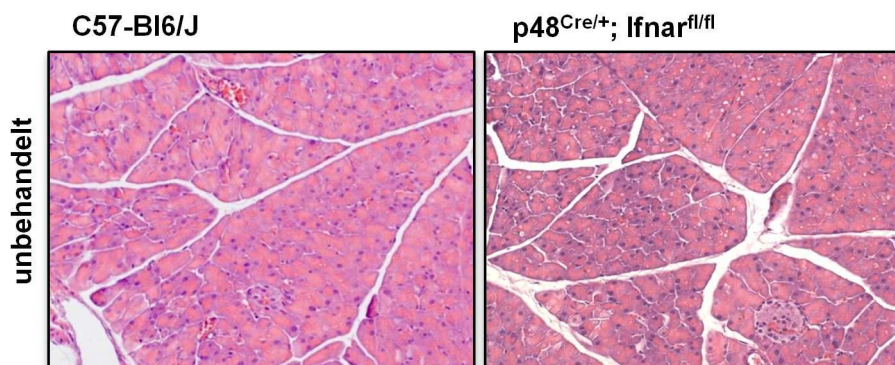
Alle Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt und statistisch sowie grafisch mit dem Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet. Beim Vergleich von zwei Gruppen wurden Medianwerte als „Cut-off“-Limits verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes („standard deviation of the mean“, SD) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit  $P \leq 0,05$  akzeptiert und sind mit einem Stern (\*) indiziert.

## 3 Ergebnisse

Um den Einfluss des Typ I Interferon Signalweges während der Pankreatitis und der darauf folgenden Regeneration zu analysieren, wurde die Mauslinie  $p48^{Cre/+}; Ifnar^{fl/fl}$  ( $Ifnar^{fl/fl}$ ) generiert.  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse weisen einen "knockout" des Typ I Interferon Rezeptors in der Untereinheit 1 auf. Dieser "knockout" ist dabei auf die azinären Zellen des Pankreas beschränkt, was zu einer Unterbrechung der Weiterleitung des Interferonsignals in diesen Zellen führt. Um Unterschiede zwischen den beiden Genotypen C57-BI-6/J (Wildtypmäuse/WT) und den neu generierten  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen zu identifizieren, wurden zunächst unbehandelte Mäuse miteinander verglichen. Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden jeweils mindestens  $n=3$  Tiere pro Gruppe herangezogen.

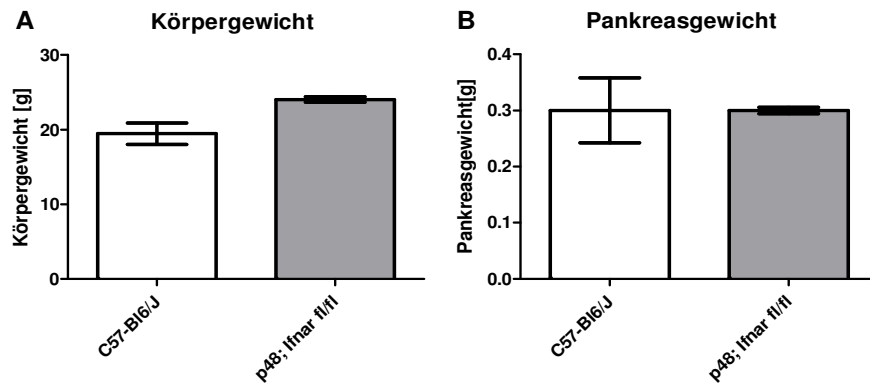
### 3.1 Vergleichende Analysen unbehandelter C57-BI6/J und $p48^{Cre/+}; Ifnar^{fl/fl}$ Mäuse

Erste histologische Vergleiche unbehandelter, acht Wochen alter Wildtypmäuse (WT) mit  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen wiesen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf. Wie in Abb. 6 zu sehen zeigten H/E-Färbungen der Pankreata beider Mauslinien intakte Azini ohne weitere histologische Anomalien in der Struktur des Organs.



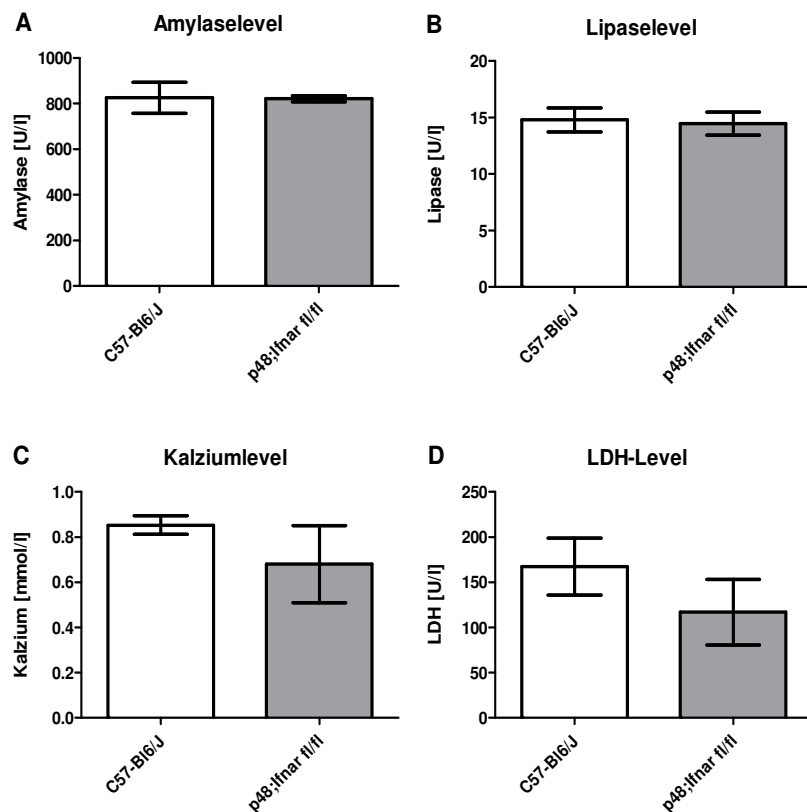
**Abb. 6: Histologische Gewebesanalysen unbehandelter WT und  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden H/E gefärbt. Die Färbung zeigte keine Unterschiede in der Histologie des Pankreasgewebes zwischen WT und  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen. Vergrößerung: 100x.

Analysen des Körpergewichts wie auch des Pankreasgewichts der WT Mäuse entsprachen denen der  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse (Abb. 7).



**Abb. 7: Körper- und Pankreasgewichtsanalysen.** Der Vergleich des Körpergewichts (A) sowie des Pankreasgewichts (B) zeigte keine Unterschiede zwischen unbehandelten WT und  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen. Gruppengröße: n=3.

Um zu zeigen, dass sich die Entzündungswerte der unbehandelten Tiere nicht unterscheiden, wurden verschiedene Entzündungsmarker im Serum der Mäuse miteinander verglichen. Die Untersuchungen der Blutserumwerte von WT und  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen zeigten keine Unterschiede betreffend der Amylase-, Lipase-, Kalzium- sowie LDH-Level (Abb. 8).



**Abb. 8: Analysen der Blutserumwerte.** Serumanalysen betreffend Amylase (A), Lipase (B), Kalzium (C) und LDH (D) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten WT und  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen. Gruppengröße: n=3.

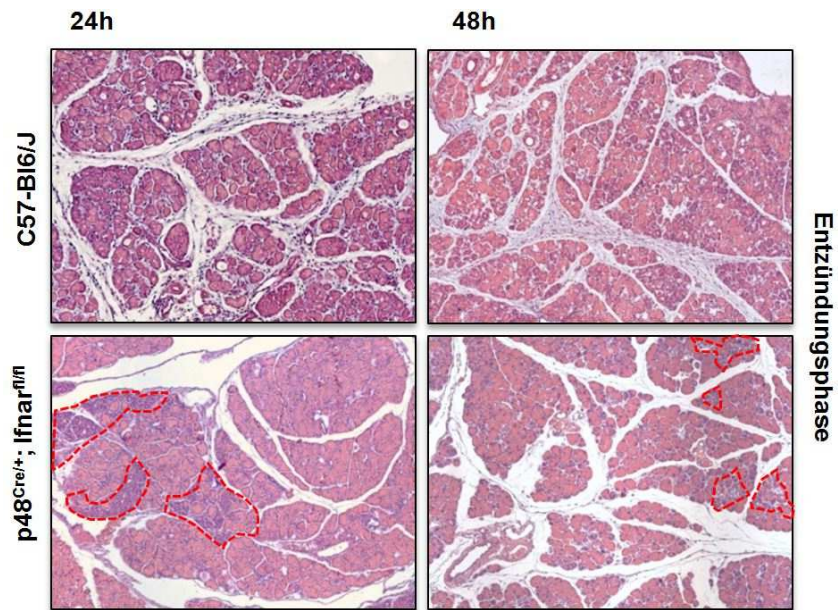
Somit ließen sich keine Unterschiede zwischen unbehandelten WT und  $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$  Mäusen feststellen.

### **3.2 Vergleichende Analysen von C57-B16/J und $\text{p48}^{\text{Cre/+}};\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen nach Caerulein- induzierter Pankreatitis**

Interferone sind Mediatoren der Signalweiterleitung und spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems und daraus folgend der ersten Immunabwehr des Wirtes. Um die Auswirkungen des Unterbrechens des Interferonsignalwegs in der Entzündungs- sowie Regenerationsphase beobachten zu können, wurden sowohl WT als auch  $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$  Mäuse mit Caerulein behandelt und die daraus resultierende Pankreatitis analysiert. Caerulein führt durch wiederholte Injektion zum Selbstverdau des Pankreas verbunden mit einer Entzündung des Organs. Caerulein wird dadurch zur gezielten Induktion einer Pankreatitis im Mausmodell verwendet.

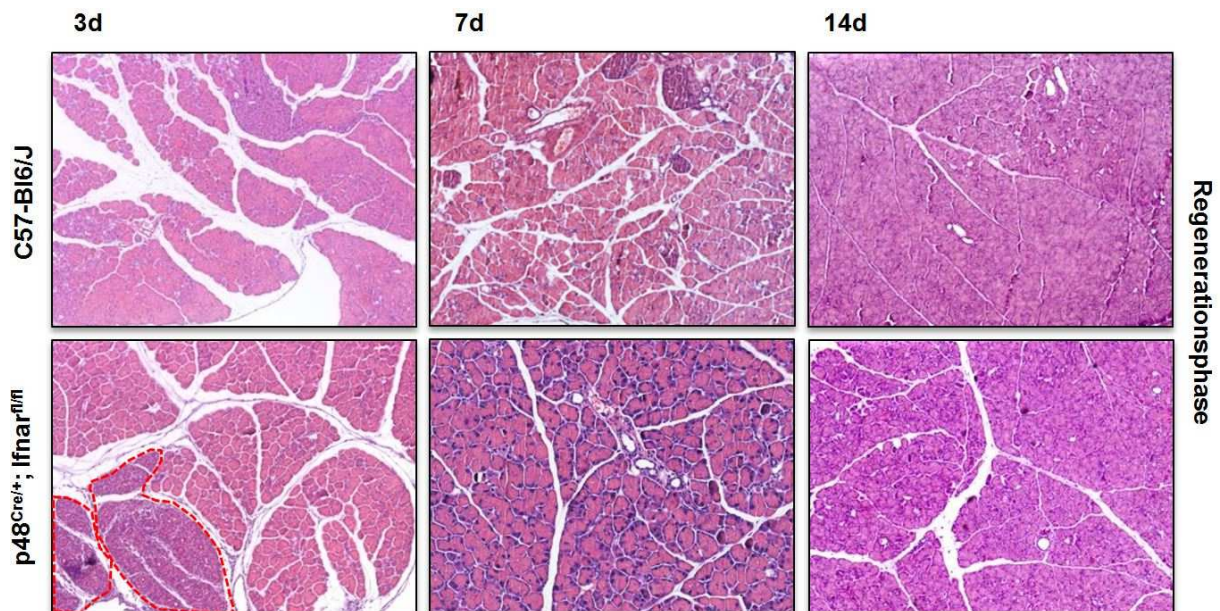
#### **3.2.1 Histologische Analysen und "Grading" der Entzündungs- und Regenerationsphase**

Um einen Überblick über die Entzündung und Regeneration im Pankreas von WT und  $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$  Mäusen zu bekommen, wurden zunächst histologische Untersuchungen gemacht. Analysen H/E-gefärbter Gewebeschnitte der behandelten WT Mäuse zeigten während der Entzündungsphase (24-48 h nach der letzten Caerulein-Injektion) eine starke Gewebeschädigung, die mit einer Degranulierung der Azini und der Einwanderung von Immunzellen einherging. Im Gegensatz dazu wies das Pankreas der  $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$  Mäuse noch weitestgehend intaktes Gewebe mit nur einzelnen, eingegrenzten entzündeten Arealen auf. In Abb. 9 sind diese Entzündungsbereiche der  $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$  Mäuse rot umrandet und klar zu erkennen. Darüber hinaus war in diesem Genotyp nur eine sehr geringe Immuneinwanderung zu beobachten (Abb. 9).



**Abb. 9: Histologische Gewebeanalysen Caerulein-behandelter WT und  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse während der Entzündungsphase (24-48 h).** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden H/E gefärbt. Die histologische Färbung zeigte eine starke Gewebeerstörung und Immunzelleinwanderung in WT Mäusen.  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse wiesen weitestgehend intakte Pankreasareale mit wenigen Entzündungsherden und eine geringe Einwanderung von Immunzellen auf. Vergrößerung: 100x.

Während der Regenerationsphase (3-14 d nach der letzten Injektion) regenerierten die Pankreata sowohl der WT als auch der  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse wieder vollständig, was in Abb. 10 deutlich zu erkennen ist.



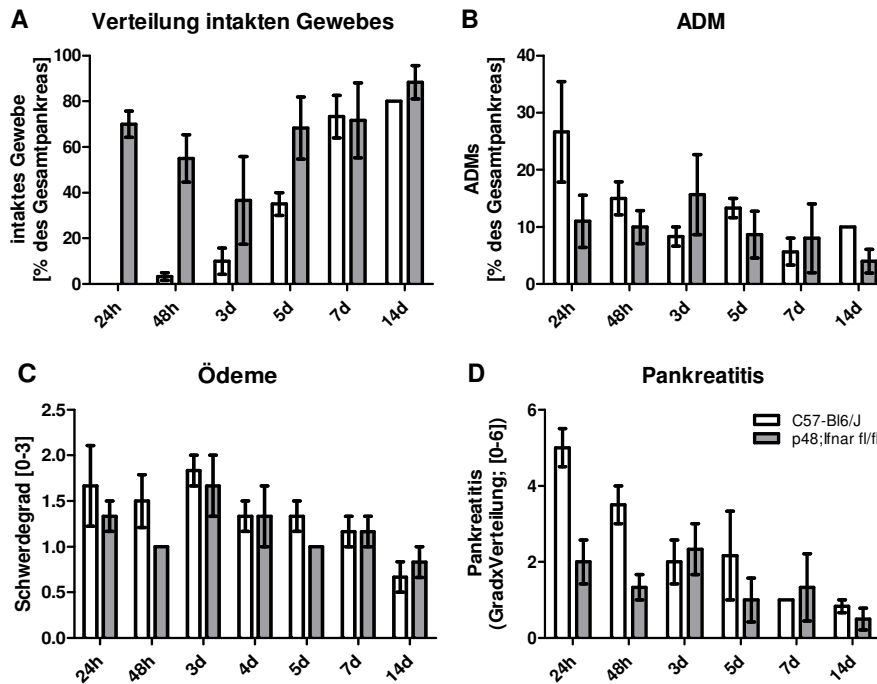
**Abb. 10: Histologische Gewebeanalysen Caerulein-behandelter WT und  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse während der Regenerationsphase (3-14 d).** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden H/E gefärbt. Die histologische Färbung zeigte sowohl in WT als auch in  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen eine beginnende Regeneration des Gewebes mit einer geringer werdenden Anzahl an Immuninfiltraten. Nach  $t=14$  d wiesen beide Genotypen ein komplett regeneriertes Pankreas auf. Vergrößerung: 100x.



## Ergebnisse

---

Zur Quantifizierung des Gewebeschadens und der -veränderungen während der Entzündungs- und Regenerationsphase wurde ein spezielles Bewertungssystem entwickelt. Damit konnten unterschiedliche Parameter der Pankreatitis und pankreatitisbezogener Prozesse beurteilt werden. Die Analyse der Verteilung intakten Pankreasgewebes zeigte, dass WT Mäuse während der Entzündungsphase mit 0- 5 % keine oder nur geringe Anteile an gesundem Gewebe aufwiesen, diese sich aber im Verlauf der Regeneration wieder auf 80 % steigerten. Dahingegen blieb in den  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen das Pankreas während der gesamten Entzündung mit Werten zwischen 40- 90 % an gesundem Gewebe weitestgehend intakt (Abb. 11 A). Die azinäre-zu-duktales-Metaplasie (ADM) war in WT Mäusen zu Beginn der Entzündung mit 27 % des Gesamtgewebes stark ausgeprägt und verringerte sich im Verlauf der Regeneration auf etwa 10 %. In  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen blieb die Gewebeveränderung in der gesamten Beobachtungsphase mit 5 % bis maximal 17 % gering (Abb. 11 B). Keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zeigten sich bei der Ausprägung von Ödemen. In beiden Genotypen nahm der Schweregrad der Ödeme im Laufe der Regeneration von einem Mittelwert von 1,7 auf 0,7 ab (Abb. 11 C). Die Beurteilung der Gesamt-Pankreatitis ergab sich aus der Multiplikation des Grades mit der Verteilung der Entzündung. Hierbei zeigten WT Mäuse zunächst eine schwere Pankreatitis mit einem Wert von 5 bei einem Grading von 0 (keine Pankreatitis) bis 6 (sehr schwere Pankreatitis). Diese regenerierte sich im Laufe der Zeit wieder vollständig.  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse hingegen wiesen mit Werten zwischen 0,5-2 eine milde Pankreatitis auf, die sich in der frühen Regenerationsphase (3 d) an die der WT Mäuse annäherte (Abb. 11 D; WT: 2,2;  $lfnar^{fl/fl}$ : 2,0).



**Abb. 11: Quantifizierung der Pankreatitis und pankreatitisbezogener Parameter in Caerulein-behandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen.** Betrachtet wurden die Verteilung intakten Gewebes (A), die Azinäre-zu-dukter-Metaplasie (ADM) (B), die Ausbildung von Ödemen (C) und die Pankreatitis (D), welche aus der Multiplikation des Grades mit der Verteilung der Entzündung berechnet wurde. Analysiert wurden dabei WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse 24- und 48 Stunden und 3-, 5-, 7- und 14 Tage nach Caerulein-Behandlung. Gruppengröße: n=3.

Während WT Mäuse nach Caerulein-Gabe eine schwere Pankreatitis mit starker Gewebeerstörung und ADM-Bildung entwickelten blieb die Entzündung und Gewebeeränderung in den *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen gering ausgeprägt. Jedoch regenerierten beiden Genotypen wieder vollständig innerhalb von 14 Tagen.

### 3.2.2 Analyse der Proliferation und Zellschädigung in C57-B16/J und *p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen nach Caerulein-Behandlung

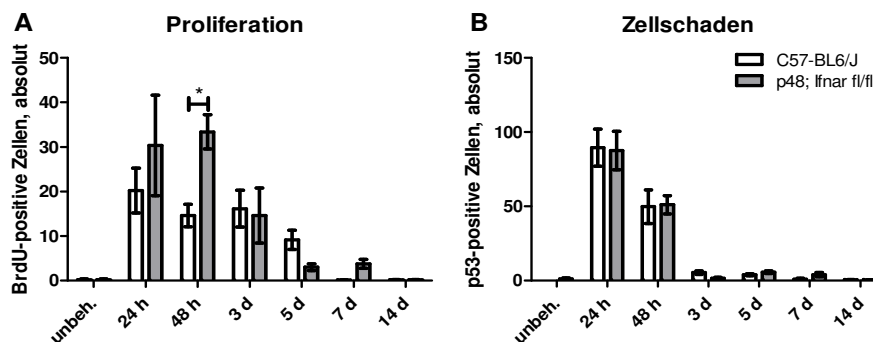
Um nicht nur einen histologischen Eindruck von den Veränderungen während der Entzündung und Regeneration zu erhalten, wurden mittels immunhistochemischen Färbungen auch die Proliferation und die Beschädigung der Zellen in den beiden Genotypen nach induzierter Pankreatitis verglichen.

Zur Analyse der Proliferation wurde eine BrdU-Färbung durchgeführt. BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridine) ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin und interkaliert während der Zellteilung anstelle des Nucleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die neu synthetisierte DNA. Über spezifische Antikörper kann dieser Marker sichtbar gemacht und proliferierende Zellen damit identifiziert werden. Die Auswertung der BrdU-Färbung ergab, dass WT Mäuse während der Entzündungsphase zwischen 15-20 BrdU-positive Zellen pro Bildausschnitt aufwiesen; in der Regeneration nahm die Zahl der

## Ergebnisse

positiven Zellen von 18 (3 d) auf eine (14 d) ab.  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse zeigten dabei auch eine Abnahme an BrdU-positiven Zellen während des Verlaufs der Pankreatitis, von 35 (48 h) auf eine (14 d) positive Zelle. Wie in Abb. 12 A zu sehen, war dabei die Zahl der proliferierenden Zellen in dieser Mauslinie während der Entzündungsphase signifikant höher als in den WT Mäusen. In der frühen Regenerationsphase (3-5 d) lag die Anzahl der BrdU-positiven Zellen unter der der WT Mäuse (Abb. 12 A).

Die Beschädigung der Zellen wurde mit einer p53-Färbung analysiert. Der Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose sowie an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Da p53 nach DNA-Schädigung exprimiert wird, dient er als Marker für Zellschaden. Die p53-Färbung zeigte in beiden Genotypen die gleichen Ergebnisse: mit 90 (24 h) bzw. 55 (48 h) p53-positiven Zellen in WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen war ein erheblicher Schaden während der Entzündungsphase zu erkennen. Und bereits ab der frühen Regeneration (3 d) waren kaum noch beschädigte Zellen sowohl in WT als auch  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen zu detektieren (Abb. 12 B).

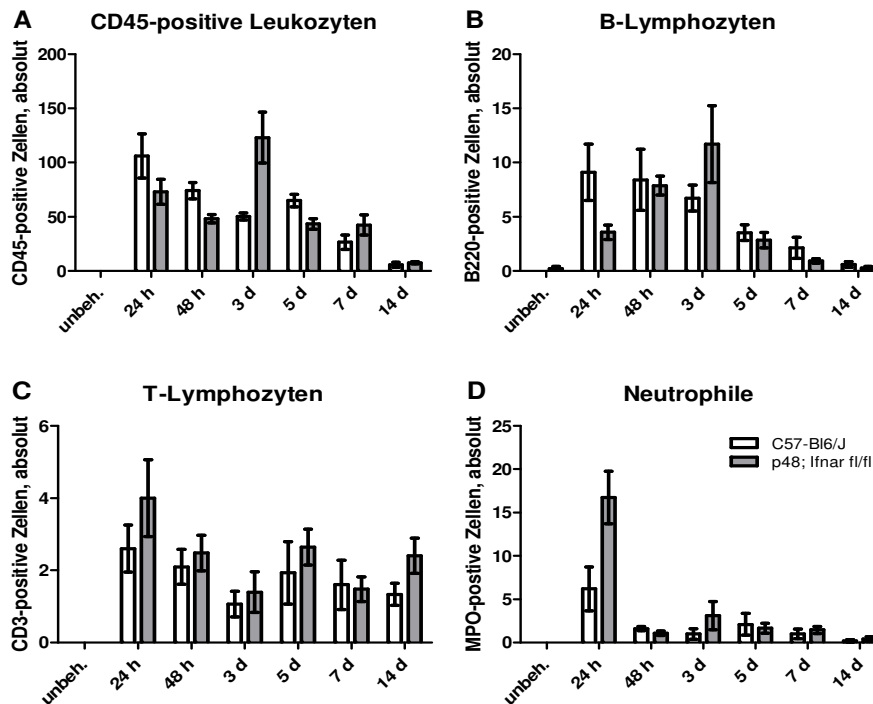


**Abb. 12: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von BrdU-positiven und p53-positiven Zellen in Caerulein-behandelten WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit einem BrdU oder p53 Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. Dabei zeigte sich in  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen während der Entzündungsphase eine stärkere Proliferation als in WT Mäusen (A). Der Zellschaden war in beiden Genotypen in der Entzündungsphase ausgeprägt und ging während der Regeneration stark zurück (B). Gruppengröße: n=3. \*P<0.05, "Wilcoxon matched pairs test".

Zusammenfassen lassen sich diese Ergebnisse wie folgt:  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse zeigten während der Entzündungsphase eine signifikant stärkere Proliferation als WT Mäuse. In der Regeneration gab es dagegen keine deutlichen Unterschiede mehr. Der Zellschaden war in beiden Genotypen während der Entzündungsphase stark ausgeprägt und ging während der Regeneration deutlich zurück.

