

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Angefertigt in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Universitätsklinikum Heidelberg
Direktor: Prof. Dr. med. M. W. Büchler
(PD Dr. med. O. Strobel und Prof. Dr. med. J. Werner)

Die Rolle des Rezeptors for Advanced Glycation Endproducts RAGE in der chronischen Pankreatitis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Rena Sarah Ruhl
aus
Filderstadt

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Chronische Pankreatitis	1
1.1.1 Chronische Entzündung, Metaplasie und Karzinogenese im Pankreas des Menschen	1
1.1.2 Modelle der chronischen Pankreatitis in der Maus	2
1.2 RAGE, der “Rezeptor for Advanced Glycation Endproducts”	5
1.2.1 Struktur und Eigenschaften	5
1.2.2 Liganden von RAGE	7
1.2.3 Rolle von RAGE bei entzündlichen Erkrankungen, Fibrose und Karzinogenese.....	11
1.2.4 Rolle von RAGE bei Pankreaserkrankungen	12
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 <i>In vivo</i> Studie an der Maus.....	14
2.1.1 Versuchstiere.....	14
2.1.2 <i>In vivo</i> Studiendesign.....	15
2.1.2.1 Cerulein-Modell	16
2.1.2.2 Gangligatur-Modell	16
2.1.3 Probenentnahme	18
2.1.4 Histologische und (immun) histochemische Analysen	19
2.1.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)	20
2.1.4.2 Perjodsäure-Schiff’sche Färbung (PAS).....	21
2.1.4.3 Alzianblau Färbung (AB)	22
2.1.4.4 Toluidinblau-Färbung (TB).....	23
2.1.4.5 Immunhistochemische Untersuchungen.....	24
2.1.5 RNA Expressionsanalysen	26
2.1.5.1 mRNA Isolierung aus dem Gewebe	26
2.1.5.2 cDNA –Synthese (Reverse Transkription).....	26
2.1.5.3 Echtzeit quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)	27
2.2 Untersuchungen an humanem Gewebe.....	28

2.2.1	Herkunft und Aufarbeitung der Proben	28
2.2.2	RNA Expressionsanalysen	28
2.3	Statistische Auswertung	28
3	Ergebnisse	29
3.1	<i>In vivo</i> Studie an der Maus	29
3.1.1	Modelle der chronischen Pankreatitis	29
3.1.2	Expression von RAGE und seines Liganden HMGB1 in der CP	31
3.1.3	Expression zentraler Entzündungsmediatoren und Fibrose-vermittelnder Mediatoren	33
3.1.4	Bedeutung einer RAGE-Defizienz in der CP	36
3.1.5	Gewichtvergleich	53
3.2	Expressionsanalyse in humanen Proben	54
3.2.1	Expression von RAGE	54
4	Diskussion	55
4.1	Wahl des Modells	55
4.2	Physiologische Bedeutung von RAGE bei der chronischen Pankreatitis im Mausmodell	56
4.3	Bedeutung von RAGE in der Karzinomentstehung	59
4.4	Rückschlüsse auf die humane Erkrankung	60
4.5	Schlussfolgerungen	60
5	Zusammenfassung	62
6	Summary	64
7	Literaturverzeichnis	66
8	Anhang	73
8.1	Material	73
8.1.1	Geräte und Software	73
8.1.2	Verbrauchsmaterialien	73
8.1.3	Chemikalien und Reagenzien	74
8.1.4	Puffer und Lösungen	75
8.1.5	Antikörper	78
8.1.6	Medikamente	79
9	Danksagung	80

Abkürzungsverzeichnis

AB	Alzianblau Färbung
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
AK	Antikörper
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
CP	Chronische Pankreatitis
GIT	Gastrointestinaltrakt
HMGB1	High Mobility Group Box Protein 1
IHC	Immunhistochemie
I.P.	Intraperitoneal
KO	Knockout
MDL	Metaplastische duktale Läsionen
MML	Muzinös metaplastische Läsionen
mRNA	Messenger-RNA
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PAS	Perjodsäure-Schiff'sche Färbung
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RAGE ^{+/+}	RAGE-Wildtyp
RAGE ^{-/-}	RAGE-Knockout
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Echtzeit quantitative Polymerasekettenreaktion
SEM	Standard Error of the Mean
TB	Toluidinblau-Färbung
TC	Tubuläre Komplexe
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TLR	Toll-like Receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VE	voll entmineralisiert
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Metaplastische duktale Läsionen im Mausmodell der CP	4
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über RAGE	6
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über RAGE	8
Abbildung 2-1: Entnommenes Präparat zur Histologie (Mausgewebe)	18
Abbildung 3-1: Histologische Veränderungen des Pankreas in der CP	30
Abbildung 3-2: Expression von RAGE im gesunden Pankreas und in der CP	31
Abbildung 3-3: Expression von RAGE in der CP (Immunhistochemie) RAGE ^{+/+}	32
Abbildung 3-4: Expression von HMGB1 im gesunden Pankreas und in der CP	33
Abbildung 3-5: Expression von NF- κ B -p65 im gesunden Pankreas und in der CP .	34
Abbildung 3-6: Expression von TNF- α im gesunden Pankreas und in der CP	35
Abbildung 3-7: Expression von TGF- β im gesunden Pankreas und in der CP	35
Abbildung 3-8: Histologische Veränderungen des exokrinen Pankreasgewebes	37
Abbildung 3-9: Entzündung (A) und Entzündungsaktivität (B)	38
Abbildung 3-10: Ausmaß der Mastzellinfiltration im peripankreatischen Gewebe (A), in den großen Gängen (B) und den kleinen Gängen (C)	40
Abbildung 3-11: Ausprägung der intralobulären und interlobulären Fibrose	41
Abbildung 3-12: Kollagen-Expression in der CP	43
Abbildung 3-13: Expression von α -SMA	45
Abbildung 3-14: Ausbildung tubulärer Komplexe	46
Abbildung 3-15: Ausbildung muzinöser metaplastischer Gang-Läsionen	48
Abbildung 3-16: Proliferationsaktivität in der CP anhand der Ki-67 Expression	49
Abbildung 3-17: Ödembildung	50
Abbildung 3-18: Untersuchung des endokrinen Pankreas	51
Abbildung 3-19: Histologische Veränderungen des Pankreas im Gangligatur-Modell	52
Abbildung 3-20: Gewichtsvergleich der 10 Wochen-Tiere	53
Abbildung 3-21: RAGE-Expression in humanem Gewebe	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studiendesign, Versuchstiergruppen und Anzahl der verwendeten Versuchstiere.....	15
Tabelle 2: Übersicht der durchgeführten histologischen und (immun) histochemischen Analysen (Mausgewebe)	19
Tabelle 3: Bewertungsschema Fibrose	21
Tabelle 4: Details zu den immunhistochemischen Protokollen (Mausgewebe)	25

1 Einleitung

1.1 Chronische Pankreatitis

1.1.1 Chronische Entzündung, Metaplasie und Karzinogenese im Pankreas des Menschen

Bei der chronischen Pankreatitis (CP) kommt es durch eine anhaltende Entzündungsreaktion zu einer dauerhaften Gewebsschädigung der Bauchspeicheldrüse mit Störung der exokrinen (Verdauungsenzyme) und endokrinen (Hormone) Funktion. Histologisch ist die chronische Pankreatitis gekennzeichnet durch einen fibrotischen Umbau mit Verlust von funktionellem exokrinen Drüsengewebe und von endokrinem Gewebe, durch Ersatz mit Bindegewebe, sowie durch die Bildung atypischer Gangstrukturen (duktale Metaplasie) (HACKER and CHOBANIAN 1987; HRUBAN, ADSAY et al. 2001; MUEHLING, KOLB et al. 2004). Es gibt verschiedene Ätiologien der CP, die wichtigsten sind eine chemisch-toxische (beim Menschen durch Alkohol-Abusus induzierte) und eine obstruktive (z.B. durch Gallensteine) Entstehungsform (STEVENS, CONWELL et al. 2004).

Die in der CP auftretenden metaplastischen duktafen Läsionen (MDL) können einerseits in Tubuläre Komplexe (TC) und andererseits in muzinöse metaplastische Läsionen (MML) eingeteilt werden, die sich morphologisch und in ihrer Bedeutung unterscheiden (STROBEL, DOR et al. 2007). Die tubulären Komplexe werden beschrieben als zylinderförmige, meist mit breitem Lumen ausgekleideten Kanäle, die aus einer Basalzellschicht mit abgeflachten gangartigen Zellen bestehen (WILLEMER and ADLER 1989; LECHENE DE LA PORTE, IOVANNA et al. 1991). Die muzinösen metaplastischen Läsionen werden auch als PanIN (Pankreatische intraepitheliale Neoplasien) bezeichnet und klassifiziert und gelten als Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms (HRUBAN, ADSAY et al. 2001). Metaplastische duktafe Läsionen sind regelmäßig sowohl in der CP als auch im umgebenden Gewebe beim Pankreaskarzinom zu beobachten, weshalb die duktafe Metaplasie als ein früher Schritt der entzündungsvermittelten Tumorentstehung gilt (HRUBAN, ADSAY et al. 2001). Die Mechanismen, die dieser Metaplasie zugrunde

liegen, sind allerdings weitgehend unbekannt. Die CP birgt ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (RAIMONDI, LOWENFELS et al.) und kann deshalb für Untersuchungen der entzündungsvermittelten Karzinogenese verwendet werden (STROBEL, ROSOW et al. 2009).

Das unzureichende Verständnis der Pathophysiologie der CP hat zur Folge, dass bis heute keine effektive kausale Therapie dieser Erkrankung existiert. Im Verlauf kommt es bei den meisten Patienten unweigerlich zu exokriner und endokriner Insuffizienz mit Verdauungsbeschwerden und Diabetes mellitus (TOSKES 1995). Zudem kommt es zu lokalen Komplikationen wie Gallengangsobstruktionen, Pfortaderthrombose, Magenausgangsstenose und chronischem Schmerzsyndrom (HACKER and CHOBANIAN 1987) und zu einem deutlich erhöhten Karzinomrisiko (RAIMONDI, LOWENFELS et al.).

Die chronische Pankreatitis ist nicht heilbar. Bei Schmerzen und lokalen Komplikationen folgt zunächst die Behandlung mit Schmerzmitteln und der individuell angepassten Pankreasenzym- und Insulin-Substitution. Kann hierdurch und durch endoskopische Verfahren keine effiziente Schmerzlinderung erreicht werden, muss die operative Entfernung des erkrankten Gewebes erwogen werden. Allerdings behandelt diese Therapie nur die Symptome, verhindert jedoch nicht das Fortschreiten der Erkrankung (STROBEL, BUCHLER et al. 2009).

1.1.2 Modelle der chronischen Pankreatitis in der Maus

Durch den Vergleich von Wildtyp und Knockout-Tieren für ein spezifisches Gen kann die kausale Rolle dieses spezifischen Gens für eine bestimmte Erkrankung auf wissenschaftlich hochwertigem Niveau untersucht werden. Im Vergleich zur pharmakologischen Inhibition eines Genprodukts ist die Knockout-Technologie effektiver und spezifischer und führt deshalb zu valideren Ergebnissen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Rezeptors for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) untersucht werden (s. Kapitel 1.2). Für den RAGE-Rezeptor steht bislang keine spezifische pharmakologische und im Tierversuch anwendbare Blockade zur Verfügung. Für transgene *in vivo* Experimente wie die Generierung und Verwendung

von Knockout-Tieren werden in der Regel Mäuse verwendet, da sie aufgrund der Entschlüsselung des genetischen Codes, durch schnelle Generationszeiten, problemlose Aufzucht, einfache Handhabung, sowie durch Platz sparende und kostengünstige Haltung besonders gut geeignet sind (SACHS and NIESWANDT 2007). In dieser Arbeit wurden eigens für Experimente gezüchtete Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 verwendet (LILIENSIEK, WEIGAND et al. 2004).