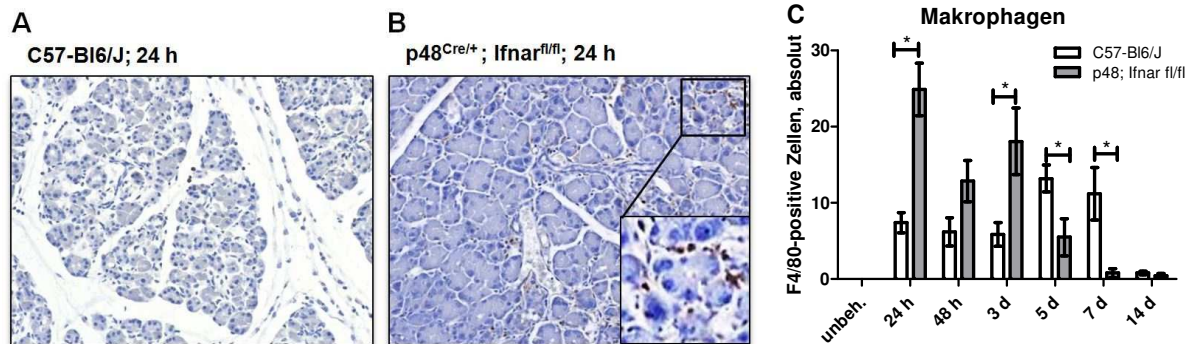
### 3.2.3 Betrachtung der Immunzellzusammensetzung während der Entzündung und Regeneration

Die histologische Untersuchung der Pankreata von behandelten WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen unter Punkt 3.2.1 hatte einen Unterschied in der Immunzellinfiltration zwischen den beiden Genotypen gezeigt. In Abb. 9 war zu erkennen, dass WT Mäuse eine starke Einwanderung von Immunzellen aufwiesen, während diese in  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen nur gering ausgeprägt war. Um die Anzahl und die Zusammensetzung der eingewanderten Immunzellen konkret zu ermitteln, wurden verschiedene, spezifische immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Färbungen gegen den Leukozytenmarker CD45 zeigten eine stark ausgeprägte Einwanderung von Immunzellen in WT Mäusen zu Beginn der Entzündung mit 110 positiven Zellen pro Bildausschnitt, die im Verlauf der Regeneration stetig abnahm.  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse wiesen im Vergleich dazu mit Werten zwischen 40-70 CD45-positiven Zellen eine über die gesamte Pankreatitis und Regeneration gleichbleibend geringe Anzahl eingewanderter Immunzellen auf. Lediglich nach drei Tagen konnten in WT Mäusen mit 50 positiven Zellen weniger Immunzellen detektiert werden als in den  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen mit 125 Zellen (Abb. 13 A). Weitere Analysen der Zusammensetzung der Immunzellen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl B220-positiver B-Lymphozyten (Abb. 13 B), CD3-positiver T-Lymphozyten (Abb. 13 C), sowie Myeloperoxidase-positiver Neutrophiler (Abb. 13 D) im Vergleich zwischen WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen.



**Abb. 13: Auswertung immunhistochemischer Immunzellfärbungen in WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen im Verlauf der Pankreatitis und Regeneration.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit verschiedenen Antikörpern inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. WT Mäuse wiesen eine insgesamt stärkere Einwanderung von CD45-positiven Leukozyten auf als *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse (A). Bei der Anzahl von B220-positiven B- (B) und CD3-positiven T-Lymphozyten (C), sowie MPO-positiven Neutrophilen (D) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Gruppengröße: n=3-5.

Wie in Abb. 14 A und B zu erkennen, zeigten sich deutliche Unterschiede in der Verteilung F4/80-positiver Makrophagen. Während in den WT Mäusen in der Entzündungsphase (24-48 h) und der frühen Regeneration (3 d) mit jeweils acht positiven Zellen nur eine geringe Menge an Makrophagen zu detektieren, war stieg deren Anzahl in der späteren Regenerationsphase (ab 5 d) deutlich an, auf 12-15 positive Zellen (Abb. 14 C). Interessanterweise war die Infiltration von Makrophagen in den *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen während der Entzündung (24-48 h) und der beginnenden Heilungsphase (3 d) signifikant stärker ausgeprägt als in den WT Mäusen. Nach 24 Stunden konnte ein Verhältnis von WT: acht Zellen zu *Ifnar<sup>fl/fl</sup>*: 35 Zellen und nach drei Tagen von WT: acht Zellen zu *Ifnar<sup>fl/fl</sup>*: 28 Zellen ausgemacht werden. In der vorangeschrittenen Regeneration (ab 5 d) sank die Zahl der Makrophagen in den *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit sieben bzw. zwei F4/80-positiven Zellen wieder deutlich ab. Nach 14 Tagen waren in beiden Genotypen nur noch einzelne Makrophagen detektierbar. Im unbehandelten Zustand waren weder in WT noch in *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen Makrophagen zu beobachten (Abb. 14 C).



**Abb. 14: Immunohistochemische Analyse und Auswertung von F4/80-positiven Makrophagen in WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen im Verlauf der Pankreatitis und Regeneration.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit einem F4/80 Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. Während WT Mäuse eine Einwanderung von Makrophagen erst im Verlauf der Regeneration zeigten (A, C), wiesen *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse zu Beginn der Entzündung bereits eine enorme Anzahl an eingewanderten Makrophagen auf (B, C). Gruppengröße: n=3-5. Vergrößerung: 100x. \*P<0.05, "Wilcoxon matched pairs test".

WT Mäuse wiesen eine insgesamt stärkere Einwanderung von CD45-positiven Immunzellen im Vergleich zu *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen auf. Dabei zeigten sich bei der Analyse von B- und T-Lymphozyten sowie Neutrophilen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Erstaunlicherweise wiesen *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse zu Beginn der Entzündung bereits eine enorme Anzahl an eingewanderten Makrophagen auf, während WT Mäuse eine Einwanderung dieser Immunzellen erst im Verlauf der Regeneration zeigten.

### 3.3 Makrophagendepletion und anschließende Analyse der Folgen in der Caerulein-induzierten Pankreatitis

Die wichtigsten Funktionen der Makrophagen sind neben der Phagozytose von Krankheitserregern auch die Aufnahme geschädigter und toter Zellen, um zur Regeneration und zur Auflösung von Entzündungen beizutragen. Außerdem aktivieren sie durch die Ausschüttung bestimmter Zytokine das adaptive Immunsystem. Um den Einfluss der eingewanderten Makrophagen auf den Verlauf der induzierten Pankreatitis analysieren zu können, wurden im Folgenden Makrophagen über die Injektion Clodronat gefüllter Liposome depletiert.

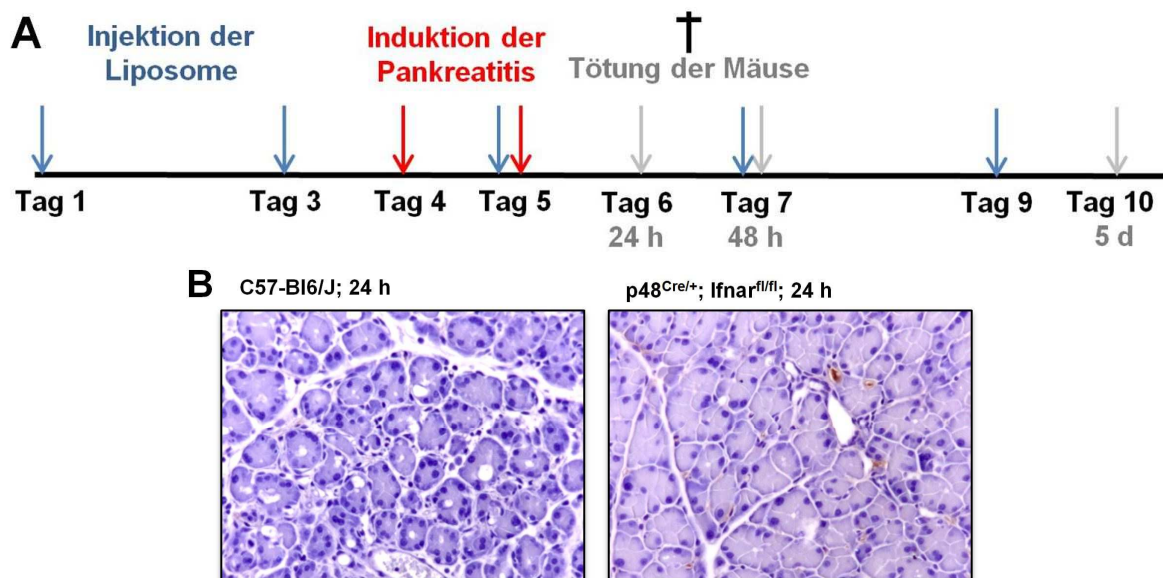
#### 3.3.1 Etablierung der Depletion von Makrophagen

Die zunächst nur zu Beginn der Experimente durchgeführte zweimalige Injektion der Clodronat-Liposomen war nicht ausreichend für eine komplette Depletion der Makrophagen. Bereits fünf Tage nach der letzten Clodronat-Injektion waren die Makrophagen wieder vollständig regeneriert und wanderten in das geschädigte Pankreasgewebe ein; ein

## Ergebnisse

Unterschied zu den Kontrollmäusen, die mit PBS-Liposomen behandelt wurden, war zu diesem Zeitpunkt nicht erkennbar.

Anschließend wurde Clodronat in einem weiteren Ansatz alle zwei Tage verabreicht, dargestellt in Schema A in Abb. 15. Dies führte zu einer Depletion aller Makrophagen während des gesamten Versuchsverlaufs. Exemplarisch gezeigt ist dies in Abb. 15 B 24 Stunden nach letzter Caerulein-Injektion.



**Abb. 15: Immunhistochemische Analyse der Depletion von F4/80-positiven Makrophagen in WT und Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (A). Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit einem F4/80 Antikörper inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Injektion der Clodronat-Liposome führte sowohl in WT als auch in Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen zu einer kompletten Auslöschung der Makrophagen im Pankreasgewebe. Hier exemplarisch dargestellt: t=24 h (B). Vergrößerung: 200x.

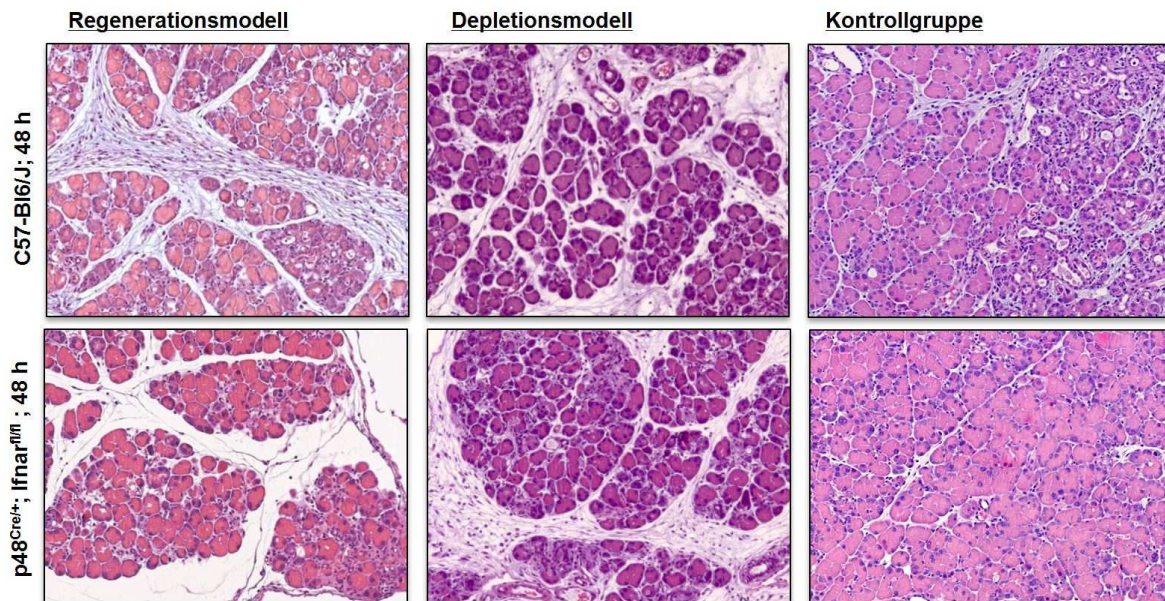
Durch eine fortlaufende Injektion Clodronat gefüllter Liposome konnte eine komplette Eliminierung der in das Pankreas eingewanderten Makrophagen erreicht werden.

### 3.3.2 Histologische Analysen von depletierten C57-BI6/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse nach einer Caerulein-induzierten Pankreatitis

Nach Depletion der Makrophagen und gleichzeitiger Caerulein-bezogener Induktion einer Pankreatitis wurde der Verlauf der Pankreatitis und Regeneration in WT und Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen verglichen. Die Depletion der Makrophagen hatte keine Auswirkung auf den Entzündungs- und Regenerationsverlauf der WT Mäuse. Es gab keine erkennbaren Unterschiede zwischen dem Regenerationsmodell, dem Depletionsmodell und der mit PBS-Liposomen behandelten Kontrollgruppe. Wie in Abb. 16 dargestellt wiesen alle drei Modelle eine starke Gewebeerstörung mit einer einhergehenden Einwanderung von Immunzellen auf (Abb. 16,

## Ergebnisse

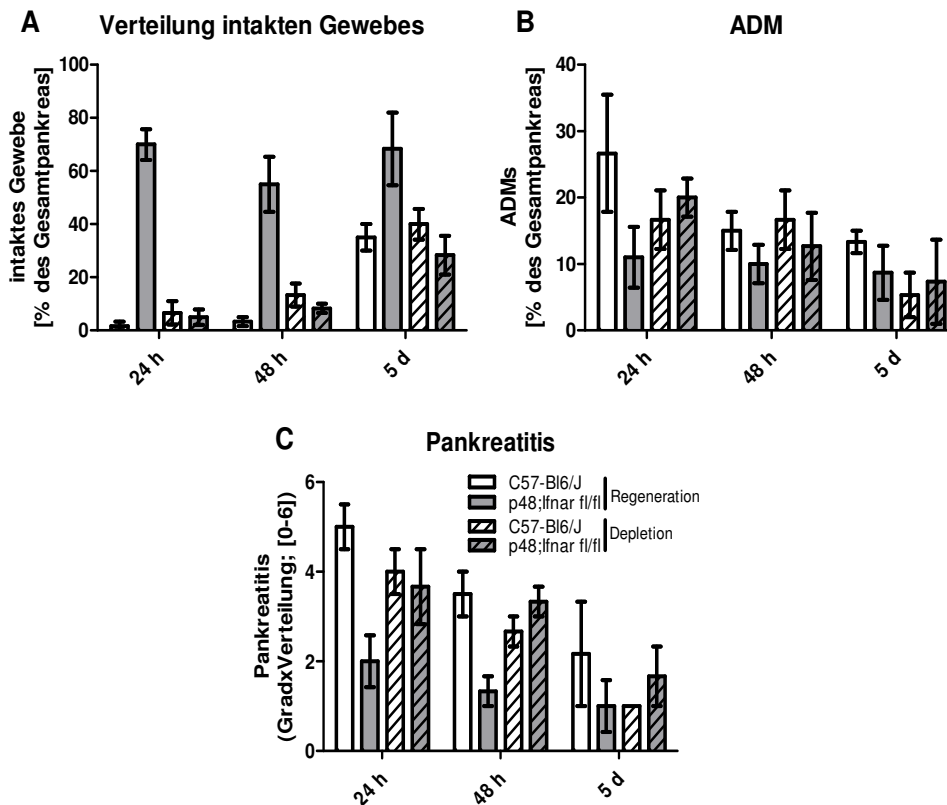
obere Reihe, exemplarisch dargestellt: t=48 h). Erstaunlicherweise zeigten *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse in Abwesenheit von Makrophagen eine Pankreatitis vergleichbar mit der von WT Mäusen. Clodronat behandelte *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse entwickelten eine organübergreifende Gewebeerstörung mit einer ausgeprägten Immunzelleinwanderung. Das Kontrollmodell unterschied sich hierbei nicht vom Regenerationsmodell; in beiden Versuchsanordnungen bekamen *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse nur eine eingeschränkte Pankreasentzündung (Abb. 16, untere Reihe, exemplarisch dargestellt: t=48 h).



**Abb. 16: Histologische Gewebeanalysen in WT und *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen im Regenerations-, Depletionsmodell und der Kontrollgruppe nach 48 Stunden.** Unterschieden wurde zwischen dem Regenerationsmodell (nur Caerulein; links), dem Depletionsmodell (Caerulein+Clodronate; Mitte) und der Kontrollgruppe (Caerulein+PBS; rechts). Bei WT Mäusen gab es keinen Unterschied im Verlauf der Pankreatitis zwischen den drei Modellen. In allen Modellen entwickelten WT Mäuse eine starke Pankreatitis mit einer ausgeprägten Einwanderung von Immunzellen (obere Reihe). *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse zeigten eine eingeschränkte Pankreatitis im Regenerationsmodell und der Kontrollgruppe. In der Depletionsgruppe wiesen *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse ebenfalls eine starke Entzündung und Immunzelleinwanderung auf (untere Reihe). Vergrößerung: 100x.

Gestützt wurden diese Beobachtungen durch ein "Grading" der Gewebeschnitte. Dabei zeigte sich nochmals deutlich die Gewebeerstörung in den depletierten *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit nur noch 5- 10 % an intaktem Gewebe während der Entzündungsphase und etwa 30 % fünf Tage nach letzter Caeruleingabe (Abb. 17 A). Auch die Gewebeveränderung, auszumachen an der Formation von ADMs, hatte sich in den *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen ohne Makrophagen mit etwa 15- 20 % der in WT Mäusen beobachteten ADM-Rate mit ebenfalls 15 % angeglichen (Abb. 17 B). In Abb. 17 C ist der Schweregrad der Pankreatitis in den verschiedenen Modellen dargestellt. Hierbei ist gut zu erkennen, dass es in dem Depletionsmodell sowohl in WT als auch in *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit einem Schweregrad von 3- 4 während der Entzündungsphase zu einer schweren Pankreatitis kommt.





**Abb. 17: Quantifizierung der Pankreatitis und pankreatitisbezogener Parameter in Caerulein-behandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen im Regenerations-, Depletionsmodell und der Kontrollgruppe.** Betrachtet wurden die Verteilung intakten Gewebes (A), die Azinäre-zu-duktales-Metaplasie (ADM) (B) und die Pankreatitis (C), welche aus der Multiplikation des Grades mit der Verteilung der Entzündung berechnet wurde. Analysiert wurden dabei WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse 24-, 48 Stunden und 5 Tage nach Caerulein-Behandlung. Gruppengröße: n=3.

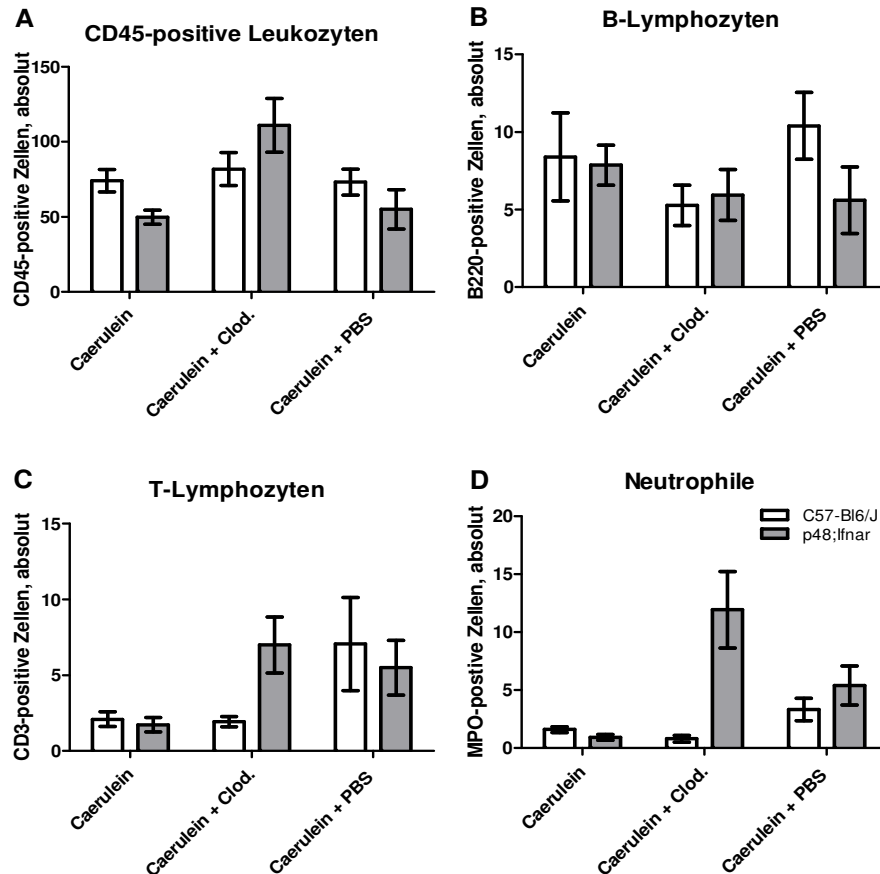
Die Depletion von Makrophagen hatte keine Auswirkungen auf den Entzündungs- und Regenerationsverlauf in WT Mäusen. Interessanterweise zeigten *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse nach Eliminierung der Makrophagen eine organübergreifende Pankreatitis. Die unter Punkt 3.2.1 in Abb. 9 und 10 beobachteten lokal eingeschränkten Entzündungsareale waren nach der Depletion nicht mehr zu erkennen.

### 3.3.3 Analysen der Immunzellzusammensetzung im Pankreatitismodell nach Depletion der Makrophagen

Um zu überprüfen, ob die Behandlung mit Clodronat gefüllten Liposomen und die dadurch bedingte Depletion von Makrophagen einen Einfluss auf die Zusammensetzung der anderen Immunzellen hat, wurden spezifische immunhistochemische Färbungen gemacht. Der Vergleich der Anzahl und Zusammensetzung der eingewanderten Immunzellen zwischen den drei unterschiedlichen Modellen (Regenerationsmodell, Depletionsmodell und der Kontrollgruppe) zeigte in Abb. 18 A eine ähnliche Verteilung an Zellen, die positiv für den Leukozytenmarker CD45 waren. Wie außerdem in Abb. 18 zu sehen, gab es auch in der

## Ergebnisse

Anzahl an B220-positiven B- und CD3-positiven T-Lymphozyten sowie Myeloperoxidase-positiven neutrophilen Granulozyten keine signifikanten Unterschiede. Dies traf sowohl bei den WT als auch den  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen zu (Abb. 18 B-D).



**Abb. 18: Auswertung immunhistochemischer Immunzellfärbungen in WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen im Regenerations-, Depletionsmodell und der Kontrollgruppe nach 48 Stunden.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit verschiedenen Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. In beiden Genotypen zeigten sich in allen drei Behandlungsmodellen ähnliche Verteilungen CD45-positiver Immunzellen und B220-positiver B- und CD3-positiver T-Lymphozyten sowie MPO-positiver Neutrophiler. Gruppengröße: n=3-5.

Die Verabreichung von Clodronat hatte somit keine Auswirkung auf die Verteilung anderer Immunzellen.

### 3.4 Phänotypisierung der Makrophagen isoliert aus C57-B16/J und $p48^{Cre/+}; lfnar^{fl/fl}$ Mäusen

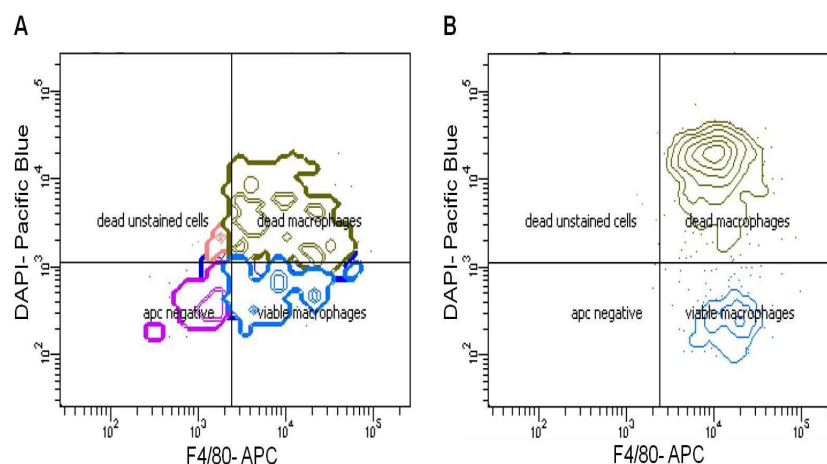
Makrophagen können basierend auf der M1/M2-Klassifikation anhand ihrer Oberflächenmarker in sogenannte „entzündungsfördernde“ M1 oder „entzündungshemmende“ M2 Makrophagen unterteilt werden. Um die Makrophagen im

## Ergebnisse

Pankreas behandelter WT und *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse zu klassifizieren, wurden FACS- ("Fluorescent activated cell sorting ") Analysen zur Bestimmung der Oberflächenmarker durchgeführt.

### 3.4.1 Etablierung schonender Isolationsmethoden für Immunzellen

Für eine Einteilung der Makrophagen in die beiden Subklassen M1/M2 wurden die Immunzellen zunächst enzymatisch aus dem Pankreas behandelter WT Mäuse 24 Stunden nach Behandlungsende isoliert, anschließend gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass ein enzymatischer Verdau des Pankreasgewebes die Oberflächenmarker der isolierten Zellen stark beschädigte. Dadurch war eine spezifische Bindung der Antikörper, wie beispielsweise des spezifischen Makrophagenmarkers F4/80-APC, an die jeweiligen Oberflächenmoleküle nicht mehr gegeben. Dies führte dazu, dass in den FACS-Analysen keine klare Abgrenzung zwischen lebenden und toten Makrophagen getroffen werden konnte, wie in Abb. 19 A zu sehen ist. Da die enzymatische Methode somit nicht für druchflusszytometrische Analysen geeignet war, wurde auf eine mechanische Isolation der Immunzellen umgestellt. Mittels der mechanischen Aufarbeitung des Gewebes konnten klar abgrenzbare Zellpopulationen dargestellt werden. Wie in Abb. 19 B dargestellt, konnten, durch mechanische Aufbereitung der Proben, deutlich die DAPI-negativen, lebenden von den DAPI-positiven, toten Makrophagen unterschieden werden.



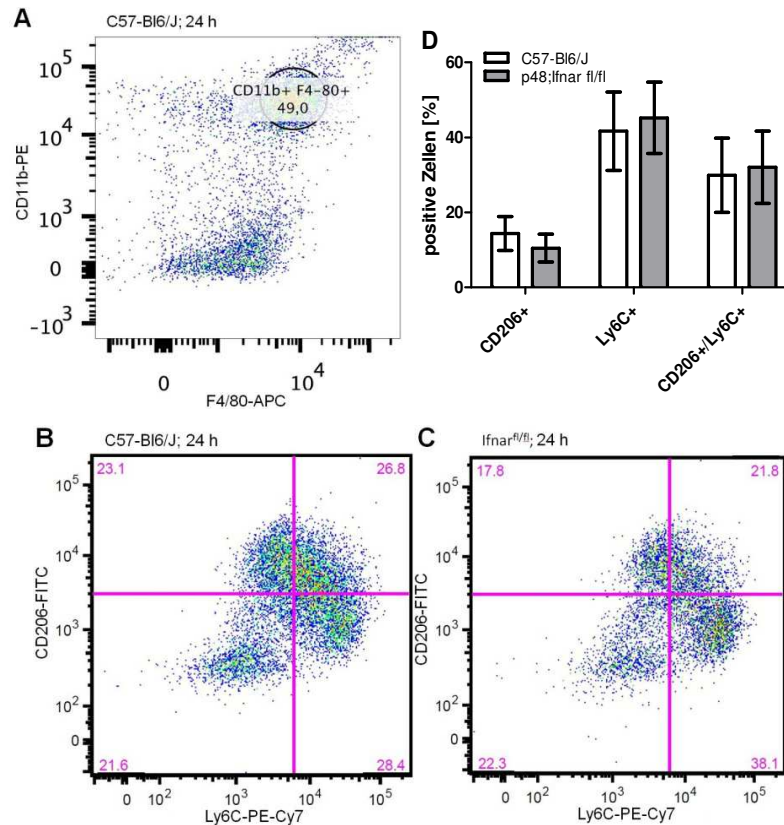
**Abb. 19: FACS-Analysen enzymatisch und mechanisch isolierter Immunzellen.** Immunzellen aus behandelten WT Mäusen ( $t=24$  h) wurden entweder durch enzymatischen Verdau (A) oder mechanisch (B) isoliert, anschließend mit Antikörpern gegen DAPI-"Pacific Blue" und F4/80-APC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In den enzymatisch isolierten Proben konnte keine klare Unterscheidung zwischen lebenden und toten Makrophagen getroffen werden. Die mechanisch isolierten Zellen konnten klar in lebende (DAPI-) und tote (DAPI+) Makrophagen-Populationen getrennt werden. Gruppengröße:  $n=3$ .

Der Vergleich der beiden Isolationsmethoden zeigte, dass für die Klassifizierung der Makrophagen anhand ihrer Oberflächenmarker eine mechanische Isolation der Immunzellen wesentlich besser geeignet war als ein enzymatischer Verdau des Gewebes.

### 3.4.2 Oberflächenmarker-basierte Phänotypisierung isolierter Makrophagen aus C57-B16/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen

Nach den abgeschlossenen Testläufen wurden Immunzellen 24 Stunden nach der letzten Caerulein-Injektion aus WT sowie Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen mechanisch isoliert, gefärbt und anschließend analysiert. Hierfür wurden zunächst Makrophagen über die beiden spezifischen Marker F4/80 und CD11b aus den pankreatischen Immunzellen sortiert (F4/80+CD11b+) (Abb. 20 A). Anschließend wurde eine bestimmte Anzahl an F4/80+CD11b+ Makrophagen aus WT oder Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen anhand des M1-Markers Ly6C und des M2-Markers CD206 weiter charakterisiert (Abb. 20 B-C). Abb. 20 D stellt die graphische Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten FACS-Experimenten dar. Dabei zeigten beide Genotypen eine vergleichbar niedrige Expression des Markers CD206 (F4/80+/CD11b+/CD206+/Ly6C-: WT: 14,4 % / Ifnar<sup>fl/fl</sup>: 10,5 %). Ebenso wiesen beide Mauslinien eine Population doppelt positiver Zellen auf (F4/80+/CD11b+/CD206+/Ly6C+: WT: 29,2 % / Ifnar<sup>fl/fl</sup>: 32,0 %).

Sowohl in WT als auch in Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen war eine klar definierte Population an Ly6C+ Zellen zu finden (F4/80+/CD11b+/CD206-/Ly6C+: WT: 41,7 % / Ifnar<sup>fl/fl</sup>: 45,2 %).



**Abb.20: FACS-Analyse isolierter Immunzellen aus WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen nach Caerulein-Behandlung.** Immunzellen aus behandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen (t=24 h) wurden mechanisch isoliert, anschließend mit Antikörpern gegen F4/80-APC, CD11b-PE, Ly6C-PE-Cy7 und CD206-FITC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zunächst wurden F4/80+/CD11b+ Makrophagen aus den Gesamtimmunzellen sortiert (A, exemplarisch: WT). Die weitere Analyse der Makrophagen erfolgte mit dem M1-Marker Ly6C und dem M2-Marker CD206 sowohl für WT (B) als auch für *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse (C). Graphische Darstellung der jeweiligen Populationen an positiven Zellen in WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen aus n=3 unabhängigen Versuchen (D). Gruppengröße: n=3.

Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass die Makrophagen sowohl in den WT als auch in den *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen überwiegend der Subklasse der entzündungsfördernden M1 Makrophagen anzugehören schienen.

### 3.5 Analyse des Zytokin- und Chemokinprofils in unbehandelten und behandelten C57-B16/J und *p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen

Um die Gründe für die Unterschiede in der Immunzelleinwanderung zwischen WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen zu analysieren, wurde im Folgenden die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine in unbehandelten und behandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mittels qRT PCR sowie zusätzlich auf Proteinebene verglichen. Zytokine, wie Interferone und Interleukine, spielen eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung und Polarisierung von Makrophagen. Weitere wichtige Vermittler der gerichteten Einwanderung von Immunzellen in die entzündeten Areale sind Chemokine.

## Ergebnisse

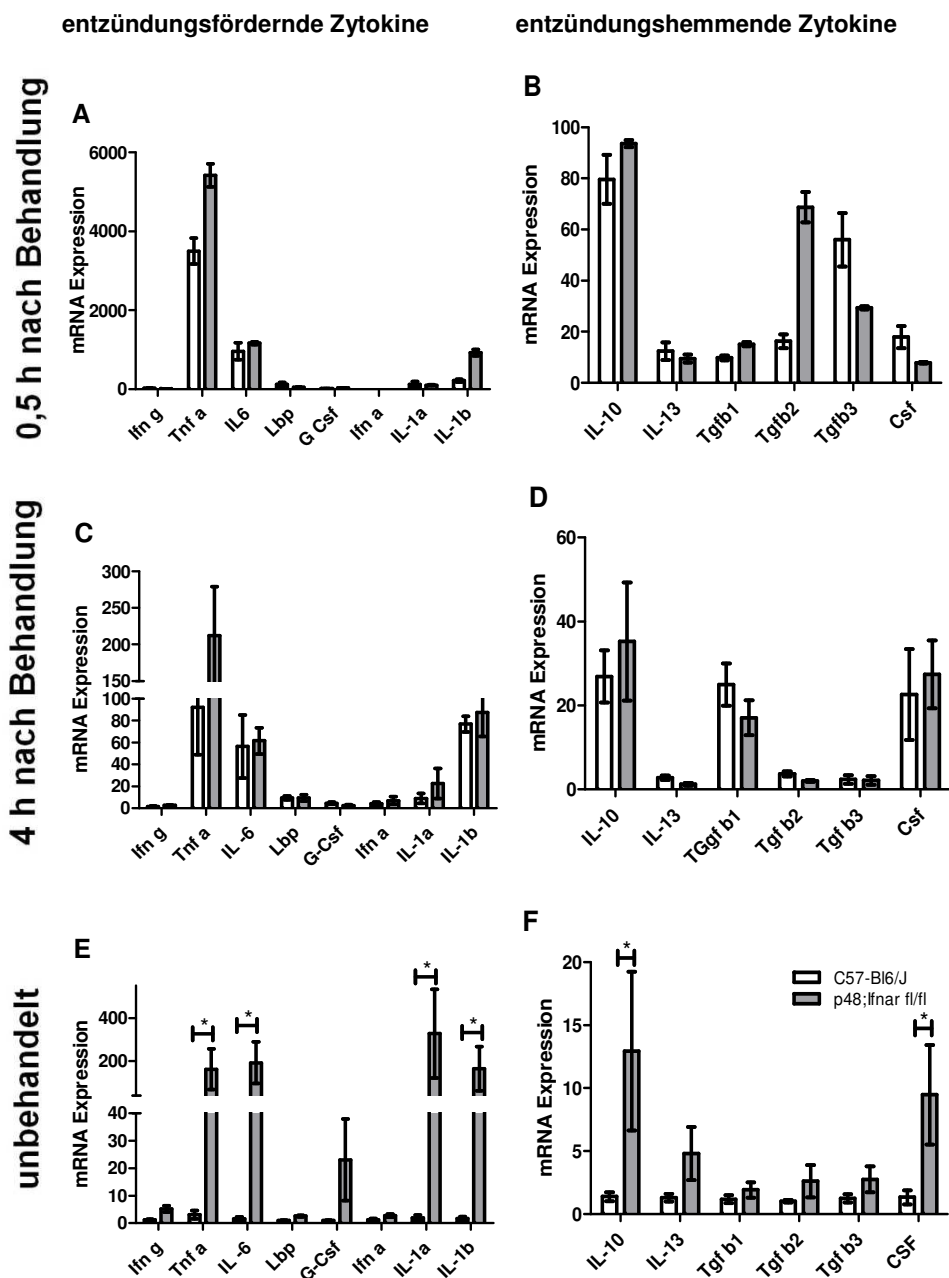
---

Für die qRT PCR wurden zunächst Primereffizienzanalysen für alle verwendeten Primer durchgeführt. Als Referenzgen diente *Ppib* (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B). Für die Analysen wurde mRNA aus den Pankreata unbehandelter und behandelter Tieren 0,5 und vier Stunden nach letzter Caerulein-Injektion isoliert.

### 3.5.1 Erstellung eines Zytokinprofils

Es wurden verschiedene entzündungsfördernde Zytokine, darunter *Ifny*, *Tnf- $\alpha$* , *IL-6*, *Lbp*, *G-Csf*, *Ifn $\alpha$* , *IL-1 $\alpha$*  sowie *IL-1 $\beta$*  und entzündungshemmende Zytokine, wie *IL-10*, *IL-13*, *Tgf $\beta$*  und *Csf* untersucht. Bereits nach 0,5 Stunden zeigte sich eine stark ausgeprägte Hochregulierung der entzündungsfördernden Zytokine *Tnf- $\alpha$* , *IL-6* und *IL-1 $\beta$*  in beiden Genotypen (Abb. 21 A) und eine leicht erhöhte Expression der entzündungshemmenden Zytokine *IL-10*, *Tgf $\beta$*  und *Csf* (Abb. 21 B). Vier Stunden nach Behandlungsende war die Expression dieser Zytokine in beiden Genotypen zwar immer noch vorhanden, aber nur noch in leicht abgeschwächtem Ausmaß zu detektieren (Abb.21 C und D).

Wie in Abb. 21 E und F zu erkennen, gab es im unbehandelten Zustand keine Erhöhung der mRNA Expressionslevel in WT Mäusen. Interessanterweise zeigten *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse, im Gegensatz dazu, schon eine basal stark erhöhte Expression von *Tnf- $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  und *G-Csf* (Abb. 21 E) und eine Hochregulierung von *IL-10* und *Csf* (Abb. 21 F) im unbehandelten Zustand.



**Abb. 21: qRT PCR-Analysen der Zytokinexpression in unbehandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen und nach Caerulein-Behandlung.** (A-B) mRNA-Expressionsanalysen der entzündungsfördernden Zytokine *Ifn $\gamma$* , *Tnf- $\alpha$* , *IL-6*, *Lbp*, *G-Csf*, *Ifn $\alpha$* , *IL-1 $\alpha$* , sowie *IL-1 $\beta$*  (A, C, E) und der entzündungshemmenden Zytokine *IL-10*, *IL-13*, *Tgf $\beta$*  und *Csf* (B, D, F). RNA wurde aus dem Gesamtpankreasgewebe von behandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen nach 0,5 Stunden (A, B), 4 Stunden (C, D) und von unbehandelten Tieren (E, F) isoliert. Während nach einer Caerulein-Behandlung beide Genotypen Zytokine hochregulierten, zeigte sich in unbehandelten *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen eine basale Expression einiger Zytokine. Gruppengröße: n=3. Normalisiert auf *Ppib*. \*P<0,05, "Wilcoxon matched pairs test".

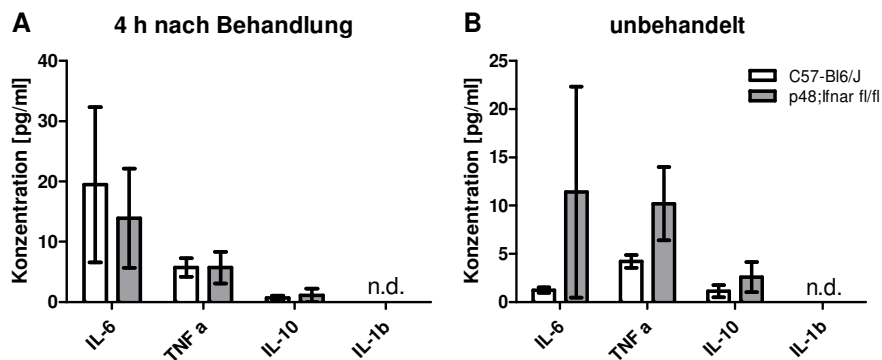
qRT PCR-Analysen zeigten, dass nach einer Caerulein-Behandlung sowohl WT als auch *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse entzündungsfördernde und -hemmende Zytokine hochregulierten. Erstaunlicherweise zeigten *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse bereits im unbehandelten Zustand eine deutlich erhöhte Expression der Zytokine.

## 3.5.2 Validierung der mRNA-Expression in Serumproben

Um die Zytokine auch im Serum zu analysieren wurden mit dem "bead based array"-Test einige der bereits oben beschriebenen Zytokine in Blutproben unbehandelter und behandelter WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse bestimmt, um somit die Zytokinexpressions auf Proteinebene zu validieren.

Wie in Abb. 22 A zu sehen, zeigten beide Genotypen vier Stunden nach Behandlung erhöhte Blutserumwerte der entzündungsfördernden Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$ . Der Serumwert des entzündungshemmenden IL-10 war in beiden Mauslinien nicht erhöht.

Unbehandelte WT Mäuse wiesen nur sehr geringe Level an IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 auf. In *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen waren im unbehandelten Zustand erhöhte Serumlevel von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 zu erkennen (Abb. 22 B). IL-1 $\beta$  lag unterhalb der Nachweisgrenze.



**Abb. 22: Blutserumanalysen unbehandelter WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse und nach Caerulein-Behandlung.** Im Blut behandelter Mäuse ließen sich über den "bead based assay" erhöhte Werte von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 in beiden Genotypen nachweisen (t=4 h) (A). Unbehandelte WT Mäuse zeigten keine erhöhten Werte, unbehandelte *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse wiesen erhöhte Werte an IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 auf. IL-1 $\beta$  lag unterhalb der Nachweisgrenze. Gruppengröße: n=3.

Innerhalb der untersuchten Gruppen kam es zu stark ausgeprägten Schwankungen der Messwerte, weshalb hier keine signifikanten Aussagen über das Proteinlevel der gemessenen Zytokine im Blutserum der Mäuse getroffen werden konnte.

## 3.5.3 Erstellung eines Chemokinprofils

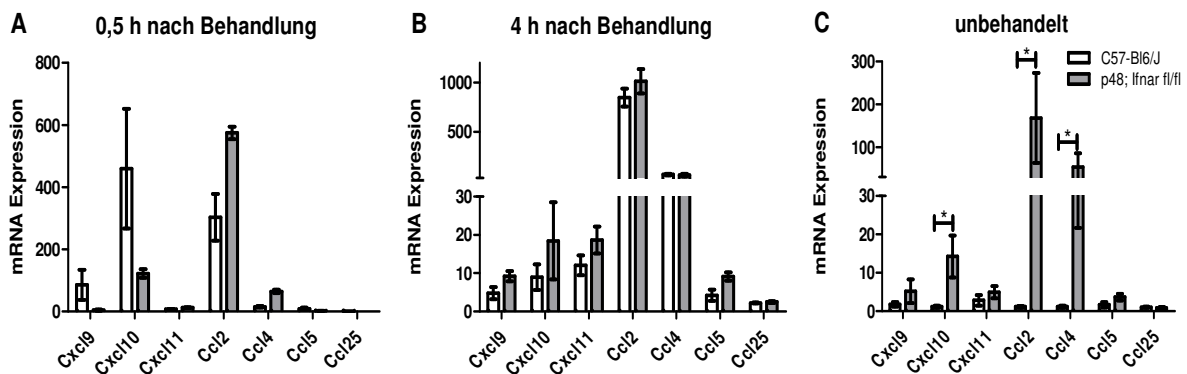
Chemokine sind maßgeblich an der gerichteten Immunzellinfiltration in das geschädigte oder entzündete Gewebe beteiligt. Um zu untersuchen, ob nicht nur entzündungsfördernde Zytokine ausgeschüttet wurden, wie unter Punkt 3.5.1 und 3.5.2 gezeigt, sondern auch die Expression von Chemokinen erhöht war, wurden weitere qRT PCR-Analysen durchgeführt. Zu Erstellung eines Profils wurden folgende Chemokine ausgewählt: *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Ccl2*, *Ccl4*, *Ccl5* und *Ccl25*. Bereits nach 0,5 Stunden wiesen WT Mäuse eine Hochregulierung der Chemokine *Cxcl9*, *Cxcl10* sowie *Ccl2* auf. Ebenso zeigten *Ifnar<sup>fl/fl</sup>*



## Ergebnisse

Mäuse zu diesem Zeitpunkt erhöhte Level von *Cxcl10*, *Ccl4* und *Ccl2* (Abb. 23 A). Vier Stunden nach einer Caerulein-Behandlung wiesen beide Genotypen eine leichte Erhöhung der mRNA Expression von *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, und *Ccl5* auf. In beiden Mauslinien war hingegen die Expression von *Ccl2* und *Ccl4* sehr stark erhöht (Abb. 23 B).

In unbehandelten WT Mäusen blieb die Chemokinexpression gering, wohingegen *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse hohe Level an *Cxcl10* und *Ccl4* zeigten. Am auffälligsten war in diesen Mäusen die stark erhöhte Expression von *Ccl2*, wie in Abb. 23 C zu erkennen ist.



**Abb. 23: qRT PCR-Analysen der Chemokinexpression in unbehandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen und nach Caerulein-Behandlung.** mRNA-Expressionsanalysen der Chemokine *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Ccl2*, *Ccl4*, *Ccl5* und *Ccl25* (A-C). RNA wurde aus dem Gesamtpankreasgewebe von behandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen nach 0,5 Stunden (A), 4 Stunden (B) und von unbehandelten Tieren isoliert (C). Während nach einer Caerulein-Behandlung beide Genotypen mehrere Chemokine hochregulierten, zeigte sich nur in unbehandelten *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen eine basale Expression. Gruppengröße: n=3. Normalisiert auf *Ppib*. \*P<0.05, "Wilcoxon matched pairs test".

Diese Expressionsanalysen zeigten, dass behandelte Tiere nicht nur Interferone und Interleukine, wie unter Punkt 3.5.1 bereits gezeigt, hochregulierten, sondern auch die Level einiger Chemokine stark erhöht waren. Interessanterweise exprimierten unbehandelte *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse ebenfalls bereits basal diese Chemokine.

### 3.5.4 Validierung der mRNA-Expression des Chemokines *Ccl2* im Gewebeverband

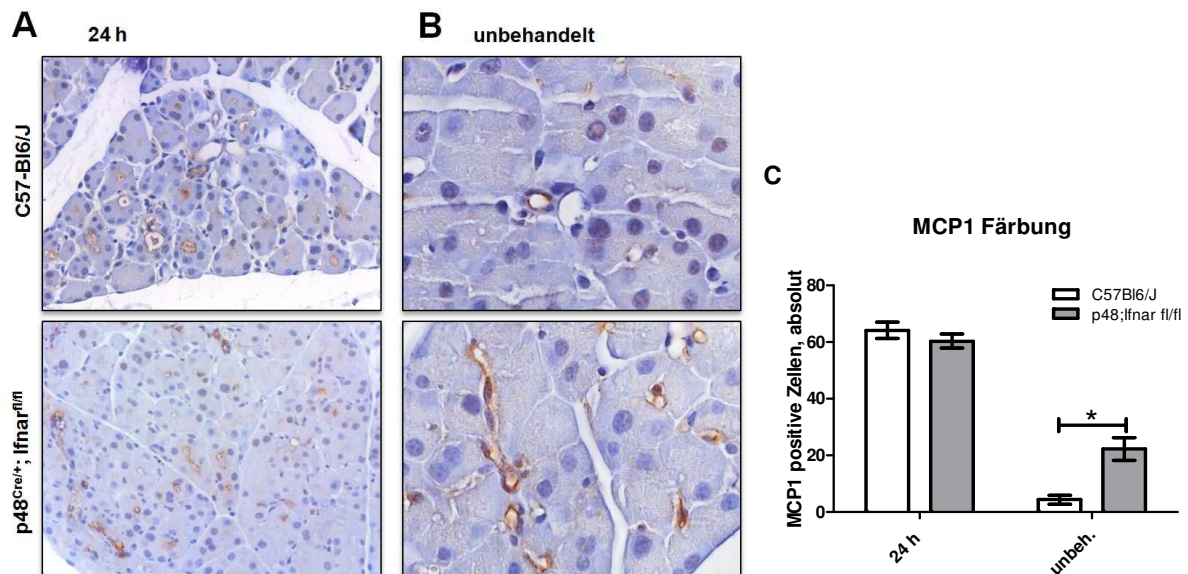
Um die Expressionsdaten auch auf Proteinebene zu validieren, wurden immunhistochemische Färbungen gegen MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1 und Alternativname für CCL2) durchgeführt.

Wie in Abb. 24 A gut zu sehen ist, zeigten behandelte WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse nach 24 Stunden eine zentro-azinäre Färbung in annähernd allen azinären Komplexen.

In unbehandelten WT Mäusen waren keine MCP1-positiven Zellen zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse auf Proteinebene in unbehandelten *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen, analog der erhöhten Expression von *Ccl2*, dargestellt unter Punkt 3.5.3 in Abb. 23 C, auch

## Ergebnisse

eine in der Frequenz und Intensität stark ausgeprägte MCP1-Expression. Hierbei waren hauptsächlich die zentro-azinären Zellen gefärbt, zu sehen in Abb. 24 B. Eine Auswertung der MCP1-Färbung bestätigte die oben beschriebenen Eindrücke: Es gab keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in der Expression des Chemokins nach Behandlung. Außerdem zeigte sich keine Expression in unbehandelten WT Mäusen. Dafür konnte eine basal stärkere Färbung in unbehandelten  $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$  Mäusen beobachtet werden. Zusammengefasst ist diese Auswertung in Abb. 22 C.



**Abb. 24: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von MCP1-positiven Zellen in WT und  $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$  Mäusen 24 Stunden nach Caerulein-Behandlung und in unbehandelten Mäusen.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit einem MCP1 Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. Nach Behandlung zeigten beide Genotypen MCP1-positive zentro-azinäre Komplexe (A, C). Während in unbehandelten WT Mäusen keine MCP1-Färbung zu sehen war (B, C) wiesen  $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$  Mäuse eine ausgeprägte Färbung der zentro-azinären Zellen auf (B, C). Gruppengröße: n=3-5. Vergrößerung: 200x und 1000x. \* $P < 0.05$ , "Wilcoxon matched pairs test".

Durch die MCP1-Färbung und anschließende Auswertung konnte die basal erhöhte Expression des Chemokines *Ccl2* in unbehandelten  $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$  Mäusen auch auf Proteinebene validiert werden.