Es wurden in der Literatur mehrere Tiermodelle beschrieben, welche die oben genannten Charakteristika der humanen CP rekapitulieren. Das Cerulein-Modell der CP (DEMOLS, VAN LAETHEM et al. 2002; STROBEL, DOR et al. 2007) und das Gangligatur-Modell (SAKAGUCHI, INABA et al. 2006) gelten beide als gut charakterisierte und zuverlässige Modelle der CP.

Beim Cerulein-Modell kommt es entsprechend der alkoholisch-toxischen Pankreatitis beim Menschen durch Überstimulation des Pankreas mit dem Cholezystokinin-Analogon Cerulein zunächst zu einer milden akuten Pankreatitis und durch die repetitiven Schübe zur Ausbildung einer CP. Cerulein wirkt chemisch-toxisch und setzt einen spezifischen rezeptorvermittelten Prozess in Gang. Die Hyperstimulation der exokrinen Funktion des Pankreas führt zur Pankreatitis, indem Verdauungsenzyme durch Autodigestion das Pankreasparenchym schädigen. In diesem Modell entwickeln sich zwischen 2 und 12 Wochen verschiedene metaplastische duktale Läsionen (MDL), welche anhand ihrer Morphologie in tubuläre Komplexe (TC) und muzinös metaplastische Läsionen (MML) unterschieden werden können. MML werden beim Mensch auch pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) genannt (HRUBAN, ADSAY et al. 2001). Die Mechanismen der Entstehung dieser Läsionen sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Bei der Pankreatitis treten beide Formen auf (BOCKMAN, BOYDSTON et al. 1982; WILLEMER and ADLER 1989) und scheinen einen frühen Schritt in der Tumorgenese zu repräsentieren (PARSA, LONGNECKER et al. 1985; HRUBAN, ADSAY et al. 2001). Alle genannten Läsionen wurden auch im Cerulein-Modell der CP in der Maus beschrieben (STROBEL, DOR et al. 2007; STROBEL, DOR et al. 2007) (s. Abbildung 1-1). Neben der Entstehung der Läsionen führt dieses Modell zur Atrophie des exokrinen Pankreas mit Verlust funktioneller Azini und einer deutlichen, jedoch im Vergleich zur humanen CP relativ gering ausgeprägten Fibrose. Die

Langerhans'schen Inselzellen des endokrinen Pankreas bleiben wie in der frühen humanen CP in den Mausmodellen der CP weitgehend unbeeinflusst (STROBEL, DOR et al. 2007).

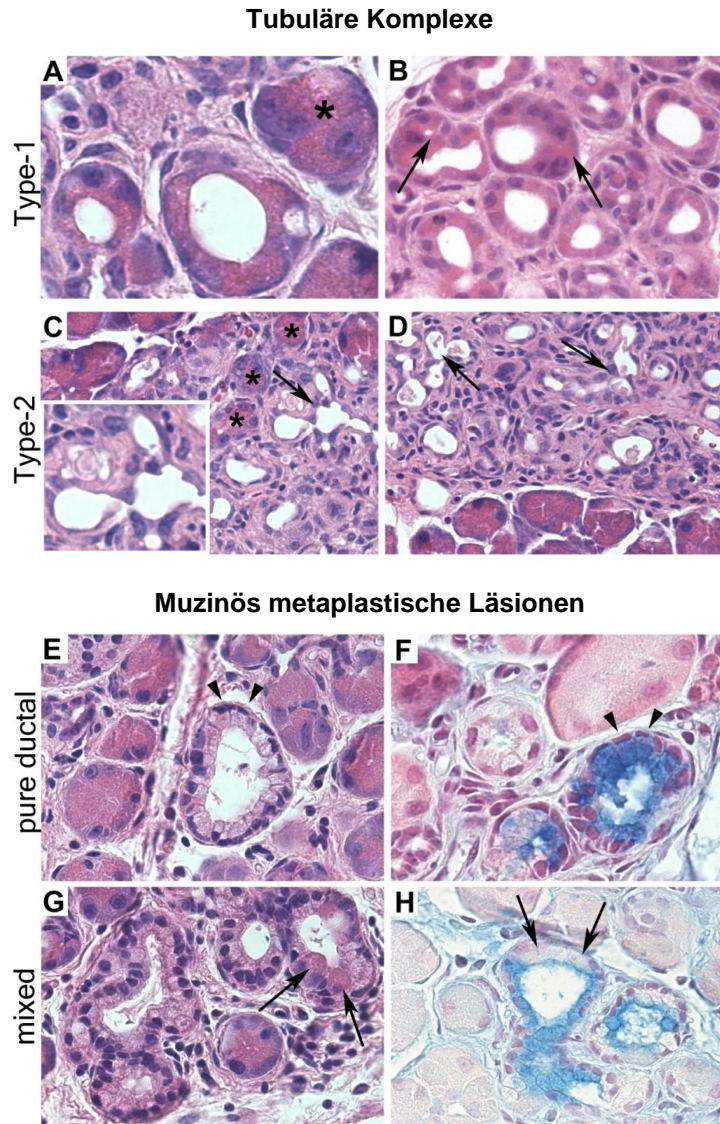


Abbildung 1-1: Metaplastische duktale Läsionen im Mausmodell der CP

A-D: Ausbildung verschiedener Tubulärer Komplexe. **A+B:** Typ-1 Tubuläre Komplexe mit wenigen großen Zellen.
C+D: Typ-2 Tubuläre Komplexe mit mehreren kleinen Zellen. **E-H:** Ausbildung verschiedener metaplastischen muzinösen Läsionen (MML). **E+G:** Periodsäure-Schiff's Färbung. **F+H:** Alzianblau Färbung. MML bestehen aus Zellen mit reichlich oberhalb der Zellkerne erkennbaren Muzinen (türkis gefärbt). Die Zellkerne sind abgeflacht.
 Modifiziert aus (STROBEL, DOR et al. 2007).

Das Gangligatur-Modell imitiert die obstruktive Genese der humanen CP, bei der es durch Gallensteine, Pankreassteine, oder im Rahmen einer autoimmunen Pankreatitis zu Stenosen und Obstruktionen kommt, die ein Fortschreiten der Entzündung verursachen (SAKAGUCHI, INABA et al. 2006). Es wird angenommen dass der resultierende Reflux von Galle die häufig beobachtete Pankreatitis auslöst (SAKAGUCHI, INABA et al. 2006). Im Vergleich zum Cerulein-Modell führt das Gangligatur-Modell jedoch zu weniger metaplastischen Läsionen.

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Modelle verwendet, um sowohl die chemisch-toxische als auch die obstruktive Entstehungsmechanismen der humanen CP abzubilden.

1.2 RAGE, der “Rezeptor for Advanced Glycation Endproducts”

1.2.1 Struktur und Eigenschaften

RAGE ist ein membranständiger Oberflächenrezeptor, der eine Reihe unterschiedlicher Liganden bindet. RAGE gehört zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie der Zelloberflächenmoleküle (SCHMIDT, MORA et al. 1994), dessen Gen beim Mensch und bei der Maus auf Chromosom 6 in der Nähe des MHC-3 Komplexes lokalisiert ist (MALHERBE, RICHARDS et al. 1999). Das Molekül setzt sich aus drei Einheiten zusammen, einer V- und zwei C-Domänen, sowie einer kurzen transmembranösen Domäne und einem intrazytoplasmatischen 43-Aminosäuren langen Fortsatz, der für die intrazelluläre Signaltransmission zuständig ist. Die Bindung der Liganden vermittelt die nach extrazellulär gelegene „V“-Typ-Domäne (NEEPER, SCHMIDT et al. 1992; SCHMIDT, VIANNA et al. 1992; SCHMIDT, MORA et al. 1994; SAKAGUCHI, INABA et al. 2006).

Während RAGE in der embryonalen Entwicklung in allen Geweben kontinuierlich exprimiert wird (OLDFIELD, BACH et al. 2001), wird RAGE im gesunden reifen Organismus deutlich seltener exprimiert, mit Ausnahme einer starken Expression in der Haut, in der Lunge und in bestimmten Zellen des Immunsystems. Die Expression

von RAGE ist induzierbar. Die meisten Zellen, darunter Monozyten und Makrophagen, produzieren unter natürlichen Bedingungen nur geringe Mengen von RAGE auf der Zelloberfläche (BRETT, SCHMIDT et al. 1993). Dies kann sich jedoch ändern, falls potentielle Liganden in der Umgebung akkumulieren und entsprechende Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (BIERHAUS, CHEVION et al. 1997).

Die Bindung von unterschiedlichen Liganden (s. Kapitel 1.2.2) resultiert in einer intrazellulären Signaltransduktion, welche zur anhaltenden Aktivierung des in der Pankreatitis wichtigen proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (BIERHAUS, SCHIEKOFER et al. 2001). Diese anhaltende Aktivierung von NF- κ B resultiert in der Hochregulierung von RAGE und gewährleistet die Aufrechterhaltung und Verstärkung des Signals (Abbildung 1-2).

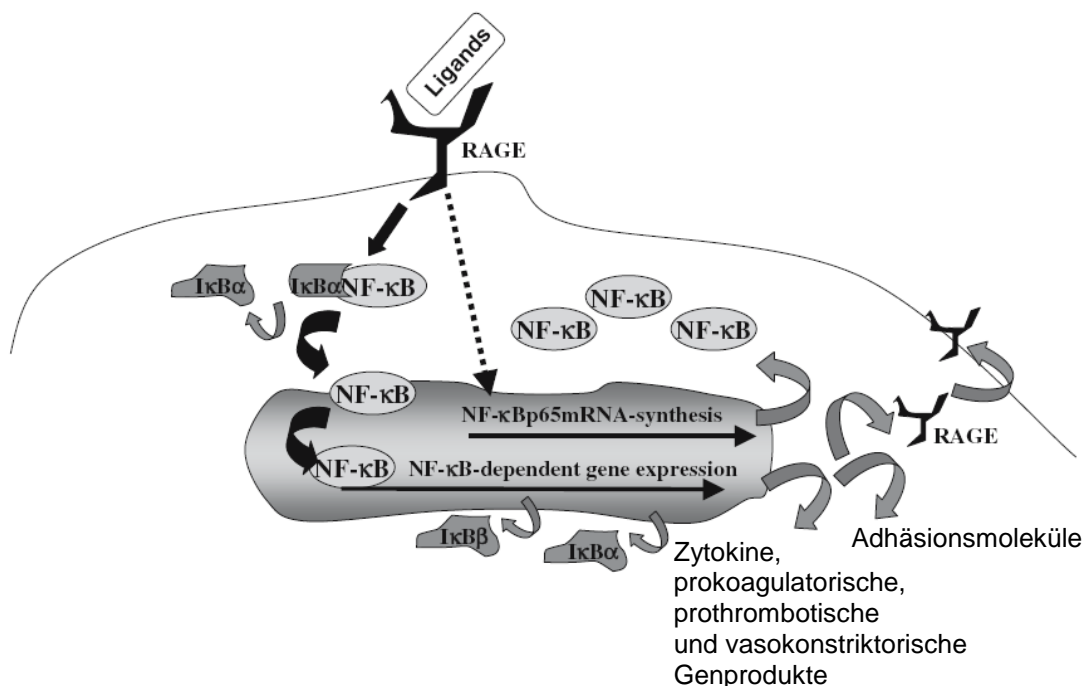


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über RAGE

Nach Bindung der RAGE-Liganden kommt es zur Aktivierung und Hochregulierung von NF- κ B und hierdurch zur Expression NF- κ B abhängiger Gene, unter anderem von RAGE selbst. Modifiziert aus (HOFMANN, DRURY et al. 1999; BIERHAUS, HUMPERT et al. 2005).

1.2.2 Liganden von RAGE

RAGE kann als Pattern Recognition Rezeptor multiple Liganden binden. Die Bindung von RAGE an Liganden führt zu einer schnellen und anhaltenden Zellaktivierung durch Gentranskription (BIERHAUS, SCHIEKOFER et al. 2001). Zu den Liganden von RAGE zählen S100 Proteine (S100A8 und S100A9), „High mobility group box-1“ (HMGB1; weitere Synonyme sind HMG-1 oder Amphoterin (TAGUCHI, BLOOD et al. 2000)), Advanced Glycation End Products (AGEs; (KISLINGER, FU et al. 1999)), Amyloid- β -Peptid (kumuliert bei Alzheimer (YAN, CHEN et al. 1996; DU YAN, ZHU et al. 1997)) und Amyloid A (bei systemischer Amyloidose) (WANG, BLOOM et al. 1999; SCHMIDT, HOFMANN et al. 2000; YAN, ZHU et al. 2000; SCHMIDT, YAN et al. 2001). RAGE interagiert ebenfalls mit Oberflächenmolekülen von Bakterien (CHAPMAN, ROBINSON et al. 2002), Prionen (SASAKI, TAKEUCHI et al. 2002) und Leukozyten (CHAVAKIS, BIERHAUS et al. 2003). Nachfolgend werden die Liganden von RAGE und ihre Funktion beschrieben (Abbildung 1-3). Die in dieser Arbeit untersuchten Liganden werden detailliert erläutert.

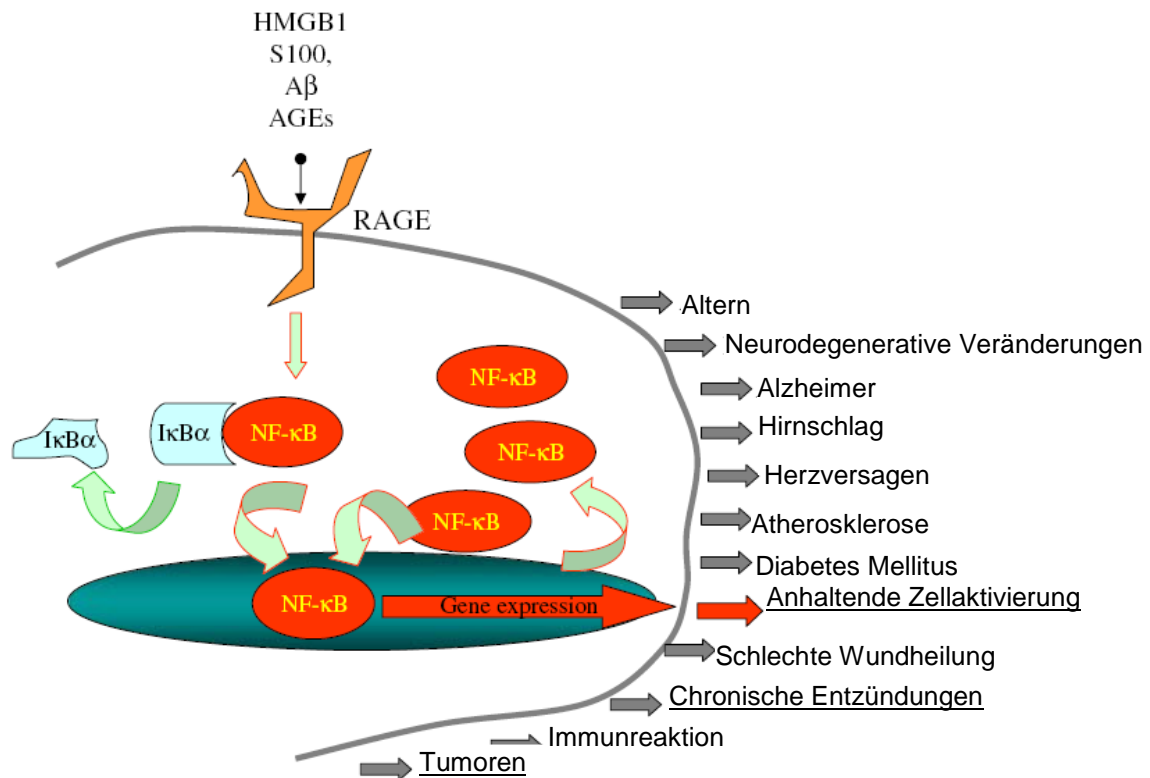


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über RAGE

Mehrere wichtige Mechanismen in der CP und Karzinogenese werden von RAGE beeinflusst. Modifiziert aus (BIERHAUS and NAWROTH 2009).

S100A8 und S100A9

S100A8 (Calgranulin A, MRP8) und S100A9 (Calgranulin B, MRP14) sind Proteine der S100-Familie. Der Name dieser Proteinfamilie leitet sich von ihrer Eigenschaft ab, dass sie in gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung löslich bleiben, während andere Proteine ausfallen. Die Proteine der S100-Familie sind Kalzium-bindende Proteine, die in Abhängigkeit der intrazellulären Kalzium-Konzentration andere Proteine aktivieren. Die S100-Proteine beinhalten ein spezifisches Aminosäuremotiv, den EF-Hand Typ (DONATO 2001; MARENHOLZ, HEIZMANN et al. 2004)). Die EF-Hand besteht aus zwei α -Helices (E- und F-Helix), welche durch eine Kalzium-bindende Schleife miteinander verbunden sind. Die Proteine S100A8 und S100A9 sind auf dem Chromosom 1q21 lokalisiert (SCHUTTE, CARPTEN et al. 2001). S100A8 und S100A9 gelten als wichtige proinflammatorische Mediatoren bei akuten und chronischen Entzündungen (GEBHARDT, NEMETH et al. 2006). Sie akkumulieren im Extrazellulärraum bei chronischen Entzündungsreaktionen

(HOFMANN, DRURY et al. 1999). Weiterhin scheinen S100A8 und S100A9 in das Entzündungsgeschehen involviert zu sein, indem sie zur Migration von Phagozyten beitragen und die Leukozytenrekrutierung fördern (ROTH, VOGL et al. 2003). Calprotectin, ein Heterodimer aus den beiden Proteinen S100A8 und S100A9, wurde in vergangenen Studien beschrieben als ein Protein, das von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (DALE, FAGERHOL et al. 1983; STEINBAKK, NAESS-ANDRESEN et al. 1990). S100A8 und S100A9 wirken chemotaktisch auf Monozyten (ROTH, VOGL et al. 2003; RYCKMAN, VANDAL et al. 2003; FOELL, FROSCH et al. 2004).

Im Prostatakarzinom wurden ebenfalls erhöhte Werte von S100A8/A9 festgestellt. Eine erhöhte Expression in den Tumorzellen führt hier zur Aktivierung von NF- κ B (HERMANI, DE SERVI et al. 2006).

HMGB1

Das Protein HMGB1 (High Mobility Group Box 1) wurde als nukleäres Protein, welches an die DNA bindet (BUSTIN, LEHN et al. 1990) und von nekrotischen Zellen freigesetzt wird, beschrieben (HORI, BRETT et al. 1995; WANG, BLOOM et al. 1999; ANDERSSON and TRACEY 2003; TREUTIGER, MULLINS et al. 2003). Benannt wurde HMGB1 nach seiner charakteristisch hohen Laufgeschwindigkeit in der Polyacrylamid-gelelektrophorese (GOODWIN and JOHNS 1977). HMGB1 kommt in allen Säugetierzellen sowie in Hefen, Pflanzen und Bakterien vor. Die höchsten HMGB1-Konzentrationen befinden sich im Thymusgewebe und in undifferenzierten Geweben, in lymphatischem Gewebe, im Hoden und in der Leber von Neugeborenen (YANG, WANG et al. 2005). HMGB1 findet sich in Zellen des Gehirns und der Leber im Zytoplasma, in den meisten anderen Geweben im Zellkern (YANG, WANG et al. 2005). HMGB1 ermöglicht innerhalb des Zellkerns durch Interaktion mit Histonen strukturelle Veränderungen der DNA-Doppelhelix und reagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren. Somit nimmt es direkten Einfluss auf die Transkription und Genrekombination (LANDSMAN and BUSTIN 1993). Neben den intranukleären Funktionen wurden auch extrazelluläre Funktionen beschrieben, vor allem als Alarmin (YANG, CHEN et al. 2007) in der Entzündungsreaktion und Immunantwort. Durch die Ausschwemmung ins Blut kann HMGB1 an andere Zellen binden, dies geschieht über den Rezeptor RAGE sowie die Toll-like Rezeptoren 4 und 2 (TLR-4,

TLR-2) (PARK, SVETKAUSKAITE et al. 2004). Hierdurch werden Signale übermittelt, die zu Fieber, Störungen der epithelialen Integrität, chemotaktischer Zellwanderung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. Tumornekrosefaktoren (TNF- α) und Interleukinen (Interleukin- β) führen. Somit ist HMGB1 an der Entstehung einer akuten Entzündungsreaktion beteiligt (WANG, YANG et al. 2004; YANG, WANG et al. 2005). Aufgrund seiner Eigenschaften als Entzündungsmediator wurde HMGB1 als Zytokin und Alarmin klassifiziert (YANG, CHEN et al. 2007). Eine Eigenschaft von Alarminen ist ihre Freisetzung bei unkontrolliertem Zelltod (Nekrose) (BIANCHI 2007).

Advanced Glycation End Products (AGEs)

Biochemisch gesehen sind AGEs die Endprodukte einer nicht enzymatischen Reaktion von Zuckern mit Proteinen. Für die Entstehung von AGEs konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, insbesondere rezidivierende Hyperglykämien und oxidativer Stress (KISLINGER, FU et al. 1999). Sie akkumulieren im Gewebe bei normalen Alterungsprozessen und sind erhöht bei Diabetes mellitus sowie bei Atherosklerose (BROWNLEE, CERAMI et al. 1988; BAYNES 1991; RUDERMAN, WILLIAMSON et al. 1992). AGEs sind in der Lage selbst oder über die Interaktion mit Rezeptoren die Zellhomöostase zu beeinflussen. AGEs üben ihre biologische Wirkung sowohl durch Rezeptor-abhängige als auch -unabhängige Signalwege aus (DE VRIESE, TILTON et al. 2006). Die Anreicherung von AGEs fördert die Oberflächenexpression von RAGE. Das Zusammenspiel von AGEs mit dem Rezeptor RAGE aktiviert multiple Signaltransduktionswege die zur Sekretion von Zytokinen, Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und zur Produktion von Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF β , führen (YAN, RAMASAMY et al. 2003).

Zumindest für einen Teil dieser RAGE-Liganden wurden Toll-like Rezeptoren als alternative Rezeptoren identifiziert (AKIRA, TAKEDA et al. 2001). So bindet HMGB1 an TLR-2 und -4 und führt zu einer verstärkten Entzündungsreaktion, ausgelöst durch Lipoproteine (LPS) (PARK, SVETKAUSKAITE et al. 2004). Toll-like Rezeptoren sind Transmembranproteine, die für die angeborene Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Weiterhin können diese Rezeptoren körpereigene oder

fremde Stoffe erkennen und entsprechende Signale weiterleiten (PASARE and MEDZHITOV 2004).

1.2.3 Rolle von RAGE bei entzündlichen Erkrankungen, Fibrose und Karzinogenese

Dem Rezeptor RAGE wird eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von Gewebsschädigungen bei chronischen Entzündungen zugeschrieben (HOFMANN, DRURY et al. 1999; BIERHAUS, HUMPERT et al. 2005). RAGE ist bei verschiedenen Entzündungsreaktionen hochreguliert, wie z.B. bei rheumatischer Arthritis (SCHMIDT, HOFMANN et al. 2000; BASTA, LAZZERINI et al. 2002; HOFMANN, DRURY et al. 2002), Atherosklerose (PARK, RAMAN et al. 1998; SCHMIDT and STERN 2000; HOFMANN, LALLA et al. 2001; KISLINGER, TANJI et al. 2001), sowie anderen Entzündungsgeschehen (TAGUCHI, BLOOD et al. 2000; GOOVA, LI et al. 2001; LALLA, LAMSTER et al. 2001; LUE, WALKER et al. 2001; HOU, JIANG et al. 2002). In mehreren Studien mit RAGE^{-/-} Mäusen wurde die wichtige Rolle von RAGE bei unspezifischer Immunabwehr und chronischer Entzündung bestätigt (SCHMIDT, YAN et al. 2001; CHAVAKIS, BIERHAUS et al. 2003; LILIENSIEK, WEIGAND et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass RAGE als ein Oberflächenrezeptor agiert, der sich auf Endothelzellen befindet und Leukozyten in der unmittelbaren Umgebung der Entzündung anlockt (CHAVAKIS, BIERHAUS et al. 2003).