### 3.6 Expressionsanalysen von aktiviertem NF- $\kappa$ B in unbehandelten und behandelten C57-B16/J und p48<sup>Cre/+</sup>; $\text{Ifnar}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen

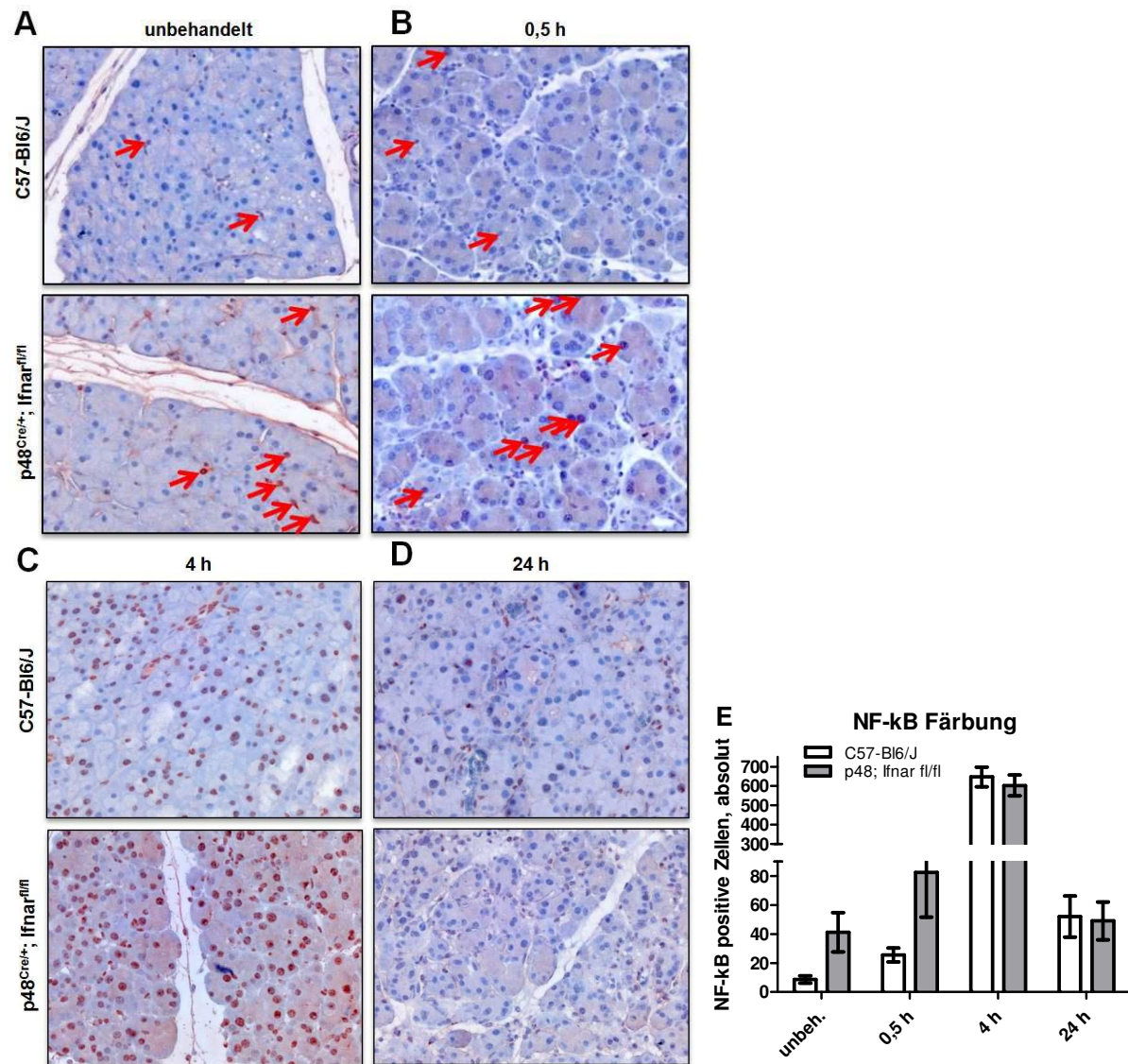
Es ist bekannt, dass Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  eine tragende Rolle bei der Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs spielen. Wie unter Punkt 3.5.1 und 3.5.2 gezeigt, konnte eine stark erhöhte Expression von *Tnf- $\alpha$*  und *IL-1 $\beta$*  und die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in

## Ergebnisse

---

unbehandelten  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte untersucht werden, ob die erhöhte Zytokinausschüttung auch zu einer Aktivierung und darauf folgenden Kernlokalisation von NF- $\kappa$ B führt. Zur Überprüfung dieser These wurden immunhistochemische Färbungen gegen NF- $\kappa$ B durchgeführt.

Abb. 25 zeigt die NF- $\kappa$ B-Färbung der einzelnen Zeitpunkte, sowie die Auswertung dieser Immunhistochemie nochmals graphisch dargestellt in Abb. 25 E. Die Analysen der NF- $\kappa$ B-Färbung zeigten in unbehandelten WT Mäusen mit durchschnittlich zehn gefärbten Zellkernen kaum positiven Zellen. Interessanterweise war in unbehandelten  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen bereits eine basale Aktivierung einiger Zellen zu erkennen, angezeigt durch 40 NF- $\kappa$ B-positive Zellkerne (Abb. 25 A). Auch 0,5 Stunden nach Behandlungsende zeigten WT Mäuse mit 35 positiven Zellen pro Bildausschnitt nur eine geringe Aktivierung von NF- $\kappa$ B.  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse dagegen wiesen eine stärkere Aktivierung von NF- $\kappa$ B auf, angezeigt durch 80 NF- $\kappa$ B-positive Zellkerne (Abb. 25 B). Vier Stunden nach der letzten Caerulein-Injektion waren in beiden Genotypen annähernd alle Zellkerne positiv (Abb. 25 C). Bereits 24 Stunden nach Behandlungsende konnten sowohl in WT als auch in  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen mit jeweils etwa 50 positiven Kernen nur noch wenige NF- $\kappa$ B-positive Zellen beobachtet werden (Abb. 25 D).



**Abb. 25: Immunhistochemische Analysen und Auswertung der NF-κB-Expression in unbehandelten und Caerulein-behandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit einem NF-κB Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. Unbehandelte WT Mäuse zeigten nur wenige positive Zellen, *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen hatten auch im unbehandelten Zustand einige NF-κB-positive Zellen (A). 0,5 Stunden nach Behandlungsende wiesen WT Mäuse kaum positive Färbung auf, *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse zeigten vermehrt positive Zellkerne (B). Behandelte Tiere wiesen nach 4 Stunden eine Lokalisation aktivierten NF-κB im Zellkern aller Zellen auf (C). Bereits 24 Stunden nach Behandlung war dieser Effekt in beiden Genotypen wieder erloschen (D). Gruppengröße: n=1-3. Vergrößerung: 400x.

Durch die NF-κB-Färbung konnte eine Kernlokalisierung und damit verbundene Aktivierung von NF-κB nicht nur in den behandelten Tieren gezeigt werden. Erstaunlicherweise wiesen *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse nicht nur direkt nach der Caerulein-Behandlung, sondern bereits im unbehandelten Zustand eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs auf. In WT Mäusen dagegen wurde dieser erst nach vier Stunden angeschaltet.

### 3.7 Vergleichende Analysen von unbehandelten

#### **p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup> und p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen**

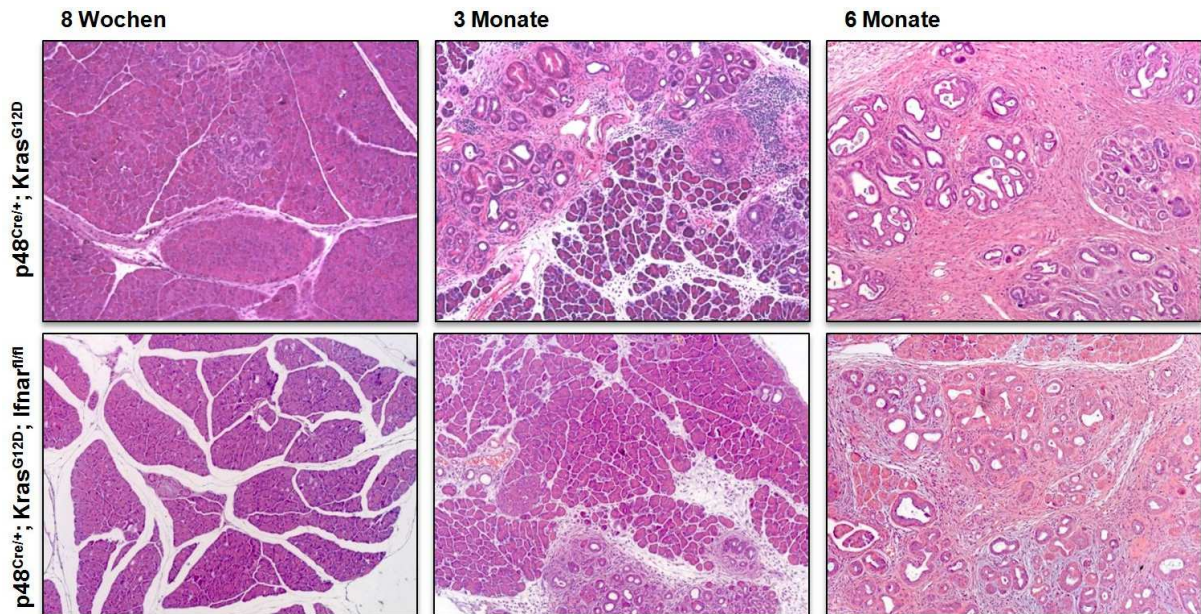
p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup> (Kras) Mäuse tragen eine Punktmutation auf dem Codon 1 des *Kras*-Gens, die über einen Cre-Promotor spezifisch in den Azini des Pankreas ausgelöst wird. Dies führt zur dauerhaften Aktivierung des Onkogens, was diese Mauslinie zu einem weit verbreiteten Modell in der Tumorforschung macht. Die Mutation allein reicht dabei noch nicht für die Tumorentstehung aus; erst durch ein weiteres Ereignis, wie eine Entzündung, kommt es zur Tumorentstehung. In p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> (Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup>) ist desweiteren noch der Interferonsignalweg in den azinären Zellen des Pankreas unterbrochen.

Zur Charakterisierung der neu generierten Mauslinien wurden zunächst unbehandelte Tiere morphologisch untersucht.

#### 3.7.1 Histologische Analyse und "Grading" der beiden Genotypen

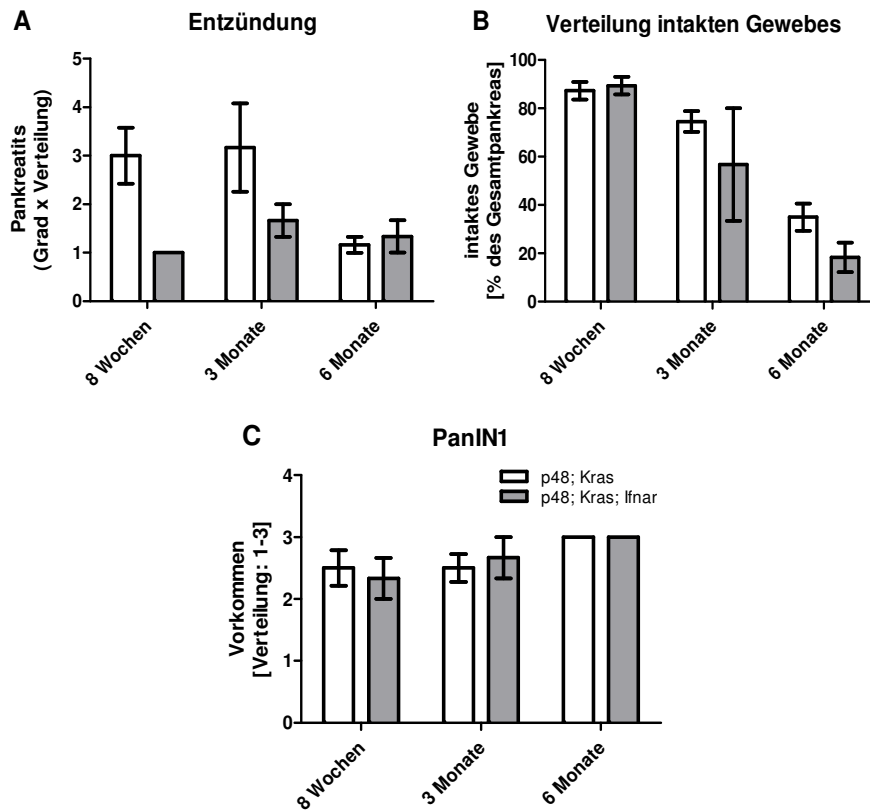
Die Übersichten der Histologie von unbehandelten acht Wochen, sowie drei und sechs Monaten alten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen sind in Abb. 26 dargestellt. Im Alter von acht Wochen wiesen sowohl Kras als auch Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse noch weitestgehend intaktes Pankreasgewebe auf. In beiden Linien ließen sich allerdings schon Veränderungen des Gewebes in Form von ersten ADMs erkennen (Abb. 26, links). Nach drei Monaten waren in beiden Mauslinien noch azinäre Strukturen vorhanden. Durch die Aktivierung des Stomas sowie der Zunahme der ADMs kam es jedoch zu einer starken Gewebeveränderung. Desweiteren konnte eine massive Immunzellinfiltration beobachtet werden (Abb. 26, Mitte). Die sechs Monate alten Tiere wiesen nur noch vereinzelt Azinuskomplexe auf. Das Gewebe von Kras als auch von Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen setzte sich hauptsächlich aus Stroma und vermehrt auftretenden Neoplasien zusammen (Abb. 26; rechts).

## Ergebnisse



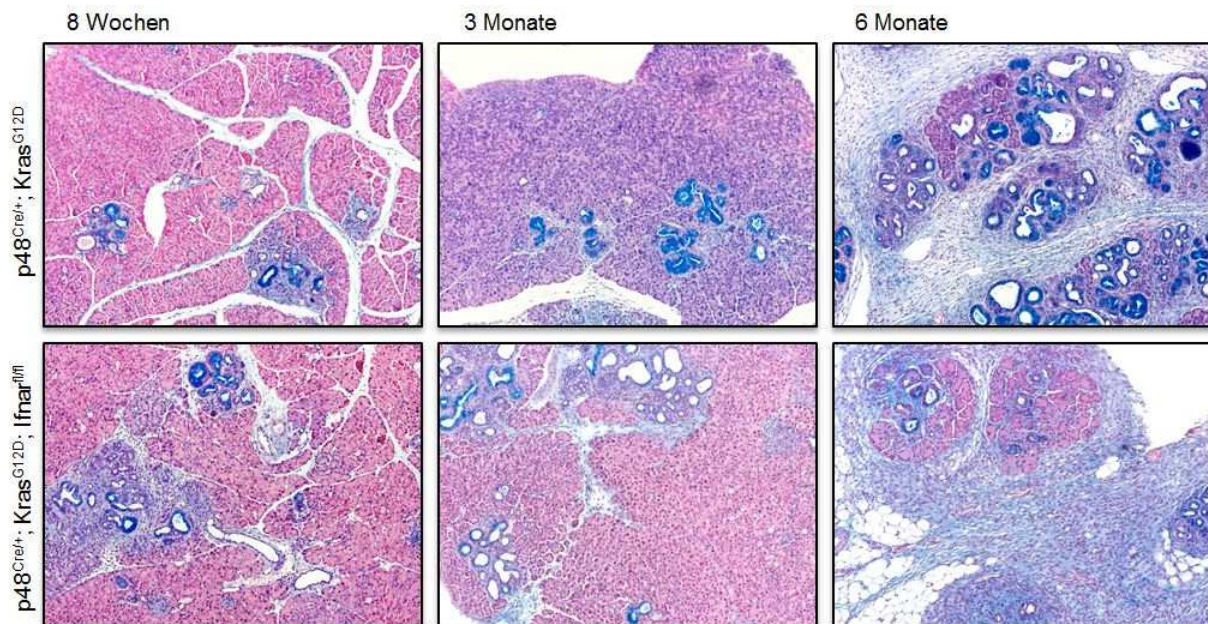
**Abb. 26: Histologische Gewebearbeiten un behandelter Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden H/E gefärbt. Die Färbung zeigte keine Unterschiede in der Histologie des Pankreasgewebes zwischen Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen im Alter von acht Wochen (links), drei Monaten (Mitte) und sechs Monaten (rechts). Vergrößerung: 100x.

Zur Quantifizierung der Gewebeveränderungen während des Alterungsprozesses der Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse wurden unterschiedliche Parameter gewebeverändernder und entzündungsbezogener Prozesse beurteilt. Auffällig war hierbei, dass sowohl Kras als auch Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse eine nicht induzierte, Kras-bezogene Entzündung des Pankreas aufwiesen. Diese war in den Kras Mäusen im Alter von acht Wochen und drei Monaten mit einem Schweregrad von 3 stärker ausgeprägt als in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit einem Schweregrad von eins bis 1,5. Die Entzündung der Kras Mäuse glich sich im Alter von sechs Monaten der leichten Entzündung in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen an (Schweregrad: 1; Abb. 27 A). Intakte, azinäre Strukturen nahmen in beiden Mauslinien mit steigendem Alter ab. Während in acht Wochen alten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit etwa 90 % noch ein großer Anteil an Pankreasgewebe unverändert war, zeigte sich bereits nach drei Monaten eine Gewebeveränderung in beiden Genotypen. Während Kras Mäuse noch einen hohen Anteil an gesundem Gewebe aufwiesen (75 %), zeigten Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit nur noch 60 % an intaktem Gewebe einen höheren Verlust. Nach sechs Monaten hatten beide Genotypen nur noch geringe Anteile an intakten Azini, wobei Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit 20 % intaktem Gewebe wiederum eine stärkere Veränderung aufwiesen als Kras Mäuse mit 35 % (Abb. 27 B). Die Quantifizierung der intraepithelialen Neoplasien zeigte eine leichte Zunahme der PanINs im Laufe der Alterung von einem Wert von 2,5 auf 3, sowohl in Kras als auch in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen, die sich zwischen den beiden Linien jedoch nicht signifikant unterschied (Abb. 27 C).



**Abb. 27: Quantifizierung gewebeverändernder und entzündungsbezogener Parameter in unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.** Analysiert wurden die Entzündung (A), welche aus der Multiplikation des Grades mit der Verteilung der Entzündung berechnet wurde, die Verteilung intakten Gewebes (B) und das Vorkommen intraepithelialer Neoplasien (PanIN) (C). Untersucht wurden dabei unbehandelte Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse im Alter von acht Wochen, drei Monaten und sechs Monaten. Gruppengröße: n=3.

Die Zunahme der Neoplasien, sowohl in Kras als auch in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen, wurde anhand der "Alcian Blue"-Färbung zu den drei beschriebenen Zeitpunkten in Abb. 28 veranschaulicht. Da "Alcian Blue" nur muzinöse Strukturen in einem satten Blau anfärbt, ist damit eine spezifische Detektion der PanINs und zusätzlich eine Abgrenzung zu den ADMs möglich.



**Abb. 28: Histologische Detektion intraepithelialer Neoplasien (PanINs) in unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit „Alcian Blue“ und „Nuclear Fast Red“ gefärbt. Die Anzahl der blau gefärbten PanINs nahm sowohl in Kras als auch Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen im Alter von acht Wochen (links), über drei Monate (Mitte) bis hin zu sechs Monaten (rechts) zu. Vergrößerung: 100x.

Die histologische Charakterisierung von unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Erstaunlicherweise konnte in beiden Mauslinien eine nicht induzierte Entzündung des Pankreas beobachtet werden, die in den Kras Mäusen stärker ausfiel als in den Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen. Aber auch hier waren die Unterschiede nicht signifikant.

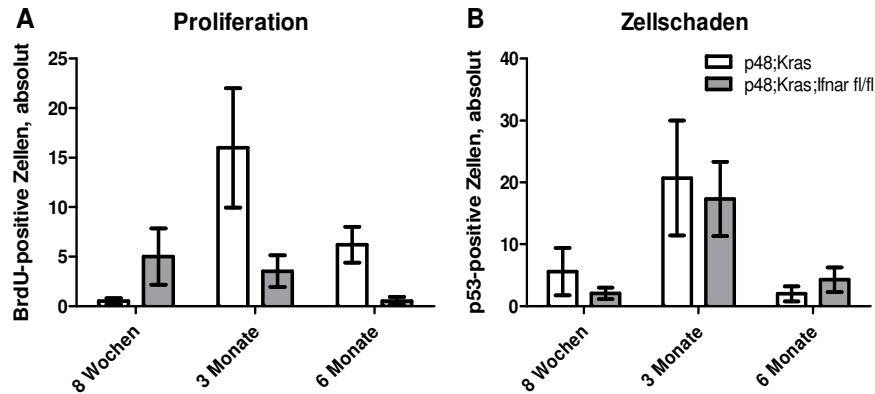
### 3.7.2 Analyse der Proliferation und der Zellschädigung in unbehandelten p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup> und p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen

Neben histologischen Analysen wurden mittels immunhistochemischen Färbungen auch die Proliferation und die Beschädigung der Zellen in den beiden Mauslinien im Verlauf der Alterung verglichen. Die Auswertungen des Proliferationsmarkers BrdU zeigten dabei, dass acht Wochen alte Kras Mäuse mit durchschnittlich einer Zelle pro Bildausschnitt weniger proliferierende Zellen aufwiesen als gleichaltrige Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit fünf BrdU-positiven Zellen pro Bildausschnitt. Dieses Verhältnis änderte sich nach drei Monaten; ab diesem Zeitpunkt zeigten Kras Mäuse eine ausgeprägtere Proliferation (16 positive Zellen) im Vergleich zu Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen (vier positive Zellen). Insgesamt zeigten die Analysen, dass in beiden Mauslinien nach sechs Monaten die Proliferation stark zurück ging (Kras: sechs Zellen, Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup>: eine Zelle; Abb. 29 A). Die Analyse der Zellbeschädigung mit Hilfe des Markers p53 zeigte bei beiden Genotypen einen geringen Schaden im Alter von acht Wochen sowie sechs Monaten, mit jeweils nicht mehr als fünf p53-positiven Zellen pro



## Ergebnisse

Bildausschnitt. Drei Monate alte Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse wiesen mit 18- 20 positiven Zellen eine deutlichere Schädigung auf (Abb. 29 B). Signifikante Unterschiede im Vergleich der beiden Mauslinien gab es hierbei nicht.



**Abb. 29: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von BrdU-positiven und p53-positiven Zellen in unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit einem BrdU oder p53 Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl proliferierender (A) oder geschädigter Zellen (B) zwischen beiden Genotypen. Gruppengröße: n=3.

Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl in drei Monate alten Kras als auch in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen starke Veränderungen im Pankreasgewebe auftraten, gekennzeichnet durch eine hohe Zellproliferation und Gewebeschädigung.

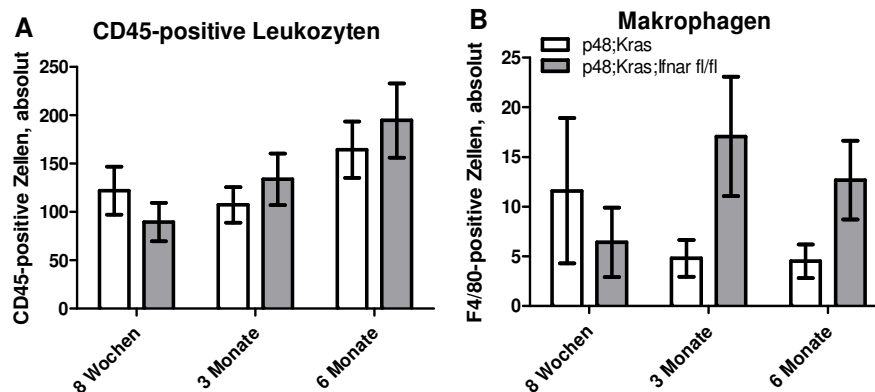
### 3.7.3 Analyse der allgemeinen Immunzell- und Makrophagen-einwanderung in den unbehandelten Mausmodellen

In Abschnitt 3.2.3 konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung des Interferon Signalwegs während der Pankreatitis zu einer veränderten Immunzelleinwanderung führte. Ebenso wurde unter Punkt 3.7.1 die Infiltration von Immunzellen in unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen beobachtet. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Unterbrechung des Type I Interferon Signalwegs im Kras-Modell bereits ohne die Induktion einer Pankreatitis zu einer geänderten Immunantwort im Laufe des Alterungsprozess der Mäuse führt.

Der Vergleich der Anzahl an eingewanderten Immunzellen in unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen wies eine Zunahme der Infiltration an CD45-positiven Immunzellen im Alter von acht Wochen bis sechs Monaten auf. Abb. 30 A veranschaulicht den Anstieg der Immunzellen in Kras Mäusen von 110 auf 160 CD45-positiven Zellen und in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen von 90 auf 190 positive Zellen pro Bildausschnitt. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen innerhalb eines Zeitraumes. Die

## Ergebnisse

Analyse der Makrophagen zeigte in acht Wochen alten Tieren mehr F4/80-positive Makrophagen in Kras (elf positive Zellen) als in Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen (sechs positive Zellen). Dies änderte sich nach drei Monaten: im Alter von drei und sechs Monaten wiesen Kras Mäuse weniger eingedrungene Makrophagen (drei und sechs Monate: fünf Zellen) als die jeweils gleichaltrigen Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse auf (drei Monate: 17 Zellen; sechs Monate: 12 Zellen) (Abb. 30 B).



**Abb. 30: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von CD45-positiven Immunzellen und F4/80-positiven Makrophagen in unbehandelten Kras und Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit einem CD45 oder F4/80 Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. Dabei zeigte sich ein Anstieg an Immunzellen in Kras und Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen im Laufe der Alterung (A). Die Infiltration von Makrophagen war in älteren Kras Mäusen geringer im Vergleich zu Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen (B). Gruppengröße: n=3.