RAGE vermittelt die Transdifferenzierung von Epithel zu Bindegewebe und führt zu vermehrter Kollagenproduktion (ISHIGURO, NAKAIGAWA et al. 2005; DE VRIESE, TILTON et al. 2006). Die Interaktion von RAGE und AGEs mit einer nachfolgenden Hochregulierung von TGF β und der Transdifferenzierung von Mesothelzellen ist an der peritonealen Fibrose (DE VRIESE, TILTON et al. 2006) und an der Entstehung von Lungenfibrose beteiligt (HE, KUBO et al. 2007). Weiterhin scheint RAGE eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie zu spielen (TAGUCHI, BLOOD et al. 2000). Untersuchungen am Prostatakarzinom deuten daraufhin, dass RAGE in Vorläuferläsionen des Karzinoms hochreguliert ist (TAGUCHI, BLOOD et al. 2000; HERMANI, HESS et al. 2005; ISHIGURO, NAKAIGAWA et al. 2005), was auf eine

Bedeutung in der Karzinogenese schließen lässt. Die RAGE-Aktivierung scheint die Tumorentwicklung durch Aufrechterhaltung der Entzündung während der Promotionsphase der chemisch induzierten Karzinogenese zu steuern (GEBHARDT, RIEHL et al. 2008). Auf der anderen Seite ist RAGE im Lungenkarzinom herunter reguliert (JING, CUI et al.; BARTLING, HOFMANN et al. 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass RAGE in verschiedenen Organen und in unterschiedlichem Kontext ungleiche Einflüsse vermitteln kann.

Die chronische Pankreatitis ist gekennzeichnet durch chronische Entzündung, Fibrose und die Bildung einer duktaalen Metaplasie als frühes Ereignis in der Karzinogenese. Wie oben beschrieben wurde in verschiedenen Organen eine Rolle von RAGE bei all diesen Veränderungen beschrieben. Diese Befunde legen nahe, dass RAGE auch bei der chronischen Pankreatitis eine wichtige Rolle spielen könnte.

1.2.4 Rolle von RAGE bei Pankreaserkrankungen

Bei Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse wird zwischen Erkrankungen des endokrinen und exokrinen Pankreas unterschieden. Zu den wichtigsten Erkrankungen des endokrinen Pankreas zählt der Diabetes mellitus. Bei dieser Erkrankung, bei der es regelhaft zur vermehrten Bildung von AGEs kommt, scheint RAGE in der Pathogenese der Folgeerkrankungen und Komplikationen, z.B. der Retinopathie (HUDSON, STICKLAND et al. 2001), den Nephropathien (YAMAMOTO, KATO et al. 2001; WENDT, TANJI et al. 2003) und bei der Atherosklerose (PARK, RAMAN et al. 1998) eine große Rolle zu spielen.

Zu den Erkrankungen der exokrinen Bauchspeicheldrüse gehören die akute und die chronische Entzündung und das Pankreaskarzinom. Es scheint *in vitro* einen Zusammenhang zwischen RAGE und der Tumorprogression von Pankreaskarzinomzelllinien zu geben (ARUMUGAM, SIMEONE et al. 2005). Bisher existieren jedoch noch keine Studien zur Rolle von RAGE in der CP und in der Karzinogenese im Pankreas.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Während die Rolle von RAGE bei anderen durch eine chronische Entzündung gekennzeichneten Erkrankungen nachgewiesen wurde, ist die Bedeutung von RAGE in der Pathophysiologie der CP bisher unbekannt. Unsere Arbeitshypothese war, dass RAGE eine wichtige Rolle bei dieser Erkrankung spielen könnte.

Das Ziel der vorliegenden Studie war deshalb, die Bedeutung von RAGE für die Entwicklung der entzündlichen Reaktion, der Fibrose, der duktaalen Metaplasie sowie für die Schädigung des endokrinen Pankreas bei der chronischen Pankreatitis im Tiermodell an $RAGE^{+/+}$ (Wildtyp) und $RAGE^{-/-}$ (RAGE-Knockout) Mäusen vergleichend zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 *In vivo* Studie an der Maus

2.1.1 Versuchstiere

Das vorliegende Versuchsvorhaben wurde vom Regierungspräsidium Karlsruhe gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierschG in der Fassung vom 25. Mai 1998) geprüft und genehmigt.

Die Wildtyp-Mäuse wurden von Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld) bezogen. Die Knockout-Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe Bierhaus generiert und charakterisiert (LILIENSIEK, WEIGAND et al. 2004). Alle Tiere wurden in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg fach- und artgerecht unter SPF-Bedingungen (spezifisch pathogenfrei) gehalten.

Angesichts der komplexen und großteils unbekanntem Pathophysiologie der CP und der Komplexität des RAGE-Signalweges mit multiplen Liganden, war eine Untersuchung der Rolle von RAGE durch mathematisch-physiologische Simulation, durch Anwendung von Computermodellen oder durch *in vitro*-Experimente nicht möglich. Eine Alternative zum Tierversuch bestand somit nicht. Die Untersuchung an RAGE^{-/-} Tieren gewährleistete eine wissenschaftlich valide und definitive Beantwortung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellung.

Die Relevanz der im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse für die menschliche Erkrankung wurde durch Expressionsanalysen humaner Gewebe überprüft.

2.1.2 *In vivo* Studiendesign

Die Versuche wurden an 58 weiblichen und 69 männlichen C57Bl/6 Mäusen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 23 g durchgeführt. Es erfolgte keine Konditionierung, kein Futter- oder Wasserentzug und keine Vorbehandlung. Die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Versuchsgruppen wurde vor Induktion der Pankreatitis festgelegt. Nach und während Induktion der Pankreatitis hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser.

Um die gesamte Bandbreite der histologischen Veränderungen zu erfassen und die beiden Hauptmechanismen (chemisch-toxisch und obstruktiv) der humanen CP zu untersuchen, wurden die Versuche an zwei unterschiedlichen Modellen, dem Cerulein-Modell (chemisch-toxisch) und dem Gangligatur-Modell (obstruktiv), durchgeführt (s. Kapitel 1.1.2).

Zunächst wurden die Tiere in zwei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe (Cerulein-Modell) wurde die Pankreatitis durch intraperitoneale (i.p.) Injektionen von Cerulein (Takus 40 µg®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) ausgelöst. In der zweiten Gruppe (Gangligatur-Modell) erfolgte die Pankreatitisinduktion durch selektives Ligieren der Pankreasgänge zweiter Ordnung. In Tabelle 1 ist die Anzahl der verwendeten RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstiere mit der jeweiligen Versuchsdauer und dem entsprechend angewandten Modell dargestellt. Als gesunde nicht behandelte Kontrollgruppe dienten 11 Tiere jeweils vergleichbaren Alters.

Tabelle 1: Studiendesign, Versuchstiergruppen und Anzahl der verwendeten Versuchstiere

Versuchsdauer	Cerulein-Modell		Gangligatur-Modell	
	RAGE ^{+/+}	RAGE ^{-/-}	RAGE ^{+/+}	RAGE ^{-/-}
3 Wochen	8	8	5	14
6 Wochen	8	7	9	21
10 Wochen	8	7	9	8
43 Wochen	-	-	2	2
Insgesamt	24	22	25	45
Mortalität	0 (0%)	2 (9%)	3 (12%)	1 (2%)

2.1.2.1 Cerulein-Modell

Beim Cerulein-Modell wurde den Mäusen das Medikament Cerulein (Takus 40 µg®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) verabreicht. Cerulein ist ein synthetisches Cholezystokinin-Analogon. Es stimuliert die Gallenblasenkontraktion und bewirkt eine sekretorische Stimulation der Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse (ERSPAMER 1970; YU, LIM et al. 2009). Durch Überstimulation kommt es zu einer akuten Pankreatitis.

Die Induktion der Pankreatitis erfolgte durch i.p. Injektionen. Die Tiere wurden hierzu mit dem Nackengriff fixiert, wobei die Schwanzbasis ebenfalls fixiert wurde. Die Injektion erfolgte in 6 Dosen Cerulein (Takus 40 µg/2ml/kg; Dosierung s. Kapitel 8.1.6) in stündlichem Abstand an 3 Tagen pro Woche über 3, 6 oder 10 Wochen. In den ersten Schüben der Erkrankung wurde eine bedarfsadaptierte Analgesie mittels Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München, Deutschland; Dosierung s. Kapitel 8.1.6) durchgeführt. Bei diesem Modell kommt es zunächst zu einer akuten Pankreatitis und über die repetitiven Schübe zum Krankheitsbild der chronischen Pankreatitis (NEUSCHWANDER-TETRI, FERRELL et al. 1992; STROBEL, DOR et al. 2007).

Das Versuchsende lag 72 Stunden nach der letzten Injektionsserie der 3, 6 und 10 Wochen-Tiere, um Veränderungen im Sinne eines akuten Schubs durch die letzten Injektionen jeweils abklingen zu lassen. Die Tiere wurden in Narkose (Rompun®/Ketanest®) gelegt, es folgte die Laparotomie und danach die Euthanasie mittels Genickbruch. Dann erfolgte die Probenentnahme (s. Kapitel 2.1.3).

2.1.2.2 Gangligatur-Modell

Das Gangligatur-Modell wurde bei den Tieren unter Injektionsnarkose durchgeführt. Nachdem die Tiere gewogen wurden, erfolgte eine i.p. Injektion eines Gemisches von Ketanest S® (Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und Rompun® (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) um die Tiere in Narkose zu versetzen (Mischung und Konzentrationen s. Kapitel 8.1.6). Die Narkosetiefe wurde anhand des Erlöschens

typischer Reflexe (Zwischenzehenreflex, Lidreflex) verifiziert. Anschließend wurde das Abdomen der Mäuse mit einer Schermaschine (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) geschoren und mit Cutasept F (Bode, Hamburg, Deutschland) desinfiziert.

Unter aseptischen Bedingungen erfolgte eine obere mediane Laparatomie in der Linea alba über eine Länge von ca. 1,5 cm. Daraufhin wurde das Duodenum auf eine sterile mit isotonischer Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland) angefeuchtete Kompresse (Fink und Walter, Merchweiler) ausgelagert und zur atraumatischen Fixation eine Bulldog-Klemme auf den postpylorischen Anteil des Duodenum gesetzt. Das Aufsuchen des gemeinsamen Galle- und Pankreasausführungsgang und des in diesen Gang einmündenden Hauptgangs des Pankreasschwanzes erfolgte mit einem Stereo-Operationsmikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland). Die Seitengänge erster Ordnung für Pankreaskopf und -schwanz wurden jeweils selektiv durch doppelte Umstechung mit einem nicht-resorbierbaren monofilen Faden (Prolene, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) der Stärke 8-0 USP (United States Pharmacopeia) ligiert. Hiernach folgten die vorsichtige Zurückverlagerung des Duodenums und der Verschluss des Abdomens mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) der Stärke 4-0 (USP).

Zur postoperativen Analgesie erfolgte nach Beendigung des Eingriffs die einmalige subkutane Injektion von Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München, Deutschland) in einer Dosierung von 0,05 mg pro kg Körpergewicht.

Nach Induktion der Pankreatitis folgte eine Beobachtungsphase einer Dauer von je nach Versuchstiergruppe 3, 6 oder 10 Wochen. Während dieser Phase wurde in regelmäßigen Abständen eine klinische Allgemeinuntersuchung der Versuchstiere durchgeführt. Nach Beendigung der Beobachtungsphase wurden die Tiere wiederum in Narkose (Rompun®/Ketanest®) gelegt und es erfolgte die erneute Laparotomie. Nach Euthanasie der Tiere mittels Genickbruch erfolgte dann die Probenentnahme.

2.1.3 Probenentnahme

Zunächst erfolgte die Probenentnahme zweier je ca. 0,1 x 0,1 x 0,1 cm großen Gewebestücke aus dem Pankreasschwanz. Eines dieser Gewebestücke wurde sofort nach der Entnahme zur späteren Analyse der Genexpression mittels RT-PCR in ein mit 600 µl RNA-Later (Quiagen, Hilden, Deutschland) gefülltes Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gegeben. Dieses wurde in einem Kühlschrank bei 2-8 °C für ca. 7 Tage gelagert und dann bis zur weiteren Bearbeitung in einen -20 °C Gefrierschrank verbracht. Das andere Gewebestück wurde in Flüssigstickstoff bei -196 °C zur späteren Proteinanalyse schockgefroren. Diese Probe wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Anschließend wurde das restliche Pankreas mit Duodenum und Milz in einem zusammenhängenden Stück entfernt (Abbildung 2-1). Dieses Präparat wurde in eine Gewebeeinbettkassette verbracht, 24 Stunden in Roti-Histofix 4%® (Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und danach in 70%igen Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verbracht.

Die Abbildung 2-1 zeigt das zur histologischen Untersuchung entnommene Präparat, das auf ein Schwämmchen gelegt und zur Paraffineinbettung in eine Gewebeeinbettkassette (Neolab, Heidelberg, Deutschland) verbracht wurde.

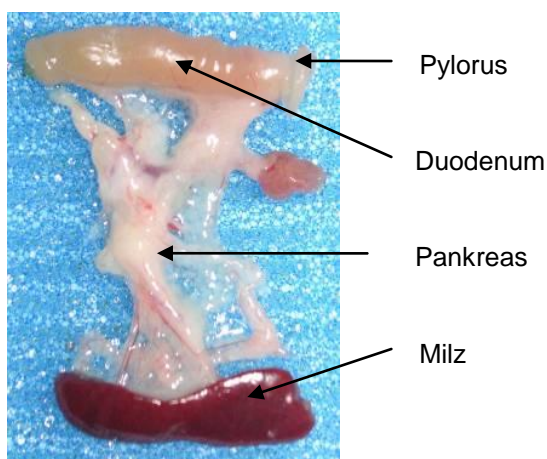


Abbildung 2-1: Entnommenes Präparat zur Histologie (Mausgewebe)

2.1.4 Histologische und (immun) histochemische Analysen

Die Entwässerung der Gewebe erfolgte vollautomatisch (Leica ASP 300, Leica, Bensheim, Deutschland). Anschließend wurden die paraffindurchtränkten Gewebe zur Anfertigung von Gewebeschnitten für histologische und (immun) histochemische Färbungen mit flüssigem Paraffin in Blöcke eingebettet (Leica EG 1140H, Leica, Bensheim, Deutschland). Die Blöcke wurden mit einem Mikrotom (JUNG RM 2055, Leica, Bensheim, Deutschland) in 4 µm dicke Scheiben geschnitten, in einem Wasserbad (Medax, Redsburg, Deutschland) bei 48 °C gestreckt und auf Objektträger gezogen. Daraufhin wurden die Proben über Nacht bei 37 °C in einem Trockenschrank getrocknet, um ein sicheres Anhaften der Schnitte auf dem Objektträger zu gewährleisten. Aus den eingebetteten Geweben wurden jeweils 30 serielle Schnitte angefertigt. Anschließend wurden die in Tabelle 2 dargestellten Färbungen durchgeführt.

Tabelle 2: Übersicht der durchgeführten histologischen und (immun) histochemischen Analysen (Mausgewebe)

Histologische und histochemische Analysen	Immunhistochemische Analysen
Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)	RAGE
Perjodsäure-Schiff'sche Färbung (PAS)	Kollagen I
Alzianblau Färbung (AB)	α-SMA
Toluidinblau-Färbung (TB)	Ki-67n
	Insulin

Vor den unten aufgeführten histologischen und (immun) histochemischen Analysen wurden die Schnitte in Roticlear® (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Es folgten die histologischen Färbungen nach Standard-Protokollen (siehe unten).

Am Ende der Färbungen wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 s in 50%igem, je 3 min in 70%igem und 90%igem, 3 x 3 min in 100%igem Ethanol) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) dehydriert und mit Roticlear® (3 x je 5 min) fixiert. Anschließend folgte das Eindecken der Schnitte, wobei zum Schutz der Präparate ein Deckgläschen (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) mit Permount®-Flüssigkeit (Fisher, Kehl, Deutschland) aufgetragen wurde.

Hinterher wurden Bilder angefertigt mittels einer digitalen Kamera, die an ein Mikroskop angeschlossen war und mit dem Computer anhand des Axio Vision 4.8 Systems (Zeiss, Jena, Deutschland) bearbeitet werden konnten. Die Vergrößerung der Bilder wird bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

2.1.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)

Prinzip:

Bei der H&E-Färbung handelt es sich um eine Routinefärbung zur histomorphologischen Beurteilung der Präparate. Im Rahmen dieser Dissertation wurde sie verwendet für die Darstellung und Klassifizierung der chronischen Pankreatitis hinsichtlich Fibrose, Entzündungsgrad und Ödem.

Durchführung:

Die Objektträger wurden mit Mayers Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland) 75 Sekunden gefärbt. Anschließend wurden sie unter fließendem Wasser 10 min lang gebläut und dann ca. 25 Sekunden mit Eosin G (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt.

Auswertung:

Alle histologischen Auswertungen wurden am Lichtmikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland) durchgeführt (Vergrößerung 50-fach). Ziel der mikroskopischen Untersuchungen war die Evaluation der histologischen Veränderungen des Pankreasgewebes. Die Auswertung der H&E-Färbung wurde verblindet durchgeführt, d.h. die Gruppenzugehörigkeit der Mäuse war dem Untersucher nicht bekannt. Die semiquantitative histologische Auswertung des Cerulein-Modells erfolgte verblindet durch den Pathologen Dr. Frank Bergmann, Institut für Pathologie, Universität Heidelberg, und wurde nach dem Bewertungsschema von Tabelle 3 quantifiziert (CEYHAN, BERGMANN et al. 2007). Zur Objektivierung des Gewebeschadens wurde eine Skala basierend auf Tabelle 3 verwendet. Weiterhin wurden Ödem, interlobuläre bzw. perilobuläre und intralobuläre Fibrose, tubuläre Komplexe, Entzündung (betrifft die Entzündung insgesamt, auch chronische Entzündungsinfiltrate, wie z.B. Lymphozyten, Plasmazellen) und die

Entzündungsaktivität (bezieht sich ausschließlich auf die neutrophilen Granulozyten) ausgewertet.

Eine Skala von 0-6 wurde zur Bestimmung des Ausmaßes des Ödems und der perilobulären und intralobulären Fibrose verwendet. Dabei stand 0 für nicht ödematös bzw. fibrotisch verändertes Gewebe. Die weitere Einteilung erfolgte nach dem Verteilungsmuster, d.h. fokal (1-3) und diffus (4-6), wobei fokal unterteilt war in mild (1), mittel (2) und schwer (3), sowie diffus in mild (4), mittel (5) und schwer (6) eingeteilt wurde.

Eine Skala von 0-3 wurde zur Bestimmung des Ausmaßes der tubulären Komplexe, Entzündung und Entzündungsaktivität angewendet. Wobei der Wert 0 „nicht vorhanden“ bedeutete. Die weitere Einteilung wurde folgendermaßen durchgeführt: 1 mild, 2 mittel und 3 schwer.

Tabelle 3: Bewertungsschema Fibrose

		Gradeinteilung der Fibrose			
		Mild	Mittel	Schwer	Skala
perilobular	Fokal	1	2	3	1-3
	Diffus	4	5	6	4-6
intralobular	Fokal	1	2	3	1-3
	Diffus	4	5	6	4-6

Tabellendarstellung in Anlehnung an (CEYHAN, BERGMANN et al. 2007).

2.1.4.2 Perjodsäure-Schiff'sche Färbung (PAS)

Prinzip:

Neben der Unterscheidung der Muskelfasertypen anhand ihres Glykogengehaltes, färben sich in der PAS-Färbung auch Mukopolysaccharide, unter anderem die in der vorliegenden Arbeit interessanten Muzine des Magen-Darm-Trakts. Je nach Gehalt dieser Substanzen wird eine unterschiedlich stark ausgeprägte rosa bis violette Färbung hervorgerufen. Mit der PAS-Färbung werden alle muzinöse Läsionen (MDL) identifiziert, die sich im Rahmen der CP bilden.

Durchführung:

Die Schnitte wurden 5 min in Perjodsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingetaucht. Anschließend wurden die Schnitte 2 x 2 min in Ethanol (70%) verbracht und 5 min in Reducing Rinse Solution (s. Kapitel 8.1.4) gewaschen, dann wieder 2 x 2 min in Ethanol (70%) behandelt und daraufhin mit voll entmineralisiertem Wasser (VE-Wasser) gespült. Im Schiff'schen Reagenz (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verblieben die Objektträger für 35 min und wurden danach 10 min unter fließendem Wasser gespült. Hiernach erfolgte die einminütige Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Es schloss sich eine erneute Spülung unter fließendem Leitungswasser an.

Auswertung:

Die PAS- und AB-Färbungen (s. Kapitel 2.1.4.3) wurden bei einer 100-fachen Vergrößerung am Lichtmikroskop quantifiziert. Bei beiden Färbungen wurden zwei Schnitte pro Tier verwendet und die in den Muzinfärbungen identifizierten MDL ausgezählt. Die Schnitte wurden mäanderförmig durchgemustert und die positiv gefärbten Läsionen gezählt. Diese wurden unterteilt in Gruppe 1 bzw. große Gänge (interlobuläre Gänge) und Gruppe 2 bzw. kleine Gänge (intra-lobuläre Gänge). Positiv gefärbte Hauptgänge wurden nicht mitgezählt.

2.1.4.3 Alzianblau Färbung (AB)

Prinzip:

Die Alzianblau Färbung (pH 2,5) stellt saure Mukopolysaccharide / Muzine leuchtend türkis, Zellkerne rot bis bläulich rot und den Hintergrund zartrosa dar. Bei der AB-Färbung werden nur Läsionen angefärbt, die ein Muzinspektrum haben, das für das Pankreas atypisch ist. Diese Läsionen gelten als präneoplastisch. Als Positivkontrollen dienen die Becherzellen des Duodenum.

Durchführung:

Die Schnitte wurden 2 x 5 min in TBS verbracht und anschließend 3 min in 3%ige Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht. Daraufhin wurden die Schnitte 47 min in der hergestellten Alzianblau-Lösung (s. Kapitel 8.1.4) belassen. Dann wurden die Objektträger mit VE-Wasser abgespült und in 0,3%iges Natriumhydrogenkarbonat (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verbracht. Es folgte eine 10 minütige Spülung unter fließendem Leitungswasser und die Gegenfärbung (7 min) mit Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Danach wurden die Schnitte mehrmals in VE-Wasser gewaschen.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte analog der Auswertung der PAS-gefärbten Präparate (s. Kapitel 2.1.4.2.).

2.1.4.4 Toluidinblau-Färbung (TB)

Prinzip:

Mit der Toluidinblau-Färbung werden Mastzellen violett und der Hintergrund blau gefärbt.

Durchführung:

Die Objektträger wurden 2 min in Aqua destillata (Braun, Melsungen, Deutschland) verbracht. Anschließend verblieben die Schnitte für 3 min in der Toluidinblau-Lösung (Merck Bioscience, Schwalbach, Deutschland) und wurden hiernach 3 x in VE-Wasser gewaschen.