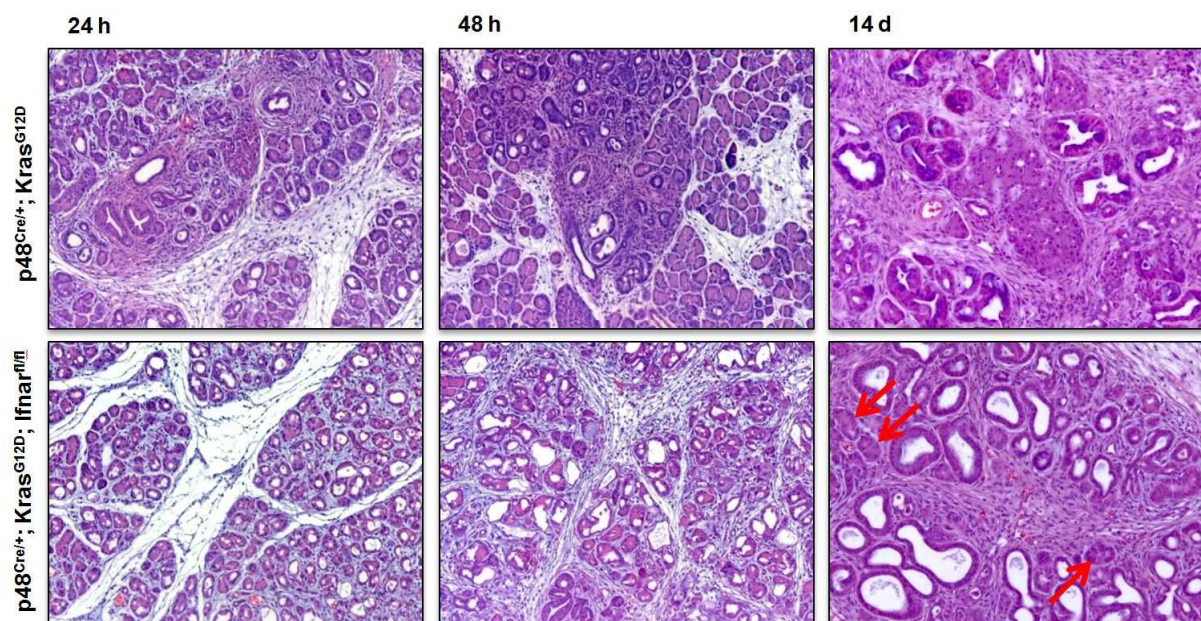
Die Analyse der CD45-positiven Immunzellen bestätigte den unter Punkt 3.7.1 gewonnenen Eindruck der Zunahme an Immunzellen im Verlauf der Alterung der Tiere. Signifikante Unterschiede zwischen den Kras und Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen, auch bei der Betrachtung der Makrophageneinwanderung, konnten dabei nicht festgestellt werden.

### 3.8 Vergleichende Analysen von p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup> und p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup>; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen nach Caerulein-Behandlung

Um die Auswirkungen des Unterbrechens des Interferonsignalwegs in der Entzündungsphase sowie der damit verbundenen Tumorentwicklung zu beschreiben, wurden sowohl Kras als auch Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse mit Caerulein behandelt und die daraus entstehenden Folgen analysiert.

## 3.8.1 Histologische Analysen und "Grading" der beiden Genotypen nach Caerulein-Behandlung

Histologische Färbungen verschafften einen ersten Überblick über den Entzündungsverlauf in beiden Genotypen. Bereits 24 Stunden nach Behandlungsende wiesen die Analysen H/E-gefärbter Schnitte behandelter Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse ein Bild der starken Gewebeerstörung auf. Abb. 31 zeigt in beiden Genotypen eine erste Degranulierung der Azini, einhergehend mit einer starken Immunzelleinwanderung und stromaler Aktivierung (Abb. 31, links). Dieses Bild setzte sich auch 48 Stunden nach der letzten Caerulein-Injektion fort: Der Anteil an intaktem Gewebe nahm sowohl in Kras als auch Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen ab (Abb. 31, Mitte). 14 Tage nach der Behandlung setzte sich der Großteil des Gewebes in beiden Mauslinien aus großen Läsionen umgeben von Stroma zusammen. Wie in Abb. 31 zu erkennen, konnten einzig in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen zu diesem Zeitpunkt noch vereinzelt intakte Azinuskomplexe detektiert werden (Abb. 31, rechts, rote Pfeile).

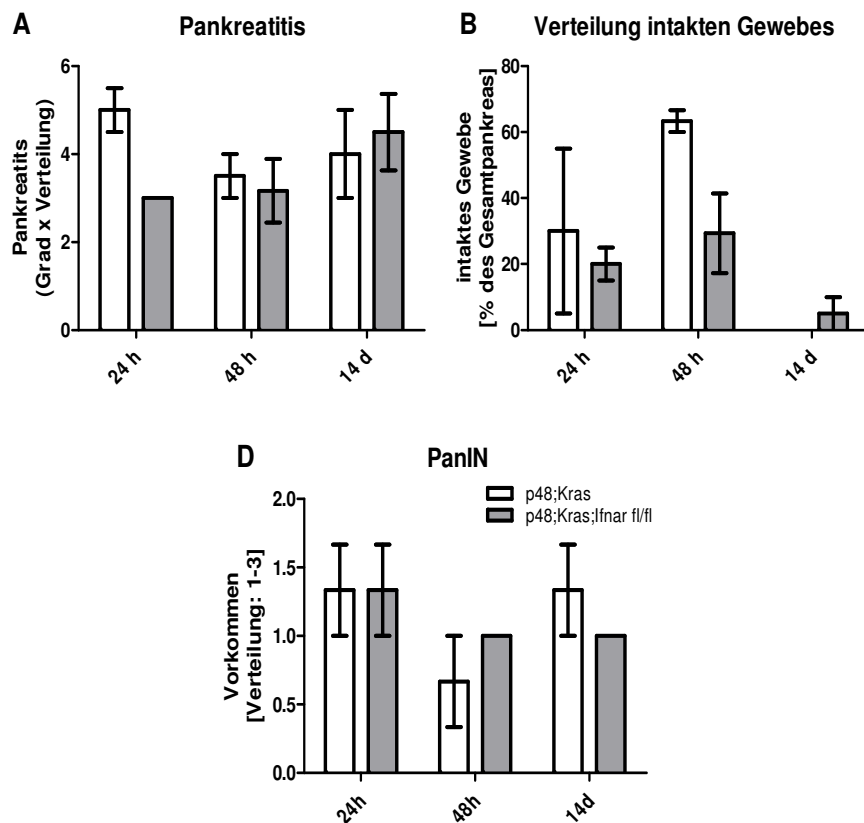


**Abb. 31: Histologische Gewebesanalysen von Caerulein-behandelnten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.** Formalinfizierte Paraffinschnitte wurden H/E gefärbt. Die Färbung zeigte einen größeren Anteil an intaktem Pankreasgewebe in Kras Mäusen 24 (links) und 48 Stunden (Mitte) nach Caerulein-Behandlung. 14 Tage nach Behandlung war in Kras sowie Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen kaum bis kein normales Gewebe mehr vorhanden (rechts). Vergrößerung: 100x.

Die Quantifizierung der induzierten Pankreatitis ergab, dass Kras Mäuse zunächst eine schwere Pankreatitis mit einem Grad von 5 entwickelten (24 h), die sich zu späteren Zeitpunkten (48 h und 14 d) wieder leicht auf 3,5 bis 4 abschwächte. Dahingegen wiesen Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse in den ersten 48 Stunden mit einem Schweregrad von 3 eine mildere Form der Pankreasentzündung auf, die nach 14 Tagen auf Grad 4,5 zunahm. Signifikante Unterschiede zwischen Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen waren dabei nicht vorhanden (Abb. 32

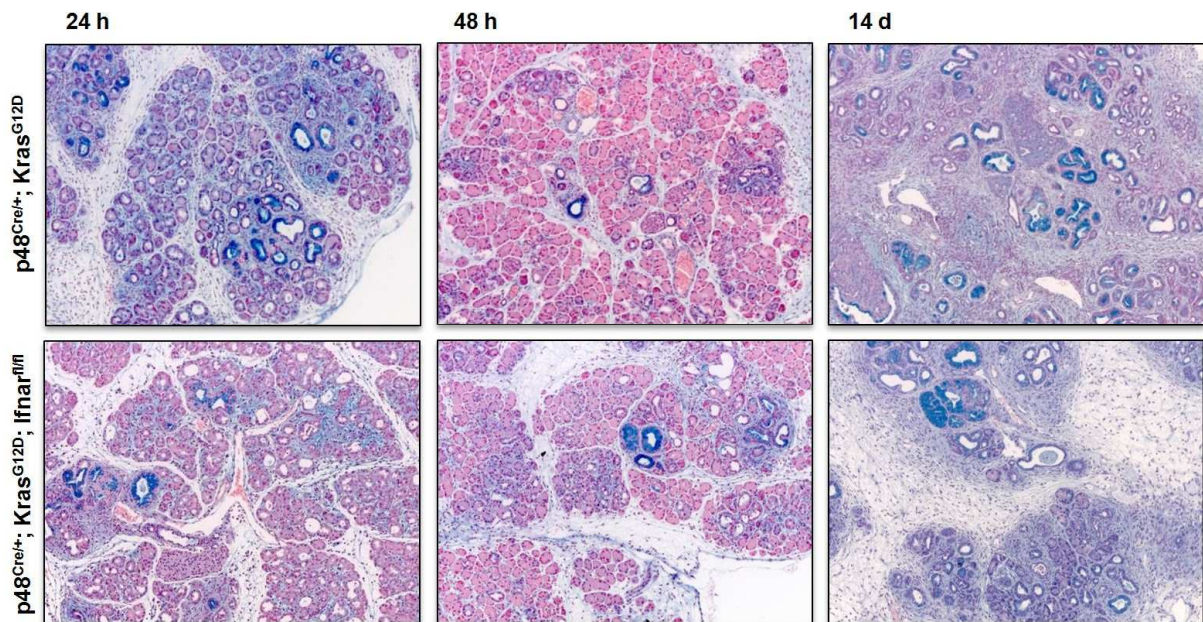
## Ergebnisse

A). Die Verteilung intakten Gewebes zeigte, dass Kras Mäuse zunächst noch einen recht hohen Anteil, nach 24 Stunden etwa 30 % und nach 48 Stunden über 60 %, an intaktem Gewebe aufwiesen. Nach 14 Tagen war jedoch in dieser Mauslinie kein gesundes Gewebe mehr zu finden. Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse hatten schon 24 bis 48 Stunden nach Caerulein-Behandlung nur noch wenige intakte Gewebereste, zwischen 20- 30 %, zeigten dafür aber auch nach 14 Tagen mit 5 % noch einzelne intakte azinäre Strukturen (Abb. 32 B). Der Vergleich intraepithelialer Neoplasien zeigte mit Werten von 1,3 bei einer Verteilung von 0 bis 3, ein geringes Vorkommen 24 Stunden nach Behandlung. Nach 48 Stunden konnte ein leichter Rückgang der PanINs auf Werte von 0,6 bei Kras und 1 bei Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen beobachtet werden. Während die Zahl der Neoplasien in Kras Mäusen nach 14 Tagen nochmals leicht anstieg, wiederum auf einen Wert von 1,3, blieb das Niveau in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen erhalten (Abb. 32 C).



**Abb. 32: Quantifizierung der Pankreatitis und pankreatitisbezogener Parameter in Caerulein-behandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.** Analysiert wurden die Pankreatitis (A), welche aus der Multiplikation des Grades mit der Verteilung der Entzündung berechnet wurde, die Verteilung intakten Gewebes (B), der Schweregrad der Ödeme (C) sowie das Vorkommen intraepithelialer Neoplasien (D). Analysiert wurden dabei Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse 24 und 48 Stunden und 14 Tage nach Caerulein-Behandlung. Gruppengröße: n=3.

Die Veränderung in der Anzahl der Neoplasien in Kras und in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen 24 und 48 Stunden sowie 14 Tage nach Caerulein-Behandlung wurden in Abb. 33 anhand der "Alcian Blue"-Färbung veranschaulicht.



**Abb. 33: Histologische Detektion intraepithelialer Neoplasien (PanINs) in Caerulein-behandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen.** Formalinfizierte Paraffinschnitte wurden mit „Alcian Blue“ und „Nuclear Fast Red“ gefärbt. Die Anzahl der blau gefärbten PanINs war 24 Stunden nach Behandlung gering (links) und nahm nach 48 Stunden in beiden Genotypen leicht ab (Mitte). 14 Tage nach Behandlung stieg die Zahl der PanINs in Kras Mäusen nochmals leicht an (rechts). Vergrößerung: 100x.

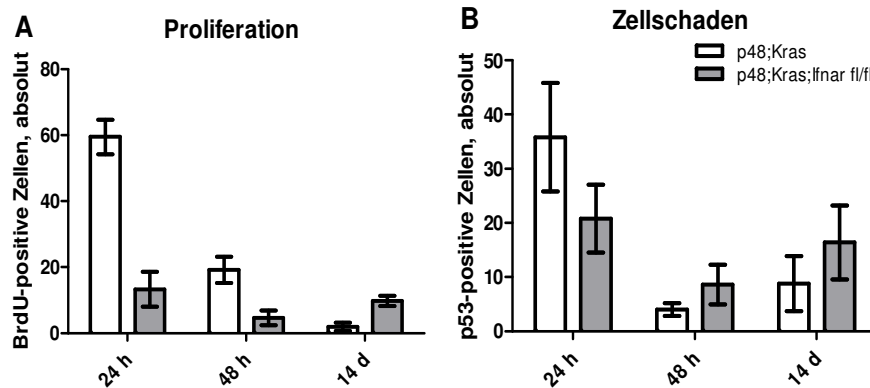
Diese Ergebnisse zeigten keine gravierenden Unterschiede in der Morphologie Caerulein-behandelter Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse weder nach 24 und 48 Stunden noch nach 14 Tagen.

### 3.8.2 Analyse der Proliferation und der Zellschädigung in p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup> und p48<sup>Cre/+</sup>; Kras<sup>G12D</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein-Behandlung

Um zu überprüfen, ob eine induzierte Pankreatitis zu einer veränderten Proliferation und Schädigung der Zellen in Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein-Behandlung führt, wurden immunhistochemische Färbungen der Marker BrdU und p53 durchgeführt. Die Färbungen und anschließende Auswertungen des Proliferationsmarkers BrdU, graphisch dargestellt in Abb. 34, ergaben mit 60 positiven Zellen eine hohe Anzahl proliferierender Zellen in Kras Mäusen 24 Stunden nach der letzten Caerulein-Injektion. Mit 20 BrdU-positiven Zellen nach 48 Stunden und zwei positiven Zellen pro Bildausschnitt nach 14 Tagen sank diese Zahl stark ab. In Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen blieb die Proliferation über alle beobachteten Zeitpunkte hinweg mit einer Anzahl zwischen fünf bis 15 BrdU-positiven Zellen gering (Abb. 34 A). Kras Mäuse zeigten 24 Stunden nach Behandlung eine starke Zellschädigung mit 35 positiven Zellen. Diese nahm nach 48 Stunden auf fünf positive Zellen ab, bevor sie nach 14 Tagen nochmal verstärkt auftrat mit acht positiven Zellen. Den

## Ergebnisse

gleichen Verlauf der Ausprägung des Zellschadens zeigten auch *Kras*; *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse, mit zunächst 20 p53-positiven Zellen nach 24 Stunden, acht positiven Zellen nach 48 Stunden und 15 positiven Zellen nach 14 Tagen. (Abb. 34 B).



**Abb. 34: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von BrdU-positiven und p53-positiven Zellen in *Kras* und *Kras*; *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen 24 und 48 Stunden sowie 14 Tage nach Caerulein-Behandlung.** Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden mit einem BrdU oder p53 Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. Dabei zeigte sich eine starke Proliferation in *Kras* Mäusen direkt nach der Behandlung (A). 24 Stunden nach Behandlung wiesen *Kras* Mäuse ebenfalls eine hohe Anzahl an geschädigten Zellen auf. Gruppengröße: n=3.

Die Induktion einer Pankreatitis führte in *Kras* Mäusen zu einer stärkeren Proliferation 24 Stunden nach letzter Caerulein-Injektion im Vergleich zu *Kras*; *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen; signifikante Unterschiede in der Analyse des Zellschadens zwischen beiden Genotypen konnten dabei nicht festgestellt werden.

### 3.8.3 Analyse der allgemeinen Immunzell- und Makrophagen-einwanderung in den Caerulein-behandelten Mausmodellen

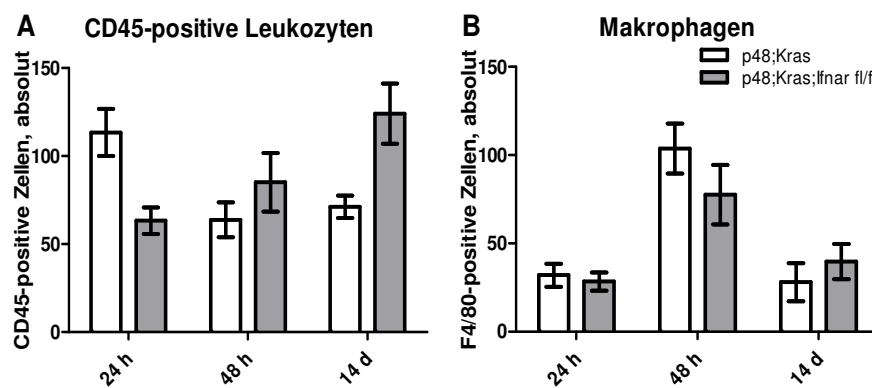
Unter Punkt 3.2.3 konnte gezeigt werden, dass *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse nach einer Caerulein-induzierten Pankreatitis eine veränderte Immunzellinfiltration in den Pankreas aufwiesen. Sie zeigten im Vergleich zu WT Mäusen eine insgesamt geringere Anzahl eingewanderter Immunzellen, zu sehen in Abb. 13 A. Dabei war interessanterweise die Zahl infiltrierter Makrophagen in den *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen zu Beginn der Entzündungsphase signifikant erhöht gegenüber den WT Mäusen, zu sehen in Abb. 14. Um zu analysieren, ob dieser Effekt auch in den *Kras* bzw. *Kras*; *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen auftrat, wurden spezifische immunhistochemische Färbungen gegen den allgemeinen Immunzellmarker CD45 und den Makrophagen-Marker F4/80 gemacht.

Die Analyse der Immunzellinfiltration nach einer induzierten Pankreatitis in *Kras* und *Kras*; *lfnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen ist in Abb. 35 veranschaulicht. 24 Stunden nach Behandlungsende zeigten

## Ergebnisse

Kras Mäuse mit 120 CD45-positiven Zellen eine starke Einwanderung an Immunzellen. Die Anzahl der rekrutierten Immunzellen sank ab 48 Stunden auf 60 positive Zellen ab und stagnierte auf diesem niedrigeren Niveau. Im Gegensatz dazu stieg die Zahl der infiltrierten Zellen in Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen zwischen 24 Stunden, 48 Stunden und 14 Tagen stetig an, von 60 über 80 auf 120 CD45-positive Zellen (Abb. 35 A).

Die Anzahl an Makrophagen war in beiden Genotypen nach 24 Stunden und 14 Tagen mit 30- 40 F4/80-positiven Zellen auf einem geringen Level und zeigte, ebenfalls sowohl in Kras als auch Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen, einen "Peak" nach 48 Stunden. Dabei wiesen Kras Mäuse zu diesem Zeitpunkt 100, Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse 80 F4/80-positiven Makrophagen pro Bildausschnitt auf. (Abb. 35 B).



**Abb. 35: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von CD45-positiven Immunzellen und F4/80-positiven Makrophagen in Kras und Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen 24 und 48 Stunden sowie 14 Tage nach Caerulein-Behandlung.** Formalinfizierte Paraffinschnitte wurden mit einem CD45 oder F4/80 Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin gegengefärbt und die absolute Anzahl der positiven Zellen auf fünf Bildern pro Gewebeschnitt/Maus ausgezählt. Dabei zeigte sich eine abnehmende Einwanderung in Kras und zunehmende Immunzelleinwanderung in Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen zwischen 24 Stunden und 14 Tagen (A). Die Infiltration von Makrophagen erreichte 48 Stunden nach Behandlung in beiden Genotypen ihren Höhepunkt (B). Gruppengröße: n=3.

Die Analyse der Immunzellinfiltration zeigte in Kras Mäusen eine abnehmende Zahl an eingewanderten Zellen während in Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen eine zunehmende Immunzelleinwanderung zwischen 24 Stunden und 14 Tagen beobachtet werden konnte. Die Infiltration der Makrophagen war nach 24 Stunden und 14 Tagen auf einem niedrigen Niveau und zeigte nach 48 Stunden ihren Höhepunkt in beiden Genotypen.

Die Beobachtungen einer stark veränderten Immunzelleinwanderung bzw. Makrophageninfiltration nach Induktion einer Pankreatitis, wie sie in *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen beobachtet werden konnte, konnte in Kras; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen nicht bestätigt werden.

### 4 Diskussion

Die akute Pankreatitis ist mit einer Inzidenz von 10- 46 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner einer der häufigsten Gründe für einen stationären Krankenhausaufenthalt in Deutschland, den USA und anderen Ländern (Lankisch et al., 2015). Definiert ist die Pankreatitis als eine lokale Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Hervorgerufen wird diese Entzündung durch die vorzeitige Aktivierung und Freisetzung von Verdauungsenzymen durch die Azini des Pankreas, was zu einem Selbstverdau des Organs führt. Die zunächst lokale Entzündungsreaktion ruft die Aktivierung des Immunsystems hervor und führt zu einer allgemeinen Immunantwort. Die Hauptursachen für die Entstehung einer Pankreatitis sind neben Gallensteinen und Übergewicht vor allem der Alkoholmissbrauch (Ashurst et al., 2014; Bonfrate, Wang, Garruti, & Portincasa, 2014; Lankisch et al., 2015). Dieser führt zu einer direkten Schädigung der Azini und dadurch zur Entstehung der Pankreatitis (Barreto & Saccone, 2010; Criddle, 2015; Tapia, Salido, & Gonzalez, 2010). Während einer Pankreatitis schütten azinäre Zellen jedoch nicht nur Verdauungsenzyme aus, sondern produzieren auch Zytokine und Chemokine. Diese Zytokine sind wichtige Mediatoren der Immunantwort (Makhija & Kingsnorth, 2002). Welche konkrete Rolle speziell Typ I Interferone in der Vermittlung der Entzündung bekleiden, ist derweil noch nicht vollständig geklärt. Auf der einen Seite inhibieren sie die Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-1 (Guarda et al., 2011; van Holten et al., 2004), auf der anderen Seite sind sie essentiell für die Produktion von Chemokinen (Dorhoi et al., 2014; Stock, Smith, & Carbone, 2014). Mittels Chemokinen werden während einer Entzündungsreaktion Immunzellen zu den betroffenen Regionen gelotst. Zytokine sind dagegen für die Aktivierung, Differenzierung und Polarisierung von Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen, verantwortlich (Mantovani et al., 2004; Stetson & Medzhitov, 2006; Stock et al., 2014). Basierend auf diesen Erkenntnissen war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der Signalweiterleitung der Typ I Interferone im Verlauf einer Pankreatitis und der nachfolgenden Regeneration *in vivo* zu untersuchen. Da die Pankreatitis ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Bauchspeicheldrüsenkrebs ist (Duell et al., 2012; Yeo, 2015), sollte darüber hinaus auch die Auswirkungen des IFNAR1 „knockout“ im Kras-Tumormausmodell analysiert werden.

#### 4.1 Vergleichende Analysen unbehandelter C57-B16/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse

Für die Erstbeschreibung der neu generierten p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse (Ifnar<sup>fl/fl</sup>) wurden zunächst unbehandelte Tiere mit den Kontrollmäusen C57-B16/J (WT) verglichen.



Erste histologische Analysen der Pankreata beider Mauslinien zeigten intakte azinäre Strukturen ohne weitere Anomalien im Aufbau des Organs (Abb. 6). Ebenso ergaben die Kontrolle des Körper- und Pankreasgewichts der  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse keine Abweichungen im Vergleich zu den WT Mäusen (Abb. 7). Analysen der für eine Pankreatitis charakteristischen Entzündungswerte Amylase, Lipase, Kalzium und LDH zeigten ebenso keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 8). Der "knockout" der Untereinheit 1 des Interferonrezeptors hatte offensichtlich keinen Einfluss auf das Wachstum und die Vitalität der  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse. Dieser Umstand könnte dadurch erklärt werden, dass Interferone überwiegend in der Immunregulation eine bedeutende Rolle spielen und ohne Stimuli, wie eine Entzündung, keinen großen Einfluss auf den Organismus haben (Pestka et al., 2004).

### 4.2 Vergleichende Analysen von C57-B16/J und

#### **p48<sup>Cre/+</sup>; $lfnar^{fl/fl}$ Mäusen nach Caerulein- induzierter Pankreatitis**

Interferone sind eine Untergruppe der Zytokine, die nicht nur bei der Vermittlung der Apoptose in geschädigten Zellen eine Rolle spielen (Clemens, 2003; Keay & Grossberg, 1980), sondern vor allem eine immunmodulierende Wirkung aufweisen (Greiner et al., 1984; Ortaldo et al., 1983; Ozzello et al., 1995; Rehberg et al., 1982). Ausschlaggebend für die Signalweiterleitung ist dabei der aus zwei Untereinheiten bestehende Interferonrezeptor IFNAR (de Weerd et al., 2007). Basierend auf diesen Erkenntnissen sollten die Auswirkungen des "knockout" der Untereinheit 1 (IFNAR1) dieses Rezeptors auf den Verlauf der Pankreasentzündung und darauf folgenden Regeneration *in vivo* analysiert werden. Dafür wurden sowohl WT als auch  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse mit Caerulein behandelt und dadurch eine Pankreatitis induziert.