Auswertung:

In 100-facher Vergrößerung wurden die Schnitte mäanderförmig durchgemustert. Die Anzahl der gefärbten Mastzellen wurde ausgezählt und nach ihrer Lokalisation in peripankreatischem Gewebe oder im Pankreas neben interlobulären Gängen (G1) und intralobulären Gängen (G2) eingeteilt.

2.1.4.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

Die gewebständige Peroxidase-Aktivität wurde mit Wasserstoffperoxid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) (25 ml Wasserstoffperoxid 30% und 225 ml Methanol) inaktiviert. Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung in der Mikrowelle (Quelle, Fürth, Deutschland) mit einer Pufferlösung. Die Blockierung unspezifischer Bindungen des verwendeten Antikörpers erfolgte durch Inkubation mit Serum sowie mit Avidin und Biotin bei 37°C. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte die erneute Blockierung mit Serum. Anschließend erfolgten die Inkubation mit den Sekundärantikörpern und das Inkubieren des Gewebes im angesetzten ABC-Reagenz (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Danach wurde zur braunen Färbung DAB-Lösung (Vector Laboratories, Burlingame, USA) aufgeträufelt. Zum Abstoppen der Farbereaktion wurden die Objektträger in VE-Wasser verbracht. Mit diesem Protokoll werden die Zielproteine (Antigene) braun angefärbt, die Gegenfärbung erfolgt mit Hämatoxylin (s. Tabelle 4).

Auswertung der Kollagenimmunhistochemie:

In 200-facher Vergrößerung wurden die Schnitte der 10 Wochen-Tiere (Cerulein-Modell) mäanderförmig durchgemustert. Dabei wurden vier Bildausschnitte mit intralobulären Gängen ausgewählt, sowie zwei Bildausschnitte mit interlobulären Gängen. Die Durchmesser der Gänge und die Wandstärke wurden gemessen. Weiterhin wurden vier Bildausschnitte mit Pankreasgewebe ausgewählt und der Abstand zwischen drei aneinandergrenzenden Azini gemessen.

Tabelle 4: Details zu den immunhistochemischen Protokollen (Mausgewebe)

Antigen		RAGE	Kollagen I	α -SMA	Ki-67	Insulin
Abweichung vom Standardprotokoll			keine Blockierung der potentiellen Antigene mit Normal Serum	Peroxidase nach Antigen-demaskierung, keine Blockierung der potentiellen Antigene mit Normal Serum		Inkubation 1 h mit MOM Kit Maus Ig vor Primär-AK
Antigen Demaskierung (Puffer)		Citrat pH-Wert 6	Citrat pH-Wert 6	Citrat pH-Wert 6	Citrat pH-Wert 6	Citrat pH-Wert 6
Normal Serum		Ziege	-	-	Kaninchen	Ziege
DAB-Dauer		2 min	1 min	40 s	2 min	1 min
Primär-antikörper	Bezeichnung	AGER	Collagen I polyklonal	α -SMA, polyklonal	Ki-67	Insulin
	Ursprung	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen	Ratte	Maus
	Verdünnung	1:100 in Normal Ziege Serum	1:200 in Dako AB Diluent	1:250 in Normal Ziege Serum	1:25 in Dako AB Diluent	1:50 in MOM Kit
Sekundärantikörper	Bezeichnung	Anti-Kaninchen IgG	Anti-Kaninchen IgG	Anti-Kaninchen IgG, HRP	Anti-Ratte IgG	Anti-Maus IgG
	Ursprung	Ziege	Ziege	Ziege	Kaninchen	Ziege
	Verdünnung	1:1000 in TBS	-	-	1:200 in TBS	1:200 in TBS

Bezüglich verwendeter Materialien und Hersteller s. Kapitel 8.1

2.1.5 RNA Expressionsanalysen

Alle RNA-Analysen wurden an den Gewebeproben des Cerulein-Modells durchgeführt.

2.1.5.1 mRNA Isolierung aus dem Gewebe

Aus den Gewebeproben wurde Messenger-RNA (mRNA) mittels des MagNA Pure Isolierungskits (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) gewonnen:

Die Proben wurden mit 400 µl MagNA Pure Lysepuffer für Gewebe, welcher auf 37°C erwärmt wurde, vermengt und im Fast Prep FP 120 Ribolyzer (Thermo Electron Corp., Dreieich, Deutschland) zerkleinert. Hierbei wurden die Zellen lysiert und die Proteasen inaktiviert. Danach wurden die Proben für 1 min bei 16 000 U/min und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Fa. Eppendorf, Deutschland).

Folgende Prozesse wurden dann mittels des Light Cycler Apparats (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) durchgeführt:

Die Proben wurden in 600 µl Capture-Puffer gegeben, in welchem 3'poly(A)-mRNA mit biotinylierten Oligo(dT)-Nukleotiden hybridisiert wurde. Diese Hybride wurden hierbei mittels Streptavidin an magnetisierte Glaspartikelchen gebunden. Mehrere Waschschrirte und die Zugabe einer DNase dienten zur Eliminierung kontaminierender genomischer DNA. Zum Schluss wurde zur Trennung der Glaspartikel die RNA in 50 µl Lösungspuffer auf 70 °C erhitzt.

2.1.5.2 cDNA –Synthese (Reverse Transkription)

Für die Reverse Transkription der mRNA wurden die Oligonukleotide als Startermoleküle an den poly-(A)-Schwanz am 3'-Ende der RNA Matrize hybridisiert.

Im nächsten Schritt wurde mit der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, ein komplementärer cDNA-Strang hergestellt.

2.1.5.3 Echtzeit quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Die RT-PCR ist eine enzymatische Methode um DNA Fragmente zu amplifizieren. Der Reaktionsansatz bestand aus einer doppelsträngigen cDNA-Matrize, dem sogenannten Template, zwei einzelsträngigen Oligodesoxyribonucleotid-Primern, welche mit dem 5'-beziehungsweise dem 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisierten, sowie Desoxiribonucleosid-Triphosphate (dNTPs). Weiterhin wurde eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase benutzt, welche aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnen wurde (Taq-DNA-Polymerase). Der Vervielfältigungsprozess unterlag drei aufeinander folgenden Reaktionen, für welche verschiedene Temperaturen notwendig waren. Die Temperaturschritte mussten für jede einzelne Analyse optimiert werden. Die Durchführung erfolgte in einem Thermocycler-Gerät (Biotron, Göttingen, Deutschland). Nach der initialen dreiminütigen Denaturierung bei 95 °C, erfolgte die zyklische Vervielfältigung der gewünschten Sequenz. In jedem Zyklus wurde der Doppelstrang in Einzelstränge denaturiert. Daraufhin erfolgte eine Abkühlung des Ansatzes auf ca. 45-60 °C, um eine Anlagerung der Primer, das sogenannte „Annealing“, zu ermöglichen. Von diesen Primern ausgehend wurden daraufhin bei 72 °C mittels Taq-Polymerase die Stränge in 5' – 3'Richtung synthetisiert. Es wurden 30 Zyklen durchgeführt.

Die PCR wurde in Kooperation mit dem Labor für Molekulare Immundiagnostik Heidelberg (Dr. med. T. Giese) durchgeführt. Die Primer wurden von der Search-LC GmbH (Heidelberg, Deutschland) erworben; die verwendeten Sequenzen sind auf Rückfrage erhältlich. Es wurden folgende Zielgene in der Maus untersucht: RAGE, HMGB1, NF-kB-p65, TNF α und TGF β . Diese Zielgene wurden untersucht, um ihren Zusammenhang in der Pankreatitis, die Rolle im Zusammenspiel untereinander und die Entstehung der Fibrose zu identifizieren.

2.2 Untersuchungen an humanem Gewebe

2.2.1 Herkunft und Aufarbeitung der Proben

Es wurde Patientenmaterial mit der pathologisch gesicherten Diagnose eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas und einer chronischen Pankreatitis verwendet. Zur Kontrolle diente Pankreasgewebe gesunder Organspender von Pankreata, die explantiert, letztendlich jedoch nicht für eine Transplantation verwendet wurden. Alle Proben stammten aus einer prospektiv geführten Gewebesammlung der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg. Die Gewebesammlung erfolgte gemäß gültigem Ethikvotum.

2.2.2 RNA Expressionsanalysen

Die Durchführung der RNA Expressionsanalysen erfolgte analog der RNA-Analysen des Mausgewebes (s. Kapitel 2.1.5) unter Verwendung entsprechender humaner Sequenzen. Die Primer wurden ebenfalls von der Search-LC GmbH (Heidelberg, Deutschland) erworben; die verwendeten Sequenzen sind auf Rückfrage erhältlich.

2.3 Statistische Auswertung

Sämtliche Ergebnisse sind als Mittelwert +/- SEM angegeben.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Prism Version 4.00 (Graph Pad Software). Unterschiede zwischen den Daten mit Normalverteilung wurden mit dem unpaired T-Test durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Parametern fand der Mann-Whitney-U-Test Anwendung. Der Vergleich von mehr als zwei Versuchsgruppen erfolgte bei Normalverteilung mit dem One-Way-ANOVA-Test bzw. bei fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test. Zur post-hoc Analyse wurde der Newman-Keuls-Test angewendet. Die verwendeten Tests sind unter den jeweiligen Graphen angegeben. Als statistisch signifikant wurde dabei ein p-Wert <0,05 angesehen.

3 Ergebnisse

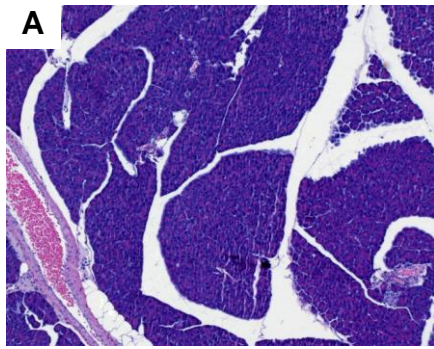
3.1 *In vivo* Studie an der Maus

3.1.1 Modelle der chronischen Pankreatitis

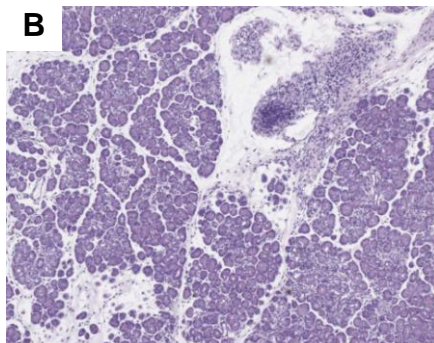
Die histologischen Veränderungen des Pankreas waren im Cerulein- und Gangligatur-Modell unterschiedlich ausgeprägt (s. Abbildung 3-1). So traten beim Cerulein-Modell ein fibrotischer Umbau des Gewebes und die Entwicklung muzinöser Läsionen regelmäßig auf. Das Gangligatur-Modell führte zu einer hochgradig lipomatösen Atrophie des Pankreasgewebes. Das exokrine Pankreasgewebe wurde durch Fettgewebe ersetzt. Dies bedeutete für die aktuelle Studie, dass keine duktale Metaplasie mehr sichtbar war, da das Drüsengewebe schwand. Daher wurden in diesem Modell keine weiterführenden Untersuchungen zu Fibrose und Metaplasie durchgeführt.

Die Langerhans'schen Inseln des endokrinen Pankreas blieben in beiden Modellen histomorphologisch unbeeinflusst.

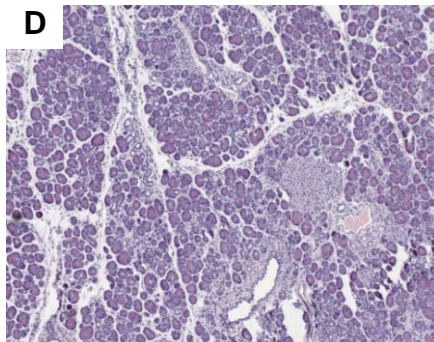
Kontrolle



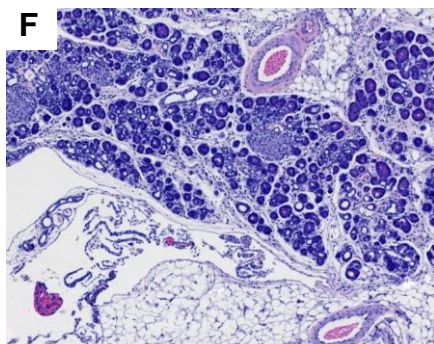
3 Wochen Injektion



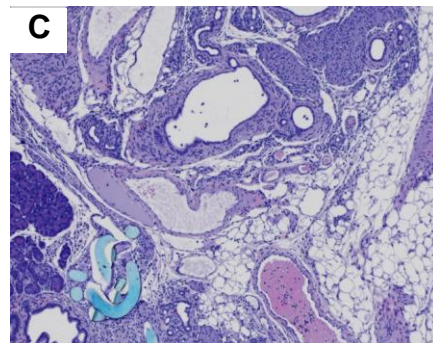
6 Wochen Injektion



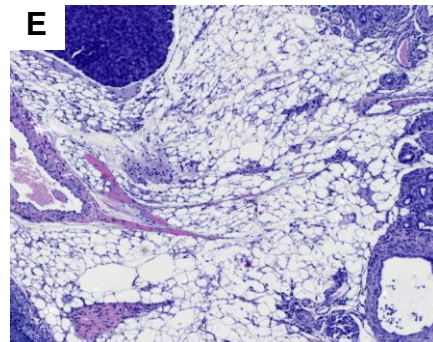
10 Wochen Injektion



3 Wochen Ligatur



6 Wochen Ligatur



10 Wochen Ligatur

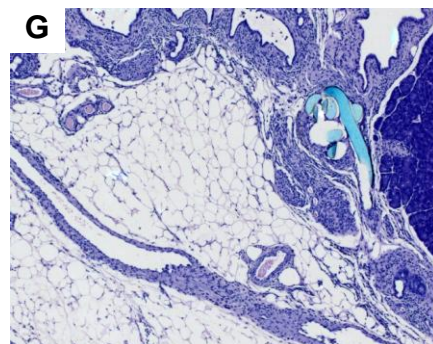


Abbildung 3-1: Histologische Veränderungen des Pankreas in der CP

Darstellung der histologischen Veränderungen im Cerulein- (B, D, F) und Gangligatur-Modell (C, E, G) in zeitlicher Versuchsabfolge von 3, 6 und 10 Wochen (RAGE^{+/+}-Tiere). Verglichen mit dem Pankreasgewebe des Kontrolltiers (A), wird bei dem Cerulein-Modell die Fibrose (B, D, F) und beim Gangligatur-Modell (C, E, G) die lipomatöse Atrophie des Pankreas sichtbar. (HE; 50-fache Vergrößerung).

3.1.2 Expression von RAGE und seines Liganden HMGB1 in der CP

Um Veränderungen der RAGE-Expression in der CP zu untersuchen, wurde eine mRNA Analyse mittels RT-qPCR durchgeführt (Abbildung 3-2). Verglichen mit gesundem Pankreasgewebe (Kontrollgruppe, Kontr.) ergab die Echtzeit Polymerasekettenreaktion eine Hochregulierung von RAGE in der chronischen Pankreatitis. Ebenso wurde der Nachweis von RAGE-Expression in allen untersuchten RAGE^{+/+} Geweben belegt. Die Werte stiegen signifikant bis zur 6 Wochen-RAGE^{+/+} Versuchstiergruppe (6wCP) an. Bei den 10 Wochen (10wCP) RAGE^{+/+} Tieren war kein weiterer Anstieg mehr erkennbar. Die nicht nachweisbare Expression von RAGE bei den RAGE^{-/-} Tieren zeigt die Wirksamkeit des Knockouts.

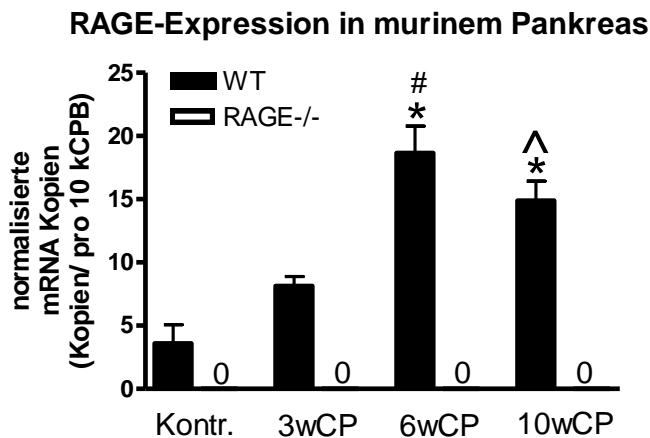


Abbildung 3-2: Expression von RAGE im gesunden Pankreas und in der CP

In der CP kommt es im Pankreas zur Steigerung der Expression von RAGE (*p < 0,001 vs. Kontr., #p < 0,001 vs. 3wCP, ^p < 0,001 vs. 3wCP). Bei RAGE^{-/-} Tieren ist als Beweis eines suffizienten Knockouts jeweils keine RAGE-Expression messbar.

Kontr.: gesunde Kontrollen. One-Way-ANOVA Test + Student-Newman-Keuls Test.

Welchen Einfluss RAGE auf das Pankreasgewebe sowie die einzelnen Zellen hat, wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die erhöhte RAGE-Expression in der CP durch Expression in verschiedenen Zelltypen bedingt war: In Entzündungs- und Sternzellen und in MML (s. Abbildung 3-3).

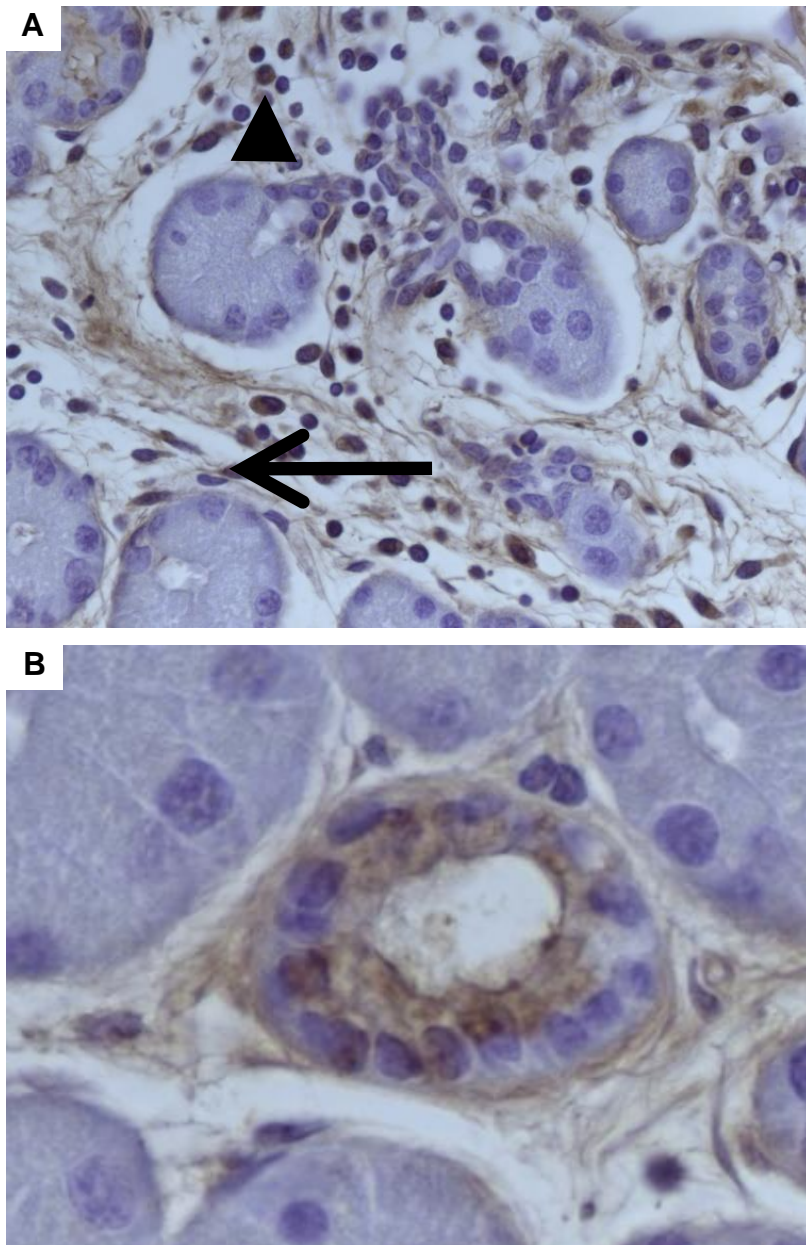


Abbildung 3-3: Expression von RAGE in der CP (Immunhistochemie) RAGE^{+/+}

Bild **A** zeigt Azini der Bauchspeicheldrüse umgeben von RAGE-exprimierenden Entzündungs- (▲) und Sternzellen (←), Bild **B** zeigt eine RAGE-exprimierende muzinöse metaplastische Läsion. (RAGE: braune Färbung).

Vergrößerung **A** (400-fach), **B** (1000-fach)

Um den Einfluss von RAGE auf den Entzündungsverlauf zu untersuchen, erfolgte als nächster Schritt die vergleichende Analyse der Expression des RAGE-Liganden und Entzündungsmediators HMGB1. HMGB1 war sowohl bei RAGE^{+/+} als auch bei RAGE^{-/-} Tieren mit Pankreatitis im Vergleich zu den Kontrollgruppen hochreguliert (s. Abbildung 3-4). Bei den RAGE^{+/+} Tieren war bis zur 3. Woche nur eine geringe Änderung, dann ein nahezu linearer Anstieg erkennbar. Bei den RAGE^{-/-} Tieren

stellte sich bereits nach 3 Wochen ein sehr hoher Wert ein, der danach auf annähernd konstantem Niveau blieb.

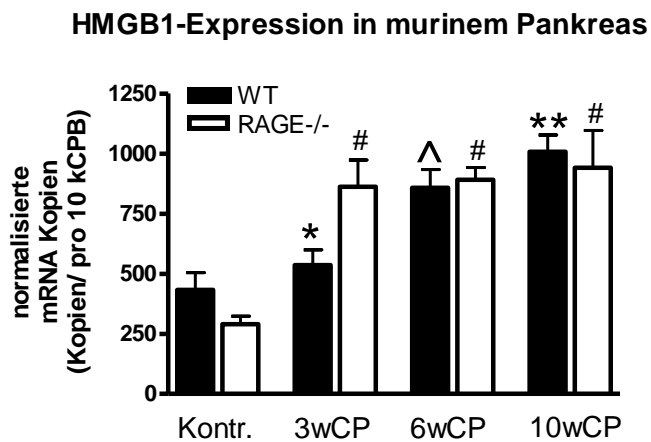


Abbildung 3-4: Expression von HMGB1 im gesunden Pankreas und in der CP

In der CP kommt es im Pankreas bei allen Tieren zur Steigerung der Expression von HMGB1 (**p < 0,001 vs. Kontr. und 3wCP, #p < 0,001 vs. Kontr., ^p < 0,01 vs. Kontr. und 3wCP, *p < 0,050 vs. RAGE^{+/+}). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren.

Kontr.: gesunde Kontrollen. One-Way-ANOVA Test + Student-Newman-Keuls Test; unpaired T-test.

3.1.3 Expression zentraler Entzündungsmediatoren und Fibrose-vermittelnder Mediatoren

Um die Entzündungsaktivität in Abhängigkeit von RAGE zu untersuchen, wurden außerdem NF- κ B mRNA Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine im Vergleich zu RAGE^{+/+} Tieren erhöhte NF- κ B-Expression in RAGE^{-/-} Tieren sowohl in den gesunden Kontrollen als auch in allen Pankreatitis-Gruppen (s. Abbildung 3-5).