Histologische Analysen der Pankrata der beiden Genotypen zeigten dabei gravierende Unterschiede. Das "Grading" H/E gefärbter Gewebeschnitte zeigte in WT Mäusen eine, mit nur noch 0- 5 % intakter Azini, organübergreifende Zerstörung des Gewebes und eine ausgeprägte Metaplasiebildung, die bis zu 27 % des gesamten Pankreas betraf. Damit einher ging in der Entzündungsphase eine schwere Pankreatitis (Abb. 9 und 11). Im Gegensatz dazu wiesen  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse während der Entzündungsphase mit 55- 90 % intakter azinärer Strukturen und 10 % azinärer-zu-duktales-Metaplasie nur eine geringfügige Gewebeerstörung und -veränderung auf. Auch zeigten  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse lediglich eine milde Pankreatitis (Abb. 9 und 11). Die Berechnung der Gesamtpankreatitis ergab sich dabei aus der Multiplikation des Grades mit der Verteilung der Entzündung. Erstaunlich ist hierbei, dass der Grad der Entzündung zwischen WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen keine Unterschiede zeigte. Sowohl WT als auch  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse entwickelten innerhalb der ersten 24- 48 Stunden eine

## Diskussion

---

schwere Entzündung. Während diese in WT Mäusen über das komplette Pankreas verteilt war, blieb sie in  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen lokal eingeschränkt. (Abb. 9 und 11). Somit erklärt sich, trotz einer starken Entzündungsreaktion in beiden Mauslinien, basierend auf der unterschiedlichen Verteilung der Entzündung, der Unterschied in der Gesamtpankreatitis während der Entzündungsphase. Während der Regenerationsphase waren die Unterschiede zwischen beiden Genotypen nicht mehr so stark ausgeprägt. Durch die Rückbildung der ADMs und Regeneration des Gewebes näherten sich WT Mäuse im Laufe der Regeneration wieder den Werten der  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse an. Sowohl WT als auch  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse regenerierten innerhalb von 14 Tagen wieder vollständig (Abb. 10 und 11).

Die Unterschiede zwischen den WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen während der Pankreatitis und der folgenden Regeneration blieben also auf die Entzündungsphase und dabei auf die Ausbreitung der Entzündung beschränkt. Die Studien von Bhattacharya et al. konnten zeigen, dass ein gezielter Abbau des IFNAR1 durch Ubiquitinierung und eine dadurch bedingte Signalunterbrechung der Typ I Interferone in Mäusen erforderlich für den Rückgang einer Entzündung ist. Mäuse, die die Untereinheit des Rezeptors durch Mutation nicht abbauen konnten, entwickelten eine anhaltende, schwere Caerulein-induzierte Pankreatitis (Bhattacharya et al., 2014). Typ I Interferone und speziell IFNAR1 scheinen daher einen Einfluss auf den Entzündungsverlauf zu haben. Allerdings muss hier beachtet werden, dass es sich bei den in Bhattacharyas Experimenten verwendeten Mäusen um globale "knockin" Mäuse handelt, was einen direkten Vergleich mit den Ergebnissen der  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse erschwert.

Neben der Morphologie der WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse sollte auch untersucht werden, ob die Unterbrechung des Interferonsignals Auswirkungen auf die Zellschädigung und Proliferation nach Caerulein-induzierter Pankreatitis hat. Dafür wurden histochemische Färbungen zur Detektion des Gewebeschadens sowie der Zellproliferation durchgeführt. Analysen der Zellschädigung zeigten dabei keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Sowohl WT als auch  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse wiesen während der Entzündungsphase einen ausgeprägten Zellschaden auf. In der Regenerationsphase war dagegen kaum noch eine Beschädigung der Zellen auszumachen (Abb. 12 A). Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien zeigten dabei die Auswertung der BrdU-Färbung. Dabei proliferierten während der Entzündungsphase in den  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen 30 bzw. 50 % mehr Azini als in den WT Mäusen (Abb. 12 B). Dass Typ I Interferone einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Proliferation von Immunzellen haben, ist mehrfach beschrieben. So konnten verschieden Studien eine aktivierende Wirkung auf NK-Zellen wie auch T-Lymphozyten nachweisen (Brinkmann, Geiger, Alkan, & Heusser, 1993; Keppler, Rosenits, Koegl, Vucikuj, & Aichele, 2012; Semenzato et al., 1986; Werner-Wasik, von Muenchhausen, Nolan, & Cohen, 1989).

Ebenso ist die anti-proliferative Wirkung der Interferone bereits intensiv untersucht worden (Bekisz, Baron, Balinsky, Morrow, & Zoon, 2010; Li, Srivastava, & Plataniias, 2004; Parmar & Plataniias, 2003) Das direkte Zusammenspiel von Interferonen und der Proliferation der Azini ist hingegen noch weitestgehend unerforscht. Studien zu diesem Thema von Schneckeleithner et al. zeigten, dass eine Unterbrechung der Interferonsignalkaskade durch "knockout" von Stat1 zu einer erhöhten Proliferation von epithelialen Zellen des Brustgewebes führte (Schneckeleithner et al., 2011). Diese Beobachtungen spiegelten sich durch die hier gezeigten Ergebnisse auch in den Azini des Pankreas wieder. Somit konnte erneut gezeigt werden, dass Typ I Interferone auch einen direkten, inhibierenden Einfluss auf die Proliferation azinärer Zellen besitzen.

### **4.3 Analysen der Immunzellzusammensetzung in C57-B16/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach Caerulein- induzierter Pankreatitis**

Eine weitere Auffälligkeit im Vergleich zwischen WT und Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen während einer Caerulein-induzierten Pankreatitis war die unterschiedliche Einwanderung von Immunzellen. Bereits bei der Analyse der H/E-gefärbten Gewebeschnitte war in den WT Mäusen eine starke Infiltration an Immunzellen in das geschädigte Pankreas zu erkennen. Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse zeigten dagegen, wie in Abb. 9 und 10 zu erkennen, kaum eingewanderte Immunzellen. Dieser Eindruck wurde durch spezifische immunhistochemische Färbungen bestätigt: WT Mäuse wiesen in der Entzündungsphase durchschnittlich 33 % mehr eingewanderte Immunzellen auf als Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse (Abb. 13). Die weitere Analyse verschiedener Immunzelltypen zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an T- oder B-Lymphozyten sowie der neutrophiler Granulozyten (Abb. 13). Äußerst interessant war allerdings die Auswertung der Makrophagen-Färbung. Während WT Mäuse in der Entzündungsphase und der frühen Regeneration eine sehr geringe Einwanderung dieser Immunzellen zeigten, wiesen Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse zwei- bis dreimal so viele eingewanderte Makrophagen auf. Dies änderte sich in der späteren Regenerationsphase. Fünf Tage nach Behandlungsende wanderten signifikant mehr Makrophagen in das Pankreas der WT Mäuse ein; die Zahl der Makrophagen in Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen sank dabei stark ab (Abb. 14). WT Mäuse zeigten den in der Literatur beschriebenen Verlauf der Makrophageneinwanderung in ein verletztes Areal: zu Beginn einer Entzündung sind meist nur wenige Makrophagen in den betroffenen Geweben anzufinden. Die Infiltration beginnt erst in der Regenerationsphase (Kumar, Abbal, Fausto, & Aster, 2009). Dies hängt vor allem mit der Physiologie der Makrophagen zusammen. Makrophagen sind keine gewebeansässigen Immunzellen,

sondern zirkulieren in Form ihrer Vorläufer, der Monozyten, im Blutstrom. Erst durch endogene Stimuli, wie Chemokine, als Antwort auf eine Entzündung, migrieren Monozyten aus dem Blut in verschiedene Gewebearten. Dort differenzieren sie dann, unter Einfluss weiterer Zytokine, in gewebespezifische Makrophagen (Gordon & Taylor, 2005; Stefater et al., 2011). Dieser Vorgang der Anlockung, Differenzierung und Polarisierung nimmt im Schnitt drei Tage in Anspruch, was die späte Detektion der Makrophagen in den WT Mäusen erklärt. Demnach zeigten  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse eine ungewöhnlich frühe Einwanderung von Makrophagen in das verletzte Pankreas.

#### **4.4 Analyse des Einfluss der Makrophagen auf den Entzündungsverlauf und die Regeneration**

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte geklärt werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der frühen Infiltration von Makrophagen und der limitierten Pankreatitis in  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen besteht. Dazu wurden als nächstes spezifisch die Makrophagen über Gabe von Clodronat während dem Verlauf der Pankreatitis und Regeneration in WT als auch  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen eliminiert (Abb. 15 und 16). Die histologischen Auswertungen und ein "Grading" der Gewebeschnitte zeigten, dass die Depletion der Makrophagen auf den Entzündungs- und Regenerationsprozess der WT Mäuse keinerlei Einfluss hatte (Abb. 16 und 17). Interessanterweise zeigten  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse, ohne die eingewanderten Makrophagen, eine organübergreifende Gewebeschädigung mit 90 % zerstörtem Gewebe, einhergehend mit der Bildung von ADMs, die etwa 20 % des Gesamtpankreas einnahmen. Desweiteren entwickelten  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse in Abwesenheit der Makrophagen eine Pankreatitis, die in ihrem Ausmaß nicht mehr von der Pankreatitis der WT Mäuse unterschieden werden konnte (Abb. 16 und 17). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der gewebesetzende und entzündungseindämmende Effekt vermutlich durch die frühe Einwanderung der Makrophagen in  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen vermittelt wurde.

Um auszuschließen, dass diese schützende Wirkung durch andere Immunzellen hervorgerufen wurde, wurden erneut T- und B-Lymphozyten sowie Neutrophile untersucht. Es zeigten sich dabei keine Veränderung im Vergleich des Regenerationsmodells mit dem Depletionsmodell sowie der beiden Genotypen untereinander (Abb. 18). Dies bedeutet, dass der Pankreatitis-limitierende Phänotyp der  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse höchstwahrscheinlich auf die vorzeitige Einwanderung der Makrophagen zurück zu führen war.

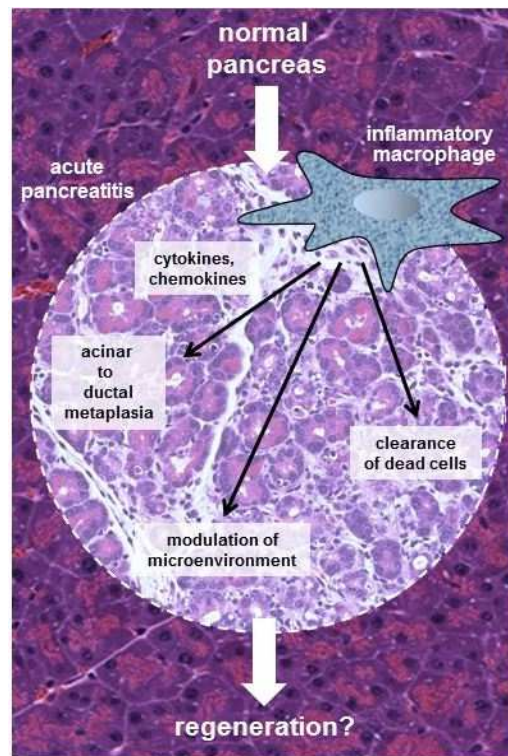
Nachdem die verfrühte Einwanderung der Makrophagen als Ursache für die lokal eingeschränkte Pankreatitis in den  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen ausgemacht werden konnte (Abb. 16),

## Diskussion

---

stellte sich nun die Frage, welche Mechanismen hinter diesem gewebeschützenden Effekt stehen.

Die Ausdifferenzierung der Monozyten in Makrophagen schließt mit der Polarisierung der Makrophagen in die zwei Subklassen M1/M2 ab (Mosser & Edwards, 2008; O'Shea & Paul, 2010). Dabei wird M1 Makrophagen eine entzündungsfördernde, M2 Makrophagen dagegen eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben (Gordon & Taylor, 2005; Mantovani et al., 2011; Sica et al., 2008). Um zu prüfen, welcher Subklasse die jeweils eingewanderten Makrophagen angehören, sollte eine Phänotypisierung gemäß der M1/M2 Klassifikation anhand ihrer Oberflächenmarker durchgeführt werden. Dazu wurden aus dem Pankreas Caerulein-induzierter Mäuse F4/80+/CD11b+-doppelt positive Makrophagen heraus sortiert. Diese Zellen wurden danach anhand des M1-Markers Ly6C und des M2-Markers CD206 weiter charakterisiert. Dabei zeigte sich in den WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen eine sehr kleine Population an CD206+ Makrophagen (10- 14 %). Ebenfalls beide Mauslinien wiesen eine Population an CD206+/Ly6C+-doppelt positiven Zellen auf (30- 32 %). Bedingt durch den frühen Zeitpunkt der Analyse könnte es sich dabei um Makrophagen handeln, die sich noch im Stadium der Polarisierung befinden (Gordon & Taylor, 2005; Stefater et al., 2011). Überraschenderweise zeigten sowohl WT als auch *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse einen großen Anteil an Ly6C+ Makrophagen (42- 45 %) (Abb. 20). Diese Makrophagen können laut Klassifizierung der Subklasse der M1 Makrophagen zugeordnet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die limitierte Entzündungsreaktion in den *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen auf der frühen Einwanderung der M1 Makrophagen basiert (Abb. 16 und 20). Dies ließ vermuten, dass auch M1 Makrophagen eine entzündungseindämmende Wirkung aufweisen können. So konnten Hao et al. zeigen, dass M1 Makrophagen nicht nur sterbende und tote Zellen durch Phagozytose eliminieren, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der entzündungsvermittelten Gewebeerneuerung spielen (Hao et al., 2012). Ebenso schrieben Liou und Storz M1 Makrophagen einen Einfluss auf die Mikroumgebung und die Generation von Vorläuferzellen zu, die wiederum zur Regeneration nach Verletzung beitragen. Dargestellt ist dieser Mechanismus in Abb. 36.



**Abb. 36: Einfluss entzündungsfördernder Makrophagen auf die Regeneration nach einer akuten Pankreatitis**, aus Liou und Storz (Liou & Storz, 2015).

Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass durch die frühe Infiltration der Makrophagen die Entzündung eingedämmt werden könnte. Dies könnte durch die Phagozytose geschädigter Azini vermittelt worden sein, bevor diese in der Lage waren, entzündungsfördernde Zytokine auszuschütten (Gukovskaya et al., 1997). Die Entzündung könnte also eingeschränkt worden sein, bevor sie sich über das gesamte Organ ausbreiten konnte.

## 4.5 Analyse des Zytokinprofils in C57-B16/J und $p48^{Cre/+}; Ifnar^{fl/fl}$ Mäusen nach Caerulein- induzierter Pankreatitis

Die Einwanderung der Monozyten in das Gewebe und die Differenzierung in Makrophagen erfordern endogene Stimuli wie Zytokine (Callewaere et al., 2007; Gordon & Taylor, 2005; Stefater et al., 2011). Um die Ursache für die frühzeitige Einwanderung der Makrophagen in den  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen zu untersuchen, sollte die Expression verschiedener Zytokine in WT und  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen verglichen werden. Dafür wurden sowohl Caerulein-behandelte als auch unbehandelte Tiere analysiert. Die Expressionsprofile der behandelten Mäuse unterschieden sich dabei nicht; sowohl WT als auch  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse zeigten eine stark erhöhte Expression der entzündungsfördernden Zytokine  $Tnf-\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $IL-1\alpha$  und  $IL-1\beta$  und eine leichte Hochregulierung der entzündungshemmenden Zytokine  $IL-10$ ,  $Tgf\beta$  und  $Csf$ . Unbehandelte WT Mäuse wiesen erwartungsgemäß keine Hochregulierung der Zytokine auf.

## Diskussion

---

Erstaunlicherweise zeigten *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse bereits im unbehandelten Zustand eine basal stark erhöhte Expression von *Tnf- $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  und *G-Csf* und eine Hochregulierung von *IL-10* und *Csf* (Abb. 21). Proteinanalysen ausgewählter Zytokine im Blut der behandelten und unbehandelten Tiere bestätigten diese Ergebnisse. Während behandelte Tiere in beiden Genotypen erhöhte Werte für IL-6 und TNF- $\alpha$  aufwiesen, zeigten unbehandelte WT Mäuse keine angestiegenen Level für diese Zytokine. In *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen konnten erhöhte Werte für IL-6 und TNF- $\alpha$  auch ohne jegliche Caerulein-Behandlung nachgewiesen werden (Abb. 22). Auch die Analyse der Chemokinexpression zeigte eine Hochregulation der Chemokine *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl4* sowie *Ccl2* bereits eine halbe Stunde nach Behandlungsende in beiden Genotypen. Nach vier Stunden waren desweiteren *Cxcl11* und *Ccl5* leicht erhöht. Auch hier zeigten WT Mäuse ohne Behandlung keine Chemokinexpression. Interessanterweise ließen *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse wiederum eine basale Expression der Chemokine erkennen. Dabei waren *Cxcl10* und *Ccl4* nur leicht erhöht; äußerst auffällig war in diesen Mäusen die stark erhöhte Expression von *Ccl2* (Abb. 23). Die erhöhte Expression des Chemokines CCL2 ließ sich auch auf Proteinebene nachweisen. Eine immunhistochemische Färbung gegen MCP1 (ein weiterer Name für CCL2) zeigte sowohl in behandelten WT als auch *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen MCP1-positive Zellen. Im unbehandelten Zustand wiesen WT Mäuse keine gefärbten Areale auf, im Gegensatz dazu zeigten *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse eine signifikant deutlichere Färbung der zentro-aziniären Zellen (Abb. 24).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine Unterbrechung des Interferonsignalwegs in den *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen zu einem Anstieg der Expression und Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen sowie von Chemokinen führte. Mehrere Studien konnten bisher zeigen, dass Typ I Interferone, unter nicht pathologischen Bedingungen, die Expression entzündungsfördernder Zytokine und die damit verbundene Ausschüttung von Chemokinen negativ beeinflussen und inhibieren können (Billiau, 2006; A. Yoshimura, Mori, Ohishi, Aki, & Hanada, 2003). Im Einklang mit diesen Erkenntnissen stehen die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, dass *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse bereits basal eine stark erhöhte Expression an Zytokinen aufwiesen. Diese Ergebnisse unterstützten die These einer Interferon-abhängigen Unterdrückung der entzündungsfördernden Immunantwort. Aktuelle Studien beschreiben ebenfalls eine negative Resonanz des Typ I Interferonsignalwegs auf die Zytokinproduktion. Die Arbeitsgruppe um Pinot konnte zeigen, dass Mäuse, die den Interferonrezeptor nicht exprimieren, enorme Mengen an entzündungsfördernden Zytokinen produzierten (Pinto et al., 2014). Ebenso veranschaulichten Guarda et al. den Einfluss der Typ I Interferone auf die Produktion von IL-1. Sie konnten zeigen, dass Interferone inhibierend auf die Reifung von IL-1 wirken (Guarda et al., 2011). Im Konsens mit diesen Ergebnissen zeigten bereits unbehandelte *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen erhöhte mRNA-Level von IL-1.

## Diskussion

Wie bereits erwähnt, zeigten unbehandelte  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse darüber hinaus auch erhöhte mRNA-Werte und eine gesteigerte Produktion des Chemokines CCL2/MCP1 in den zentro-azinären Zellen des Pankreas (Abb. 23 und 24). Diese Ergebnisse waren konform mit den Daten von Sun et al. Sie beschrieben eine TNF- $\alpha$ -induzierte Synthese und Freisetzung von MCP1 durch azinäre Zellen des Pankreas (L. K. Sun et al., 2007). Dies ließ die Schlussfolgerung einer Zytokin-anhängigen Chemokinausschüttung in  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen zu. Auch hier führte offenbar die beobachtete Ausschüttung von TNF- $\alpha$  zu einer Induktion des Chemokines MCP1 in den Azini der  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse, und dies ohne jegliche Verletzung oder Behandlung des Pankreas. Diese basale Hochregulierung und Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen in den  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen könnte in direktem Zusammenhang mit der frühen Einwanderung der Makrophagen in diesen Mäusen stehen. Verschiedene Studien, unter anderem von Mantovani et al., postulierten die Notwendigkeit einer Zytokinausschüttung für die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen. Desweiteren stellten sie die Wichtigkeit der Chemokine als chemotaktische Mediatoren für eine gerichtete Rekrutierung der Immunzellen in die beschädigten oder entzündeten Areale dar (Mantovani et al., 2004; Stetson & Medzhitov, 2006; Stock et al., 2014).

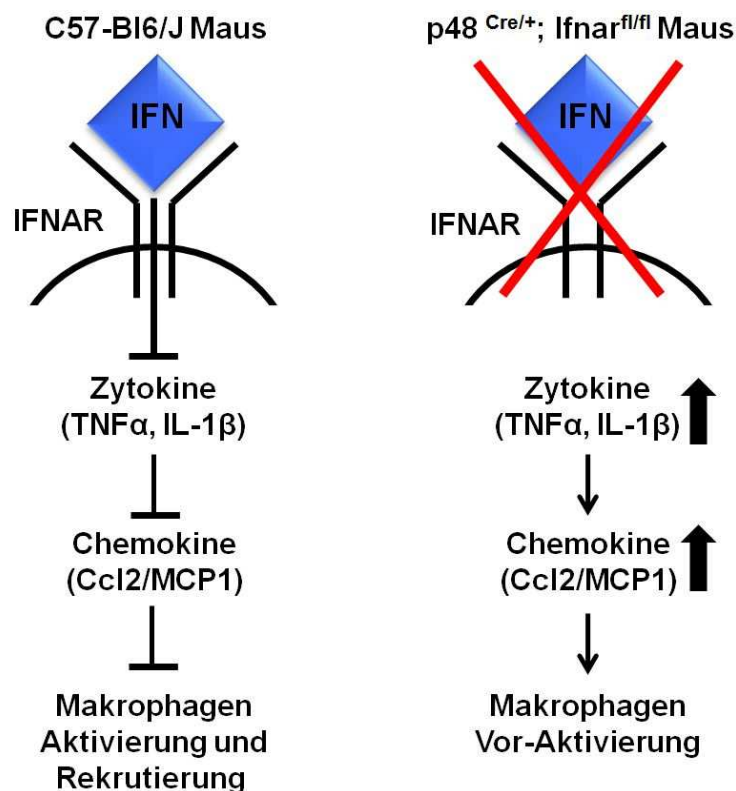


Abb. 37: Schematische Darstellung der Auswirkung des IFNAR1 "knockout".

Obwohl in den unbehandelten  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen bereits eine Freisetzung von Zytokinen und eine Sekretion des Chemokines MCP1 zu erkennen war, reichte dies jedoch noch nicht aus,



um Makrophagen in das unversehrte Pankreas zu locken. Es scheint, als wäre für die letztendliche Infiltration der Makrophagen ein weiteres, entzündungsinitiertes Signal notwendig (Abb. 37).

### **4.6 Analysen der Aktivierung von NF- $\kappa$ B in unbehandelten und behandelten C57-BI6/J und p48<sup>Cre/+</sup>; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen**

Bei NF- $\kappa$ B handelt es sich um einen Proteinkomplex, der als Transkriptionsfaktor fungiert und dadurch eine Vielzahl an zellulären sowie organismischen Prozessen wie die Immunantwort, Entwicklungsprozesse, Zellwachstum oder auch die Apoptose reguliert (Brasier, 2006; Gilmore, 2006; Perkins, 2007). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt durch diverse Stimuli; dazu zählen physischer und chemischer Stress, LPS, freie Radikale, bakterielle sowie virale Antigene ebenso wie entzündungsfördernde Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Gilmore, 1999; Kuno & Matsushima, 1994; Tian & Brasier, 2003). Aufgrund der in Kapitel 3.5 nachgewiesenen basalen Hochregulierung von *Tnf- $\alpha$*  und *IL-1 $\beta$* , sowie der Ausschüttung dieser Zytokine in unbehandelten Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen, sollte untersucht werden, ob diese Zytokinausschüttung eventuell auch eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nach sich zieht. Dafür wurden sowohl WT als auch Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse mit und ohne Caerulein-Behandlung analysiert. Da NF- $\kappa$ B zur Kategorie der primären Transkriptionsfaktoren gehört, kommt das Protein fortwährend synthetisiert im Zytoplasma der Zellen vor. Im unstimulierten Zustand ist NF- $\kappa$ B jedoch an das inhibitorische Protein I $\kappa$ B $\alpha$  („nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha“) gebunden, wodurch der Transkriptionsfaktor in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Erst durch die Ubiquitinierung des I $\kappa$ B $\alpha$  kann NF- $\kappa$ B in den Nukleus wandern und dort die Genexpression starten (Hay, Kemp, Dargemont, & Hay, 2001; Jacobs & Harrison, 1998; Malek, Huxford, & Ghosh, 1998). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors wurde daher anhand der Akkumulierung des Proteins im Zellkern mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen NF- $\kappa$ B analysiert. Die Auswertung dieser Färbung zeigte, wie erwartet, eine Kernlokalisation und damit einhergehende Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach Caerulein-induzierter Pankreatitis in beiden Genotypen (Abb. 25 C-E). Aber bereits kurz nach Behandlungsende (t=0,5 h) wiesen Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse eine vierfach stärkere Aktivierung des Transkriptionsfaktors auf als WT Mäuse. Interessanterweise zeigte sich diese Beobachtung auch in den unbehandelten Tieren (Abb. 25 A und B): hier wiesen Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse ebenfalls eine knapp vierfach (3,7) erhöhte Kernlokalisation von NF- $\kappa$ B auf, ausgemacht an der Anzahl positiver Zellkerne (Abb. 25 E). Diese Ergebnisse bekräftigten die Hypothese einer TNF- $\alpha$ - bzw. IL-1 $\beta$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Pankreas von Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse. Erstaunlicherweise trat dieser Effekt bereits ohne eine Caerulein-induzierte Entzündung auf.

## Diskussion

---

Für die Entstehung der Pankreatitis wird die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs als ausschlaggebend eingestuft (Baumann et al., 2007) und konnte dabei schon in der frühen Entzündungsphase beobachtet werden (Vaquero, Gukovsky, Zaninovic, Gukovskaya, & Pandol, 2001). Weitere Studien von Chen et al. konnten zeigen, dass die Überexpression der aktiven NF- $\kappa$ B-Untereinheit RelA/p65 zu einer schweren Pankreatitis in Mäusen führte (X. Chen et al., 2002). Desweiteren konnte dargelegt werden, dass das Level an aktiviertem NF- $\kappa$ B mit der Schwere einer akuten Pankreatitis korreliert und längere Phasen der Aktivierung eine chronische Pankreatitis auslösen (H. Huang et al., 2013). Diese Effekte konnten in den *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse jedoch nicht beobachtet werden. In dieser Mauslinie war die Pankreatitis in ihrer Ausprägung milder und mit einer geringeren Gewebeerstörung verbunden als in den WT Tieren. Die Ursache für diesen abweichenden Phänotyp könnte in einer alternativen Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen liegen (Bouwmeester et al., 2004). Welche konkreten Konsequenzen die Aktivierung von NF- $\kappa$ B- in den *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen auf den Entzündungs- und Regenerationsverlauf hatte, konnte hier nicht geklärt werden.

### 4.7 Vergleichende Analysen von *p48<sup>Cre/+</sup>*; *Kras<sup>G12D</sup>* und *p48<sup>Cre/+</sup>*; *Kras<sup>G12D</sup>*; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung des Interferonsignalwegs in *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen zu einer mildereren Pankreatitis und einem eingeschränkten Gewebeschaden führte (Kapitel 3.2). Dieser Effekt ist vermutlich auf die Einwanderung von M1 Makrophagen zurück zu führen (Kapitel 3.3 und 3.4). Da die Pankreatitis einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Bauchspeicheldrüsenkrebs ist, sollten die Auswirkungen des IFNAR1 „knockout“ auch im Tumormausmodell untersucht werden. Dafür wurden zunächst unbehandelte *Kras* und *Kras*; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse und anschließend Caerulein-induzierte Tiere in Bezug auf die Pankreasmorphologie, die Zellproliferation und den Zellschaden sowie die allgemeine Immunzelleinwanderung und die Infiltration von Makrophagen untersucht.

Die unbehandelten Mäuse wurden dabei über einen Zeitraum von acht Wochen, über drei Monate bis zum Alter von sechs Monaten miteinander verglichen. Wie bereits bei den unbehandelten WT und *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäuse, in Kapitel 3.1 dargestellt, zeigten sich auch zwischen den *Kras* und *Kras*; *Ifnar<sup>fl/fl</sup>* Mäusen ohne Behandlung keine signifikanten Unterschiede. Die histologische Charakterisierung ergab keine Differenzen zwischen den beiden Genotypen (Abb. 26- 28). Beide Mauslinien wiesen starke Veränderungen im Pankreas auf, gekennzeichnet durch eine hohe Proliferation und Gewebeschädigung (Abb. 29) und zeigten

## Diskussion

---

im Verlauf der Alterung eine Zunahme an Immunzellen und keine deutlichen Veränderungen an der Anzahl an Makrophagen (Abb. 30).

Erstaunlicherweise zeigten sich aber auch keine gravierenden Unterschiede in der Morphologie Caerulein-behandelter Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse weder nach 24 oder 48 Stunden noch nach 14 Tagen (Abb. 31- 33). Auch die Analyse der Proliferation und des Zellschadens zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 34). Ebenso konnten die Beobachtungen einer stark veränderten Immunzelleinwanderung bzw. Makrophageninfiltration nach Induktion einer Pankreatitis, wie sie in Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen zu beobachten war, in Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nicht bestätigt werden (Abb. 35). Dass in den unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen zu den untersuchten Zeitpunkten keine Unterschiede entdeckt werden konnten, war nicht weiter überraschend. Interferone sind vor allem Mediatoren der Entzündungsprozesse, im gesunden Organismus spielen sie eine eher untergeordnete Rolle (Pestka et al., 2004). Und da Guerra et al. zeigen konnten, dass eine Kras-Mutation allein nicht ausreichend war für die Entstehung von Vorläuferläsionen und PDAC (Guerra et al., 2011; Guerra et al., 2007), war davon auszugehen, dass die Unterbrechung des Interferonsignalwegs auch im Kras-Modell ohne sichtbare Folgen bleibt. Der ausgeprägte Phänotyp der behandelten Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäuse konnte in den Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen nicht beobachtet werden. Die Ursachen dafür konnten bisher nicht geklärt werden. Denkbar wäre, dass die Kras-Mutation die Folgen des IFNAR1 „knockout“ überdeckt. Trotz ausführlicher Studien des Kras-Mausmodells (Eser, Schnieke, Schneider, & Saur, 2014; Herreros-Villanueva, Hijona, Cosme, & Bujanda, 2012; Murtaugh, 2014) gibt es dazu noch keinerlei Erkenntnisse. Eine weitere Erklärung dafür könnte in den gewählten Zeitpunkten zu finden sein. Die Mäuse wurden im unbehandelten Zustand nach spätestens sechs Monaten untersucht, die behandelten Tiere nach 14 Tagen. Da aber erfahrungsgemäß unbehandelte Kras-Mäuse erst ab einem Alter von über zwölf Monaten Tumore entwickeln (laborinterne Daten) und selbst behandelte Tiere erst ab frühestens sechs Monaten Vorläuferläsionen zeigen (Guerra et al., 2007), waren eventuelle Veränderung zu diesen frühen Zeitpunkten mit den durchgeführten Experimenten vermutlich noch nicht detektierbar. Um eine Aussage über den Einfluss der Typ I Interferone im Tumormausmodell bzw. auf die Karzinogenese treffen zu können, sind Langzeitstudien notwendig.

### 4.8 Ausblick

Aufgrund des milderen Verlaufs und der lokal eingeschränkten Entzündung der Pankreatitis nach „knockout“ des IFNAR1 stellt die Inhibition der Typ I Interferonsignalwege einen guten Ausgangspunkt für neue Therapieansätze dar. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine, durch die Unterbrechung des Interferonsignals, induzierte Einwanderung an M1

## Diskussion

---

Makrophagen in das verletzte Pankreas vermutlich die Hauptmediatoren dieses eingedämmten Entzündungsprozess waren. Basierend auf den Erkenntnissen, dass M1 Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase und Bekämpfung von Krankheiten spielen (Mosser & Edwards, 2008), stellen polarisierte M1 Makrophagen attraktive Kandidaten für die Entwicklung neuer Therapieansätze dar. So konnten bereits mehrere Studien zeigen, dass eine gezielte Administration oder Polarisation von M1 Makrophagen große Erfolge in der Eindämmung verschiedener Krankheiten und auch in der Krebsbekämpfung erzielen konnten (Coscia et al., 2010; Duluc et al., 2009; Hanke, Heim, Angle, Sanderson, & Kielian, 2013; Z. Huang et al., 2012).

Um die Spätfolgen der Unterbrechung des Typ I Interferonsignalweg im Pankreas zu untersuchen und die Auswirkungen auf die Tumorentstehung im Krebsmodell zu analysieren, sind Langzeitstudien sinnvoll.

### 5 Zusammenfassung

Die Pankreatitis ist eine schmerzhafte Entzündung der Bauchspeicheldrüse und ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Bauchspeicheldrüsenkrebs. Charakterisiert wird diese Krankheit durch die vorzeitige Aktivierung und Sekretion von Verdauungsenzymen, wodurch ein Selbstverdau des Organs ausgelöst wird. Die daraus folgende Entzündung wird überwiegend von entzündungsfördernden Vermittlern wie Zytokinen, sowie durch die Rekrutierung von Immunzellen vermittelt. Die genaue Rolle der Interferone in diesem Entzündungsprozess wird momentan noch kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der Typ I Interferone während des Entzündungs- und Regenerationsprozesses im Pankreas untersucht werden. Dazu wurde die neuartige Mauslinie  $p48^{Cre/+}; Ifnar^{fl/fl}$  generiert. Diesen Mäusen fehlt die Untereinheit 1 des Interferon alpha/beta Rezeptors (IFNAR1) spezifisch in den Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse.

Die Untersuchungen unbehandelter WT und  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse ließen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen feststellen.  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse zeigten nach einer Caerulein-induzierten Entzündung eine lokal begrenzte Pankreatitis einhergehend mit einer verminderten Einwanderung von Immunzellen im Vergleich zu WT Mäusen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei der Mehrheit der Immunzellen um Makrophagen handelte. Expressionsanalysen von Zytokinen zeigten, dass unbehandelte  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse erhöhte Level der entzündungsfördernden Faktoren *Tnf- $\alpha$* , *IL-6* und *IL-1* aufwiesen. Darüber hinaus zeigten  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäuse eine erhöhte Expression des Chemokines *Ccl2*. Die erhöhte Expression der Zytokine sowie Chemokine in unbehandelten  $Ifnar^{fl/fl}$  Mäusen konnte auf Proteinebene validiert werden.

Um den Einfluss der Type I Interferone auch auf die Tumorentstehung zu untersuchen, wurden die beiden Tumormausmodelle  $p48^{Cre/+}; Kras^{G12D}$  und  $p48^{Cre/+}; Kras^{G12D}; Ifnar^{fl/fl}$  herangezogen. Zwischen den beiden Genotypen zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede sowohl im unbehandelten Zustand als auch nach einer Caerulein-induzierten Pankreatitis.

Diese Ergebnisse suggerieren eine wichtige Rolle des Typ I Interferons in der Entwicklung einer entzündungsfördernden Umgebung durch die Inhibierung von Zytokinen und Chemokinen; diese wiederum sind äußerst wichtig für die Aktivierung und Anlockung entzündungseindämmender Makrophagen. Ein relevanter Einfluss auf die Tumorentstehung im Pankreas konnte jedoch nicht beobachtet werden.

### Summary

Pancreatitis is a life-threatening inflammation of the pancreas and an important risk factor for the development of pancreatic cancer (PDAC; pancreatic ductal adenocarcinoma). This disease is marked by the secretion of premature activated enzymes leading to the self-digestion of the organ. The subsequent inflammatory response is primarily mediated by the release of pro-inflammatory agents like cytokines as well as the recruitment of immune cells. At the moment, the explicit role of interferons in the inflammation process is contentious.

Within this dissertation the influence of type I interferons in the inflammatory procedure and during the regeneration of the pancreas was analyzed. Therefore, we generated  $p48^{Cre/+}; Ifnar^{fl/fl}$  mice, with a deficiency in the subunit 1 of the interferon alpha/beta receptor (IFNAR1) especially on pancreatic acini.

The analysis of untreated WT and  $Ifnar^{fl/fl}$  mice discovered no differences between the two genotypes. After a caerulein-induced pancreatitis,  $Ifnar^{fl/fl}$  mice exhibited a locally limited inflammation with a decreased immune cell infiltration compared to WT mice. Further examination disclosed that the majority of the infiltrated immune cells were macrophages.

Untreated  $Ifnar^{fl/fl}$  mice revealed elevated levels of the pro-inflammatory cytokines *Tnf- $\alpha$* , *IL-6* and *IL-1* using cytokine expression analysis. In addition,  $Ifnar^{fl/fl}$  mice revealed a strong expression of the monocyte chemoattractant *Ccl2*. The increased cytokine and chemokine expression levels in untreated  $Ifnar^{fl/fl}$  mice could be validated on protein level.

To investigate the effect of the type I interferons also on the tumor development we characterized the two tumor mouse models  $p48^{Cre/+}; Kras^{G12D}$  and  $p48^{Cre/+}; Kras^{G12D}; Ifnar^{fl/fl}$ . The comparison of both genotypes revealed no significant differences in the untreated state or after a caerulein induced pancreatitis.

These data indicate an essential impact of type 1 interferon signaling in the improvement of a pro-inflammatory environment through the repression of cytokines and chemokines crucial for the activation and recruitment of inflammation restrictive macrophages. However, a relevant influence on the development of PDAC could not be observed.

## 6 Literaturverzeichnis

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Schematische Darstellung des Pankreas
- Abb. 2: Darstellung der Karzinogenese im Pankreas
- Abb. 3: Typ I Interferon Rezeptor (IFNAR)-Komplex
- Abb. 4: Der Interferon Typ I Signalweg
- Abb. 5: Reifung, Differenzierung und Polarisation von Makrophagen
- Abb. 6: Histologische Gewebeanalysen unbehandelter WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse
- Abb. 7: Körper- und Pankreasgewichtsanalysen.
- Abb. 8: Analysen der Blutserumwerte
- Abb. 9: Histologische Gewebeanalysen Caerulein-behandelter WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse während der Entzündungsphase (24-48 h)
- Abb. 10: Histologische Gewebeanalysen Caerulein-behandelter WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse während der Regenerationsphase (3-14 d)
- Abb. 11: Quantifizierung der Pankreatitis und pankreatitisbezogener Parameter in Caerulein-behandelten WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen
- Abb. 12: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von BrdU-positiven und p53-positiven Zellen in Caerulein-behandelten WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen
- Abb. 13: Auswertung immunhistochemischer Immunzellfärbungen in WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen im Verlauf der Pankreatitis und Regeneration.
- Abb. 14: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von F4/80-positiven Makrophagen in WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen im Verlauf der Pankreatitis und Regeneration.
- Abb. 15: Immunhistochemische Analyse der Depletion von F4/80-positiven Makrophagen in WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen
- Abb. 16: Histologische Gewebeanalysen in WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen im Regenerations-, Depletionsmodell und der Kontrollgruppe nach 48 h
- Abb. 17: Quantifizierung der Pankreatitis und pankreatitisbezogener Parameter in Caerulein-behandelten WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen im Regenerations-, Depletionsmodell und der Kontrollgruppe
- Abb. 18: Auswertung immunhistochemischer Immunzellfärbungen in WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen im Regenerations-, Depletionsmodell und der Kontrollgruppe nach 48 h
- Abb. 19: FACS-Analysen enzymatisch und mechanisch isolierter Immunzellen
- Abb.20: FACS-Analysen isolierter Immunzellen aus WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen nach  $t=24$  h
- Abb. 21: qRT PCR-Analysen der Zytokinexpression in unbehandelten WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen und 0,5h sowie 4 h nach Behandlung
- Abb. 22: Blutserumanalysen unbehandelter WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse und 4 h nach Caerulein-Behandlung
- Abb. 23: qRT PCR-Analysen der Chemokinexpression in unbehandelten WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen und 4h nach Caerulein-Behandlung
- Abb. 24: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von MCP1-positiven Zellen in WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen 24 h nach Caerulein-Behandlung und in unbehandelten Mäusen
- Abb. 25: Immunhistochemische Analysen und Auswertung der NF- $\kappa$ B Expression in unbehandelten und Caerulein-behandelten WT und  $lfnar^{fl/fl}$  Mäusen
- Abb. 26: Histologische Gewebeanalysen unbehandelter Kras und Kras;  $lfnar^{fl/fl}$  Mäuse

# Literaturverzeichnis

---

- Abb. 27: Quantifizierung gewebeverändernder und entzündungsbezogener Parameter in unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen
- Abb. 28: Histologische Detektion intraepithelialer Neoplasien (PanINs) in unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen
- Abb. 29: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von BrdU-positiven und p53-positiven Zellen in unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen
- Abb. 30: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von CD45-positiven Immunzellen und F4/80-positiven Makrophagen in unbehandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen
- Abb. 31: Histologische Gewebeanalysen von behandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen
- Abb. 32: Quantifizierung der Pankreatitis und pankreatitisbezogener Parameter in Caerulein-behandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen
- Abb. 33: Histologische Detektion intraepithelialer Neoplasien (PanINs) in Caerulein-behandelten Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen
- Abb. 34: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von BrdU-positiven und p53-positiven Zellen in Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen 24- und 48 h sowie 14 d nach Caerulein-Behandlung
- Abb. 35: Immunhistochemische Analyse und Auswertung von CD45-positiven Immunzellen und F4/80-positiven Makrophagen in Kras und Kras; Ifnar<sup>fl/fl</sup> Mäusen 24- und 48 h sowie 14 d nach Caerulein-Behandlung
- Abb. 36: Einfluss entzündungsfördernder Makrophagen auf die Regeneration nach einer akuten Pankreatitis
- Abb. 37: Schematische Darstellung der Auswirkung des IFNAR1 "knockout".

## 6.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Typ I, Typ II Interferone und Interferon-ähnliche Zytokine
- Tab. 2: Chemikalien
- Tab. 3: Verbrauchsmaterialien
- Tab. 4: Geräte
- Tab. 5: Standardlösungen und -puffer
- Tab. 6: Zellkulturmedien
- Tab. 7: Kommerzielle Kits
- Tab. 8: Marker
- Tab. 9: Oligonukleotidsequenzen für die qRT PCR
- Tab. 10: Erstantikörper
- Tab. 11: Zweitantikörper
- Tab. 12: Substanze für Tierversuche
- Tab. 13: Mauslinien mit Hintergrund, Herkunft und Eigenschaften
- Tab. 14: Verwendete PCR Programme
- Tab. 15: Verwendetes qRT PCR- Programm



## 6.3 Quellenverzeichnis

- Aaronson, D. S., & Horvath, C. M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*, 296(5573), 1653-1655. doi: 10.1126/science.1071545
- Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, P. K., Da Silva-Buttkus, P., . . . Esposito, I. (2012). Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol*, 226(5), 723-734. doi: 10.1002/path.3017
- Apte, M. V., Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., . . . Wilson, J. S. (1998). Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 43(1), 128-133.
- Apte, M. V., Wilson, J. S., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., Haber, P. S., Norton, I. D., & Pirola, R. C. (1995). Ethanol-induced alterations in messenger RNA levels correlate with glandular content of pancreatic enzymes. *J Lab Clin Med*, 125(5), 634-640.
- Ashurst, J. V., Nappe, T., Digiambattista, S., Kambhampati, A., Alam, S., Ortiz, M., . . . Greenberg, M. R. (2014). Effect of triage-based use of the Ottawa foot and ankle rules on the number of orders for radiographic imaging. *J Am Osteopath Assoc*, 114(12), 890-897. doi: 10.7556/jaoa.2014.184
- Banks, P. A., Freeman, M. L., & Practice Parameters Committee of the American College of, G. (2006). Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, 101(10), 2379-2400. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00856.x
- Barreto, S. G., & Saccone, G. T. (2010). Alcohol-induced acute pancreatitis: the 'critical mass' concept. *Med Hypotheses*, 75(1), 73-76. doi: 10.1016/j.mehy.2010.01.036
- Baumann, B., Wagner, M., Aleksic, T., von Wichert, G., Weber, C. K., Adler, G., & Wirth, T. (2007). Constitutive IKK2 activation in acinar cells is sufficient to induce pancreatitis in vivo. *J Clin Invest*, 117(6), 1502-1513. doi: 10.1172/JCI30876
- Bazan, J. F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(18), 6934-6938.
- Bekisz, J., Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A., & Zoon, K. C. (2010). Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3(4), 994-1015. doi: 10.3390/ph3040994
- Bhattacharya, S., Katlinski, K. V., Reichert, M., Takano, S., Brice, A., Zhao, B., . . . Fuchs, S. Y. (2014). Triggering ubiquitination of IFNAR1 protects tissues from inflammatory injury. *EMBO Mol Med*, 6(3), 384-397. doi: 10.1002/emmm.201303236
- Bilar, J. M., Carvalho-Filho, R. J., Mota, C. F., Fucuta Pda, S., & Ferraz, M. L. (2014). Acute pancreatitis associated with boceprevir: a case report. *Braz J Infect Dis*, 18(4), 454-456. doi: 10.1016/j.bjid.2014.03.008
- Billiau, A. (2006). Anti-inflammatory properties of Type I interferons. *Antiviral Res*, 71(2-3), 108-116. doi: 10.1016/j.antiviral.2006.03.006
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., . . . Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385(6618), 729-733. doi: 10.1038/385729a0
- Bonfrate, L., Wang, D. Q., Garruti, G., & Portincasa, P. (2014). Obesity and the risk and prognosis of gallstone disease and pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 28(4), 623-635. doi: 10.1016/j.bpg.2014.07.013
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Croughton, K., . . . Superti-Furga, G. (2004). A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*, 6(2), 97-105. doi: 10.1038/ncb1086
- Brasier, A. R. (2006). The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol*, 6(2), 111-130.
- Brinkmann, V., Geiger, T., Alkan, S., & Heusser, C. H. (1993). Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med*, 178(5), 1655-1663.

- Buiting, A. M., Zhou, F., Bakker, J. A., van Rooijen, N., & Huang, L. (1996). Biodistribution of clodronate and liposomes used in the liposome mediated macrophage 'suicide' approach. *J Immunol Methods*, *192*(1-2), 55-62.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O., & Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(7), 2334-2339. doi: 10.1073/pnas.0510790103
- Callewaere, C., Banisadr, G., Rostene, W., & Parsadaniantz, S. M. (2007). Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol*, *38*(3), 355-363. doi: 10.1677/JME-06-0035
- Canton, J., Neculai, D., & Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*, *13*(9), 621-634. doi: 10.1038/nri3515
- Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., . . . Heinrich, P. C. (1989). Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett*, *242*(2), 237-239.
- Chen, C. J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., & Rock, K. L. (2007). Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*, *13*(7), 851-856. doi: 10.1038/nm1603
- Chen, X., Ji, B., Han, B., Ernst, S. A., Simeone, D., & Logsdon, C. D. (2002). NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology*, *122*(2), 448-457.
- Clemens, M. J. (2003). Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res*, *23*(6), 277-292. doi: 10.1089/107999003766628124
- Cohen, B., Novick, D., Barak, S., & Rubinstein, M. (1995). Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol Cell Biol*, *15*(8), 4208-4214.
- Coscia, M., Quaglino, E., Iezzi, M., Curcio, C., Pantaleoni, F., Riganti, C., . . . Massaia, M. (2010). Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J Cell Mol Med*, *14*(12), 2803-2815. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00926.x
- Criddle, D. N. (2015). The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison. *Pancreatology*. doi: 10.1016/j.pan.2015.02.009
- Cushing, S. D., Berliner, J. A., Valente, A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F., . . . Fogelman, A. M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(13), 5134-5138.
- Dambrauskas, Z., Giese, N., Gulbinas, A., Giese, T., Berberat, P. O., Pundzius, J., . . . Friess, H. (2010). Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*, *16*(15), 1845-1853.
- Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science*, *277*(5332), 1630-1635.
- de Weerd, N. A., Samarajiva, S. A., & Hertzog, P. J. (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem*, *282*(28), 20053-20057. doi: 10.1074/jbc.R700006200
- Denham, W., Yang, J., Fink, G., Denham, D., Carter, G., Bowers, V., & Norman, J. (1998). TNF but not IL-1 decreases pancreatic acinar cell survival without affecting exocrine function: a study in the perfused human pancreas. *J Surg Res*, *74*(1), 3-7. doi: 10.1006/jsre.1997.5174
- Dinarelli, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, *87*(6), 2095-2147.
- Doenecke, D. (2005). *Karlsruhs Biochemie und Pathobiochemie*. Stuttgart: Georg Thieme.
- Dorhoi, A., Yermeev, V., Nouailles, G., Weiner, J., 3rd, Jorg, S., Heinemann, E., . . . Kaufmann, S. H. (2014). Type I IFN signaling triggers immunopathology in tuberculosis-susceptible mice by modulating lung phagocyte dynamics. *Eur J Immunol*, *44*(8), 2380-2393. doi: 10.1002/eji.201344219
- Drenckhahn, D. (2008). *Anatomie, Band 1* (Vol. 17). München: Urban&Fischer.

- Du, Z., Wei, L., Murti, A., Pfeffer, S. R., Fan, M., Yang, C. H., & Pfeffer, L. M. (2007). Non-conventional signal transduction by type 1 interferons: the NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem*, *102*(5), 1087-1094. doi: 10.1002/jcb.21535
- Duden 01. *Die deutsche Rechtschreibung*. (2014). (Vol. 26). Berlin: Duden Verlag, Bibliographisches Institut
- Duell, E. J., Lucenteforte, E., Olson, S. H., Bracci, P. M., Li, D., Risch, H. A., . . . Boffetta, P. (2012). Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol*, *23*(11), 2964-2970. doi: 10.1093/annonc/mds140
- Dufour, M. C., & Adamson, M. D. (2003). The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*, *27*(4), 286-290.
- Duluc, D., Corvaisier, M., Blanchard, S., Catala, L., Descamps, P., Gamelin, E., . . . Jeannin, P. (2009). Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int J Cancer*, *125*(2), 367-373. doi: 10.1002/ijc.24401
- Eife, R., Hahn, T., DeTavera, M., Schertel, F., Holtmann, H., Eife, G., & Levin, S. (1981). A comparison of the antiproliferative and antiviral activities of alpha-, beta- and gamma-interferons: description of a unified assay for comparing both effects simultaneously. *J Immunol Methods*, *47*(3), 339-347.
- Ellis, I., Lerch, M. M., Whitcomb, D. C., & Consensus Committees of the European Registry of Hereditary Pancreatic Diseases, M. M.-C. P. S. G. I. A. o. P. (2001). Genetic testing for hereditary pancreatitis: guidelines for indications, counselling, consent and privacy issues. *Pancreatology*, *1*(5), 405-415.
- Engelmann, H., Novick, D., & Wallach, D. (1990). Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem*, *265*(3), 1531-1536.
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., & Saur, D. (2014). Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, *111*(5), 817-822. doi: 10.1038/bjc.2014.215
- Exley, R., Gordon, J., Nathan, P., Walker, L., & Clemens, M. J. (1987). Anti-proliferative effects of interferons on Daudi Burkitt lymphoma cells: induction of cell differentiation and loss of response to autocrine growth factors. *Int J Cancer*, *40*(1), 53-57.
- Fidler, I. J. (2001). Regulation of neoplastic angiogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr*(28), 10-14.
- Fink, G. W., & Norman, J. G. (1997). Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin 1 family of genes during experimental acute pancreatitis. *Cytokine*, *9*(12), 1023-1027.
- Folias, A. E., Penaranda, C., Su, A. L., Bluestone, J. A., & Hebrok, M. (2014). Aberrant innate immune activation following tissue injury impairs pancreatic regeneration. *PLoS One*, *9*(7), e102125. doi: 10.1371/journal.pone.0102125
- Gastl, G., Marth, C., Leiter, E., Gattlinger, C., Mayer, I., Daxenbichler, G., . . . Huber, C. (1985). Effects of human recombinant alpha 2 arg-interferon and gamma-interferon on human breast cancer cell lines: dissociation of antiproliferative activity and induction of HLA-DR antigen expression. *Cancer Res*, *45*(7), 2957-2961.
- Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T., Kishimoto, T., & Heinrich, P. C. (1988). Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur J Immunol*, *18*(5), 717-721. doi: 10.1002/eji.1830180510
- Gilmore, T. D. (1999). The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*, *18*(49), 6842-6844. doi: 10.1038/sj.onc.1203237
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, *25*(51), 6680-6684. doi: 10.1038/sj.onc.1209954
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, *5*(12), 953-964. doi: 10.1038/nri1733

- Grady, T., Liang, P., Ernst, S. A., & Logsdon, C. D. (1997). Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology*, *113*(6), 1966-1975.
- Graumann, W., & Sasse, D. (2004). *CompactLehrbuch Anatomie, Band 3* (Vol. 3). Stuttgart: Schattauer.
- Greiner, J. W., Guadagni, F., Noguchi, P., Pestka, S., Colcher, D., Fisher, P. B., & Schlom, J. (1987). Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions in vivo. *Science*, *235*(4791), 895-898.
- Greiner, J. W., Hand, P. H., Noguchi, P., Fisher, P. B., Pestka, S., & Schlom, J. (1984). Enhanced expression of surface tumor-associated antigens on human breast and colon tumor cells after recombinant human leukocyte alpha-interferon treatment. *Cancer Res*, *44*(8), 3208-3214.
- Gress, T. M., Muller-Pillasch, F., Lerch, M. M., Friess, H., Buchler, M., Beger, H. G., & Adler, G. (1994). Balance of expression of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in chronic pancreatitis. *Z Gastroenterol*, *32*(4), 221-225.
- Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Forster, I., . . . Tschopp, J. (2011). Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*, *34*(2), 213-223. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.006
- Guerra, C., & Barbacid, M. (2013). Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Oncol*, *7*(2), 232-247. doi: 10.1016/j.molonc.2013.02.002
- Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A. J., Hernandez-Porrás, I., Canamero, M., . . . Barbacid, M. (2011). Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, *19*(6), 728-739. doi: 10.1016/j.ccr.2011.05.011
- Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Canamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Perez-Gallego, L., . . . Barbacid, M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell*, *11*(3), 291-302. doi: 10.1016/j.ccr.2007.01.012
- Guiducci, C., Vicari, A. P., Sangaletti, S., Trinchieri, G., & Colombo, M. P. (2005). Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res*, *65*(8), 3437-3446. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4262
- Gukovskaya, A. S., Gukovsky, I., Zaninovic, V., Song, M., Sandoval, D., Gukovsky, S., & Pandol, S. J. (1997). Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest*, *100*(7), 1853-1862. doi: 10.1172/JCI119714
- Haber, P. S., Wilson, J. S., Apte, M. V., Korsten, M. A., & Pirola, R. C. (1994). Chronic ethanol consumption increases the fragility of rat pancreatic zymogen granules. *Gut*, *35*(10), 1474-1478.
- Hanke, M. L., Heim, C. E., Angle, A., Sanderson, S. D., & Kielian, T. (2013). Targeting macrophage activation for the prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilm infections. *J Immunol*, *190*(5), 2159-2168. doi: 10.4049/jimmunol.1202348
- Hao, N. B., Lu, M. H., Fan, Y. H., Cao, Y. L., Zhang, Z. R., & Yang, S. M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*, *2012*, 948098. doi: 10.1155/2012/948098
- Hay, D. C., Kemp, G. D., Dargemont, C., & Hay, R. T. (2001). Interaction between hnRNP A1 and I $\kappa$ B is required for maximal activation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription. *Mol Cell Biol*, *21*(10), 3482-3490. doi: 10.1128/MCB.21.10.3482-3490.2001
- Herreros-Villanueva, M., Hijona, E., Cosme, A., & Bujanda, L. (2012). Mouse models of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, *18*(12), 1286-1294. doi: 10.3748/wjg.v18.i12.1286

- Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A., & Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res*, *17*(9), 2619-2627. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1114
- Horn, F. (2012). *Biochemie des Menschen* (Vol. 5). Stuttgart: Thieme Verlag.
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., . . . Offerhaus, G. J. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*, *25*(5), 579-586.
- Hruban, R. H., Maitra, A., & Goggins, M. (2008). Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol*, *1*(4), 306-316.
- Huang, H., Liu, Y., Daniluk, J., Gaiser, S., Chu, J., Wang, H., . . . Ji, B. (2013). Activation of nuclear factor-kappaB in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice. *Gastroenterology*, *144*(1), 202-210. doi: 10.1053/j.gastro.2012.09.059
- Huang, Z., Zhang, Z., Jiang, Y., Zhang, D., Chen, J., Dong, L., & Zhang, J. (2012). Targeted delivery of oligonucleotides into tumor-associated macrophages for cancer immunotherapy. *J Control Release*, *158*(2), 286-292. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.11.013
- Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., . . . Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev*, *15*(24), 3243-3248. doi: 10.1101/gad.943001
- Jacobs, M. D., & Harrison, S. C. (1998). Structure of an I kappa B alpha/NF-kappa B complex. *Cell*, *95*(6), 749-758.
- Jones, S. A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*, *175*(6), 3463-3468.
- Kambhampati, S., Park, W., & Habtezion, A. (2014). Pharmacologic therapy for acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*, *20*(45), 16868-16880. doi: 10.3748/wjg.v20.i45.16868
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S. M., Yu, J., Borges, M., . . . Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, *142*(4), 730-733 e739. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.042
- Keay, S., & Grossberg, S. E. (1980). Interferon inhibits the conversion of 3T3-L1 mouse fibroblasts into adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*(7), 4099-4103.
- Keppler, S. J., Rosenits, K., Koegl, T., Vucikuja, S., & Aichele, P. (2012). Signal 3 cytokines as modulators of primary immune responses during infections: the interplay of type I IFN and IL-12 in CD8 T cell responses. *PLoS One*, *7*(7), e40865. doi: 10.1371/journal.pone.0040865
- Kerbel, R., & Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*, *2*(10), 727-739. doi: 10.1038/nrc905
- Kleine, B., & Rossmannith, W. (2014). *Hormone und Hormonsystem - Lehrbuch der Endokrinologie* (Vol. 3). Berlin/Heidelberg: Springer Spektrum.
- Kloppel, G., & Luttges, J. (2001). WHO-classification 2000: exocrine pancreatic tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol*, *85*, 219-228.
- Krebsforschungszentrum, D.-D. (2015). Krebsatlas- Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen Retrieved 03.04.2015, 9:03 Uhr, 2015
- Krebsregisterdaten, Z. f. (2015). Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom). Retrieved 04.04.2015, 11:32 Uhr, 2015
- Kumar, V., Abbal, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2009). *Robbins and Cotran Pathologic Basics of Disease* (Vol. 8. Auflage). USA: Saunders.
- Kuno, K., & Matsushima, K. (1994). The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol*, *56*(5), 542-547.
- Lamken, P., Gavutis, M., Peters, I., Van der Heyden, J., Uze, G., & Piehler, J. (2005). Functional cartography of the ectodomain of the type I interferon receptor subunit ifnar1. *J Mol Biol*, *350*(3), 476-488. doi: 10.1016/j.jmb.2005.05.008
- Lankisch, P. G., Apte, M., & Banks, P. A. (2015). Acute pancreatitis. *Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60649-8

- Lankisch, P. G., Lohr-Happe, A., Otto, J., & Creutzfeldt, W. (1993). Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease. *Digestion*, *54*(3), 148-155.
- Lerch, M. M. (2015). Akute Pankreatitis - Klinik, Pathogenese und Diagnostik. Retrieved 07.04.2015, 16:17 Uhr, 2015
- Li, Y., Srivastava, K. K., & Plataniotis, L. C. (2004). Mechanisms of type I interferon signaling in normal and malignant cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, *52*(3), 156-163.
- Liou, G. Y., & Storz, P. (2015). Inflammatory macrophages in pancreatic acinar cell metaplasia and initiation of pancreatic cancer. *Oncoscience*, *2*(3), 247-251.
- Logsdon, C. D., & Ji, B. (2013). The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *10*(6), 362-370. doi: 10.1038/nrgastro.2013.36
- Lohr, M., Kloppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B., & Luttges, J. (2005). Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*, *7*(1), 17-23. doi: 10.1593/neo.04445
- Lüllmann-Rausch, R. (2009). *Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme.
- Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B., Mullhaupt, B., Cavallini, G., Lankisch, P. G., Andersen, J. R., . . . Ammann, R. W. (2005). Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut*, *54*(4), 510-514. doi: 10.1136/gut.2004.039263
- Maitra, A., & Hruban, R. H. (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol*, *3*, 157-188. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305
- Makhija, R., & Kingsnorth, A. N. (2002). Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, *9*(4), 401-410. doi: 10.1007/s005340200049
- Malek, S., Huxford, T., & Ghosh, G. (1998). Ikappa Balpha functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF-kappaB. *J Biol Chem*, *273*(39), 25427-25435.
- Mantovani, A., Germano, G., Marchesi, F., Locatelli, M., & Biswas, S. K. (2011). Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur J Immunol*, *41*(9), 2522-2525. doi: 10.1002/eji.201141894
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, *25*(12), 677-686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015
- Masters, P. S., & Samuel, C. E. (1983). Mechanism of interferon action: inhibition of vesicular stomatitis virus replication in human amnion U cells by cloned human leukocyte interferon. II. Effect on viral macromolecular synthesis. *J Biol Chem*, *258*(19), 12026-12033.
- Metcalf, D. (1986). The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*, *67*(2), 257-267.
- Monkkonen, J., van Rooijen, N., & Ylitalo, P. (1991). Effects of clodronate and pamidronate on splenic and hepatic phagocytic cells of mice. *Pharmacol Toxicol*, *68*(4), 284-286.
- Morris, J. P. t., Wang, S. C., & Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*, *10*(10), 683-695. doi: 10.1038/nrc2899
- Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, *73*(2), 209-212.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, *8*(12), 958-969. doi: 10.1038/nri2448
- Murtaugh, L. C. (2014). Pathogenesis of pancreatic cancer: lessons from animal models. *Toxicol Pathol*, *42*(1), 217-228. doi: 10.1177/0192623313508250
- Nemunaitis, J. (1993). Macrophage function activating cytokines: potential clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol*, *14*(2), 153-171.
- Nicola, N. A., & Metcalf, D. (1986). Specificity of action of colony-stimulating factors in the differentiation of granulocytes and macrophages. *Ciba Found Symp*, *118*, 7-28.

- Niederau, C., Ferrell, L. D., & Grendell, J. H. (1985). Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology*, *88*(5 Pt 1), 1192-1204.
- O'Shea, J. J., & Paul, W. E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, *327*(5969), 1098-1102. doi: 10.1126/science.1178334
- Ortaldo, J. R., Herberman, R. B., Harvey, C., Osheroff, P., Pan, Y. C., Kelder, B., & Pestka, S. (1984). A species of human alpha interferon that lacks the ability to boost human natural killer activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*(15), 4926-4929.
- Ortaldo, J. R., Mantovani, A., Hobbs, D., Rubinstein, M., Pestka, S., & Herberman, R. B. (1983). Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer*, *31*(3), 285-289.
- Ozzello, L., Derosa, C., Habif, D., Cantell, K., & Pestka, S. (1995). Up-regulation of a tumor-associated antigen (tag-72) by interferon-alpha and interferon-gamma in patients with cutaneous breast-cancer recurrences. *Int J Oncol*, *6*(5), 985-991.
- Panet, A., & Falk, H. (1983). Inhibition by interferon of herpes simplex virus thymidine kinase and DNA polymerase in infected and biochemically transformed cells. *J Gen Virol*, *64* (Pt 9), 1999-2006.
- Papachristou, G. I. (2008). Prediction of severe acute pancreatitis: current knowledge and novel insights. *World J Gastroenterol*, *14*(41), 6273-6275.
- Parmar, S., & Plataniias, L. C. (2003). Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol*, *15*(6), 431-439.
- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(1), 49-62. doi: 10.1038/nrm2083
- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, *202*, 8-32. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, *26*(6), 509-515.
- Pinto, A. K., Ramos, H. J., Wu, X., Aggarwal, S., Shrestha, B., Gorman, M., . . . Diamond, M. S. (2014). Deficient IFN signaling by myeloid cells leads to MAVS-dependent virus-induced sepsis. *PLoS Pathog*, *10*(4), e1004086. doi: 10.1371/journal.ppat.1004086
- Pitzer, C., Kruger, C., Plaas, C., Kirsch, F., Dittgen, T., Muller, R., . . . Schneider, A. (2008). Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, *131*(Pt 12), 3335-3347. doi: 10.1093/brain/awn243
- Plataniias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, *5*(5), 375-386. doi: 10.1038/nri1604
- Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H., & Heller, H. C. (2007). *Biologie* (Vol. 1). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Rau, B., Baumgart, K., Kruger, C. M., Schilling, M., & Beger, H. G. (2003). CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med*, *29*(4), 622-629. doi: 10.1007/s00134-003-1668-4
- Rebours, V., Boutron-Ruault, M. C., Schnee, M., Ferec, C., Le Marechal, C., Hentic, O., . . . Levy, P. (2009). The natural history of hereditary pancreatitis: a national series. *Gut*, *58*(1), 97-103. doi: 10.1136/gut.2008.149179
- Rehberg, E., Kelder, B., Hoal, E. G., & Pestka, S. (1982). Specific molecular activities of recombinant and hybrid leukocyte interferons. *J Biol Chem*, *257*(19), 11497-11502.
- Rollins, B. J. (1997). Chemokines. *Blood*, *90*(3), 909-928.
- Runzi, M., Layer, P., Buchler, M. W., Beger, H. G., Ell, C., Folsch, U. R., . . . Scholmerich, J. (2000). [The therapy of acute pancreatitis. General guidelines. Working group of the Society for Scientific-Medical Specialties]. *Z Gastroenterol*, *38*(7), 571-581. doi: 10.1055/s-2000-7447

- Saccani, A., Schioppa, T., Porta, C., Biswas, S. K., Nebuloni, M., Vago, L., . . . Sica, A. (2006). p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res*, *66*(23), 11432-11440. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1867
- Saluja, A., Saito, I., Saluja, M., Houlihan, M. J., Powers, R. E., Meldolesi, J., & Steer, M. (1985). In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. *Am J Physiol*, *249*(6 Pt 1), G702-710.
- Saurer, L., Reber, P., Schaffner, T., Buchler, M. W., Buri, C., Kappeler, A., . . . Mueller, C. (2000). Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, *118*(2), 356-367.
- Scheller, J., Garbers, C., & Rose-John, S. (2014). Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol*, *26*(1), 2-12. doi: 10.1016/j.smim.2013.11.002
- Schiebler, T. H., & Korf, H.-W. (2007). *Anatomie* (Vol. 10). Darmstadt: Steinkopff.
- Schneckenleithner, C., Bago-Horvath, Z., Dolznig, H., Neugebauer, N., Kollmann, K., Kolbe, T., . . . Sexl, V. (2011). Putting the brakes on mammary tumorigenesis: loss of STAT1 predisposes to intraepithelial neoplasias. *Oncotarget*, *2*(12), 1043-1054.
- Schneider, A., Kruger, C., Steigleder, T., Weber, D., Pitzer, C., Laage, R., . . . Schabitz, W. R. (2005). The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*, *115*(8), 2083-2098. doi: 10.1172/JCI23559
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*, *32*, 513-545. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231
- Semenzato, G., Pizzolo, G., Agostini, C., Ambrosetti, A., Zambello, R., Trentin, L., . . . et al. (1986). Alpha-interferon activates the natural killer system in patients with hairy cell leukemia. *Blood*, *68*(1), 293-296.
- Shimada, M., Andoh, A., Hata, K., Tasaki, K., Araki, Y., Fujiyama, Y., & Bamba, T. (2002). IL-6 secretion by human pancreatic peri-acinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators. *J Immunol*, *168*(2), 861-868.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., . . . Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*, *18*(5), 349-355. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.004
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, *122*(3), 787-795. doi: 10.1172/JCI59643
- Silva, M. T. (2010). When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol*, *87*(1), 93-106.
- Sims, J. E., Giri, J. G., & Dower, S. K. (1994). The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol*, *72*(1), 9-14.
- Spektrum. (2015). Interferone. Retrieved 18.04.2015, 13:47 Uhr, 2015
- Spicak, J., Poulouva, P., Plucnarova, J., Rehor, M., Filipova, H., & Hucl, T. (2007). Pancreas divisum does not modify the natural course of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol*, *42*(2), 135-139. doi: 10.1007/s00535-006-1976-x
- Stanley, E. R., Berg, K. L., Einstein, D. B., Lee, P. S., Pixley, F. J., Wang, Y., & Yeung, Y. G. (1997). Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Mol Reprod Dev*, *46*(1), 4-10. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199701)46:1<4::AID-MRD2>3.0.CO;2-V
- Stefater, J. A., 3rd, Ren, S., Lang, R. A., & Duffield, J. S. (2011). Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends Mol Med*, *17*(12), 743-752. doi: 10.1016/j.molmed.2011.07.009
- Stetson, D. B., & Medzhitov, R. (2006). Type I interferons in host defense. *Immunity*, *25*(3), 373-381. doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.007



- Stock, A. T., Smith, J. M., & Carbone, F. R. (2014). Type I IFN suppresses Cxcr2 driven neutrophil recruitment into the sensory ganglia during viral infection. *J Exp Med*, *211*(5), 751-759. doi: 10.1084/jem.20132183
- Sun, L. K., Reding, T., Bain, M., Heikenwalder, M., Bimmler, D., & Graf, R. (2007). Prostaglandin E2 modulates TNF-alpha-induced MCP-1 synthesis in pancreatic acinar cells in a PKA-dependent manner. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *293*(6), G1196-1204. doi: 10.1152/ajpgi.00330.2007
- Sun, M., & Fink, P. J. (2007). A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family. *J Immunol*, *179*(7), 4307-4312.
- Tapia, J. A., Salido, G. M., & Gonzalez, A. (2010). Ethanol consumption as inductor of pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, *1*(1), 3-8. doi: 10.4292/wjgpt.v1.i1.3
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., . . . et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, *356*(6372), 768-774. doi: 10.1038/356768a0
- Tian, B., & Brasier, A. R. (2003). Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. *Recent Prog Horm Res*, *58*, 95-130.
- van den Berg, H. W., Leahey, W. J., Lynch, M., Clarke, R., & Nelson, J. (1987). Recombinant human interferon alpha increases oestrogen receptor expression in human breast cancer cells (ZR-75-1) and sensitizes them to the anti-proliferative effects of tamoxifen. *Br J Cancer*, *55*(3), 255-257.
- van Holten, J., Reedquist, K., Sattonet-Roche, P., Smeets, T. J., Plater-Zyberk, C., Vervoordeldonk, M. J., & Tak, P. P. (2004). Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, *6*(3), R239-249. doi: 10.1186/ar1165
- van Rooijen, N., & van Nieuwmegen, R. (1984). Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res*, *238*(2), 355-358.
- Vaquero, E., Gukovsky, I., Zaninovic, V., Gukovskaya, A. S., & Pandol, S. J. (2001). Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *280*(6), G1197-1208.
- Verreck, F. A., de Boer, T., Langenberg, D. M., Hoeve, M. A., Kramer, M., Vaisberg, E., . . . Ottenhoff, T. H. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(13), 4560-4565. doi: 10.1073/pnas.0400983101
- Wagner, W., Roderburg, C., Wein, F., Diehlmann, A., Frankhauser, M., Schubert, R., . . . Ho, A. D. (2007). Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*, *25*(10), 2638-2647. doi: 10.1634/stemcells.2007-0280
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, *10*(1), 45-65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189
- Watanabe, O., Baccino, F. M., Steer, M. L., & Meldolesi, J. (1984). Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol*, *246*(4 Pt 1), G457-467.
- Weiss, F. U., Simon, P., Bogdanova, N., Mayerle, J., Dworniczak, B., Horst, J., & Lerch, M. M. (2005). Complete cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene sequencing in patients with idiopathic chronic pancreatitis and controls. *Gut*, *54*(10), 1456-1460. doi: 10.1136/gut.2005.064808
- Werner-Wasik, M., von Muenchhausen, W., Nolan, J. P., & Cohen, S. A. (1989). Endogeneous interferon alpha/beta produced by murine Kupffer cells augments liver-associated natural killing activity. *Cancer Immunol Immunother*, *28*(2), 107-115.
- Wissen-Die Funktion der Bauchspeicheldrüse. (2015). Retrieved 15.04.2015, 10:13 [hr](#), 2015

## Literaturverzeichnis

---

- Witt, H., Soimon, P., & Lerch, M. M. (2015). Genetische Aspekte der chronischen Pankreatitis. Retrieved 17.04.2015, 17:45 Uhr, 2015
- Yeo, T. P. (2015). Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin Oncol*, 42(1), 8-18. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.12.002
- Yoshimura, A., Mori, H., Ohishi, M., Aki, D., & Hanada, T. (2003). Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. *Curr Opin Immunol*, 15(6), 704-708.
- Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S. K., Appella, E., Lerman, M. I., & Leonard, E. J. (1989). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett*, 244(2), 487-493.

## 7 Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Christoph Michalski sowie meinem Arbeitsgruppenleiter Prof. Jörg Kleeff für die Möglichkeit, unter ihrer Leitung meine Doktorarbeit anfertigen zu können, sowie die jahrelange Unterstützung bedanken. Durch ihre anhaltende Diskussionsbereitschaft und konstruktiven Arbeitsvorschläge haben sie mir bei der Durchführung meiner Arbeit stets wertvolle Hilfe geleistet.

Des Weiteren möchte ich Prof. Angelika Schnieke für die Übernahme des Zweitgutachtens und ihre wertvollen Anmerkungen während der „Thesis Committee meetings“ danken.

Meiner Mentorin Dr. Susanne Raulefs möchte ich an dieser Stelle für die jahrelange Betreuung und Unterstützung, sowie die Korrektur meiner Arbeit danken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Andreas und Markus für ihre Unterstützung und Hilfe bei meinen FACS-Analysen.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Maus-OPs möchte ich mich auch bei Lei Lu und Tao Cheng bedanken!

Mein herzlicher Dank gilt natürlich auch allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Kleeff, für das sehr angenehme Arbeitsklima und die Hilfe und den Rat bei allen fachlichen und auch privaten Fragen und Problemen. Besonders bedanken möchte ich mich dabei vor allem bei Nadja, Manja, Nadine, Ivonne, Carsten, Bo, Daniela, und besonders bei Simone.

Dank euch bin ich (fast) jeden Tag der letzten Jahre gerne ins Labor gekommen!

Manu, auch an dich geht ein ganz großes Dankeschön! Du hast mir während der letzten neun Jahre immer beigestanden und mit mir gelitten, gehofft, dich geärgert und gefreut und warst mir immer eine wundervolle Freundin.

Chris, du warst eine meiner wichtigsten Stützen in dieser Zeit. Du hast mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet, mich immer tatkräftig unterstützt und, wenn nötig, immer wieder zum Weitermachen ermuntert.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich aber meiner Familie aussprechen.

Ihr wart immer für mich da, habt meine Launen ertragen; ihr habt mich nach allen Kräften unterstützt und seid stets hinter mir und meinen Entscheidungen gestanden.

Ohne euch hätte ich all das nicht geschafft - Danke!