NFκB-p65-Expression in murinem Pankreas

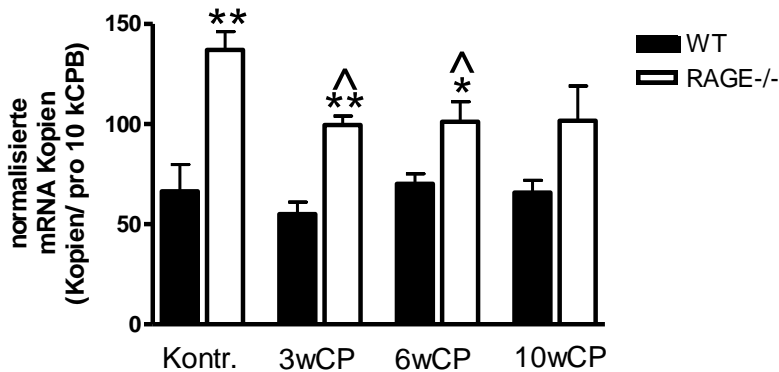


Abbildung 3-5: Expression von NF-κB -p65 im gesunden Pankreas und in der CP

In der CP zeigt sich keine Steigerung der Expression von NF-κB-p65. Die RAGE^{+/+} Tiere zeigen konstante Werte, im Vergleich dazu ist die NF-κB-p65-Expression bei den RAGE^{-/-} Tieren höher. Im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kontr.) zeigen die RAGE^{-/-} Tieren aller Versuchsgruppen niedrigere Werte (**p <0,001 vs. RAGE^{+/+}, *p <0,050 vs. RAGE^{+/+}, ^p<0,050 vs. Kontr.). Unpaired T-test.

Zur weiteren Differenzierung des Entzündungsgeschehens wurden mRNA Analysen der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und TGF-β durchgeführt. Die Kontrolltiere zeigten keine messbare TNF-α-Expression im Pankreas (A), wogegen die Werte in der Pankreatitis hochreguliert waren. Die Werte beider Versuchstiergruppen stiegen bis zur 6 Wochen-Versuchstiergruppe an und sanken deutlich bis zur 10 Wochen-Versuchstiergruppe, es bestand kein deutlicher Unterschied zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren (Abbildung 3-6).

Bei der mRNA Analyse der TGF-β-Expression zeigten die Kontrolltiere eine niedrige TGF-β-Expression (B), die Werte der Pankreatitis-Tiere lagen deutlich höher. Die Werte der RAGE^{+/+} Tiere stiegen bis zur 6 Wochen-Versuchstiergruppe an und sanken deutlich bis zur 10 Wochen-Versuchstiergruppe (Abbildung 3-7). Die Werte der RAGE^{-/-} Tiere stiegen bis zur 3 Wochen-Gruppe an, sanken in der 6 Wochen-Gruppe und blieben dann konstant.

TNF- α -Expression in murinem Pankreas

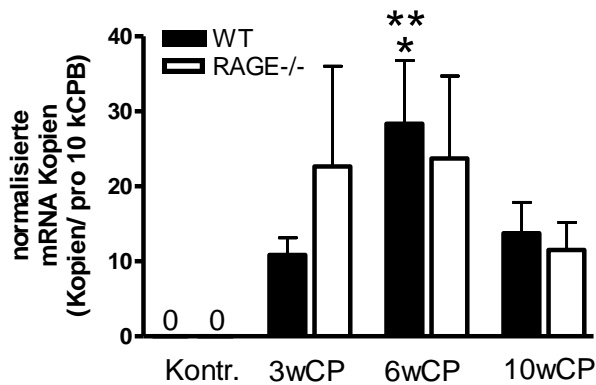


Abbildung 3-6: Expression von TNF- α im gesunden Pankreas und in der CP

In der CP wird eine Steigerung der TNF- α -Expression bis zur 6 Wochen-Versuchstiergruppe sichtbar, die in der 10 Wochen-Versuchstiergruppe wieder abfällt (**p <0,01 vs. Kontr., *p <0,050 vs. 3wCP und 10wCP Kontr.). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren. Die gesunden Kontrollen (Kontr.) zeigen keine Expression von TNF- α .

One-Way-ANOVA Test + Student-Newman-Keuls Test.

TGF- β -Expression in murinem Pankreas

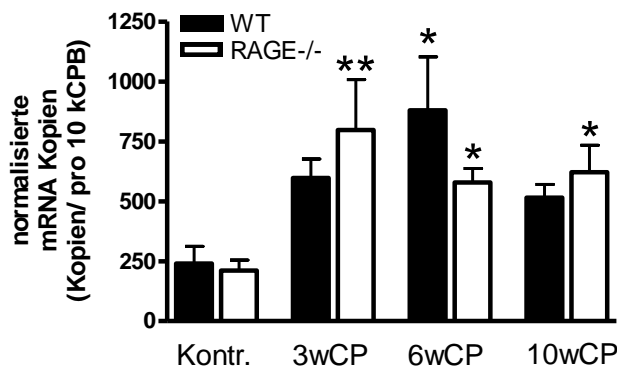


Abbildung 3-7: Expression von TGF- β im gesunden Pankreas und in der CP

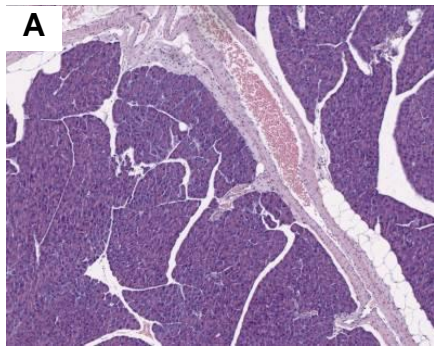
In der CP wird eine Steigerung der TGF- β -Expression bis zur 6 Wochen-Versuchstiergruppe sichtbar. Diese fällt zur 10 Wochen-Versuchstiergruppe bei den RAGE^{+/+} Tieren wieder ab. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren. Die gesunden Kontrollen (Kontr.) zeigen eine geringe Expression von TGF- β (**p <0,01 vs. Kontr., *p <0,05 vs. Kontr.). One-Way-ANOVA Test + Student-Newman-Keuls Test.

3.1.4 Bedeutung einer RAGE-Defizienz in der CP

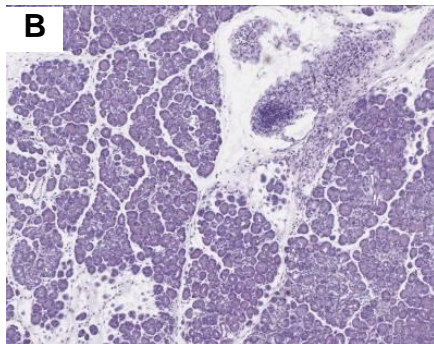
Cerulein-Modell

Die histologische Auswertung des Cerulein-Modells wurde anhand des Bewertungsschemas von Dr. med. Frank Bergmann quantifiziert (CEYHAN, BERGMANN et al. 2007) s. Kapitel 2.1.4.1. Ausgewertet wurden: Ödembildung, interlobuläre bzw. perilobuläre und intralobuläre Fibrose, tubuläre Komplexe, Entzündungen (chronische Entzündungsinfiltrate, z.B. Lymphozyten, Plasmazellen), sowie Entzündungsaktivität (Granulozyten). Die histologische Untersuchung dieser Parameter zeigte bei allen Tieren den Nachweis einer CP. Die pathologischen Veränderungen des Pankreasgewebes waren im Cerulein-Modell bei den RAGE^{+/+} Tieren schwerwiegender. Abbildung 3-8 zeigen repräsentative Beispiele der histologischen Veränderungen des Pankreasgewebes im Cerulein-Modell. Die RAGE^{+/+} (B, D, F) und RAGE^{-/-} (C, E, G) Tiere wurden über die Versuchsdauer von 3, 6 und 10 Wochen-Gruppen miteinander verglichen. Um die im Rahmen der CP auftretenden histologischen Veränderungen, wie z.B. Fibrose darzustellen, diente zum Vergleich normales Pankreasgewebe gesunder Kontrolltiere (A).

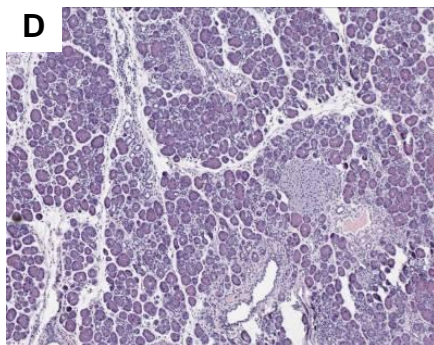
Kontrolltier



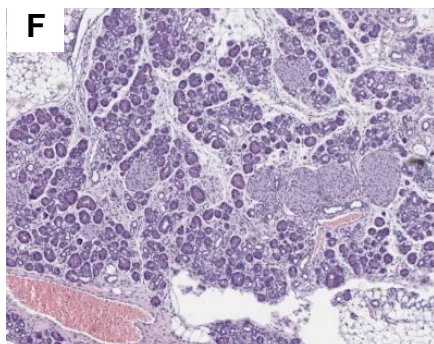
3 Wochen RAGE^{+/+}



6 Wochen RAGE^{+/+}

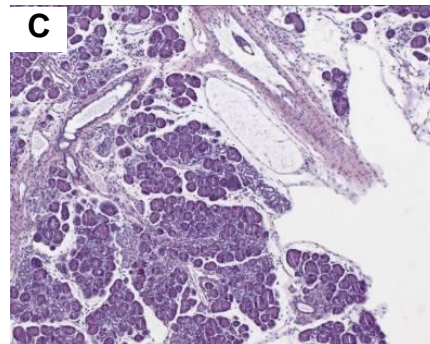


10 Wochen RAGE^{+/+}

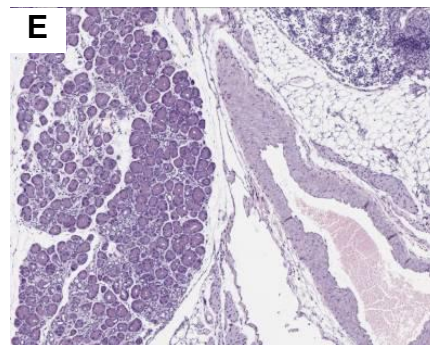


F

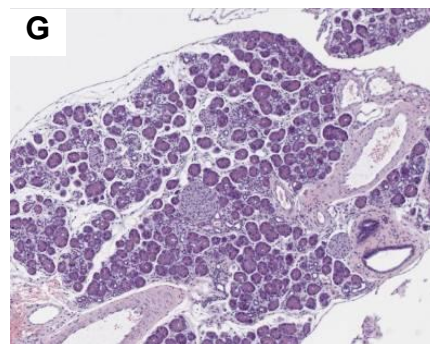
3 Wochen RAGE^{-/-}



6 Wochen RAGE^{-/-}



10 Wochen RAGE^{-/-}



G

Abbildung 3-8: Histologische Veränderungen des exokrinen Pankreasgewebes

Histologische Veränderungen im Cerulein-Modell im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe (A), in RAGE^{+/+} (B, C, D) und in RAGE^{-/-} (E, F, G) Tieren mit CP. Die pathologischen Veränderungen des Pankreasgewebes sind bei den RAGE^{+/+} Tieren tendenziell schwerwiegender. Die histologischen Veränderungen zeigen sich im zunehmenden Abstand zwischen den Azini, der Rarefizierung der Azini, der Fibrose und den metaplastisch duktafen Läsionen. (50-fache Vergrößerung)

Die Entzündung (A) sowie die Entzündungsaktivität (B) waren bei den RAGE^{+/+} Tieren deutlicher ausgeprägt (s. Abbildung 3-9). Die Entzündung nahm bei den RAGE^{+/+} Tieren bis zur 6 Wochen-Gruppe zu und veränderte sich danach nicht mehr. Bei den RAGE^{-/-} Tieren nahmen die Entzündungsanzeichen bis zur 10 Wochen-Gruppe zu. Die Entzündungsaktivität stieg bei den RAGE^{+/+} Tieren bis zur 6 Wochen-Gruppe an und fiel dann bis zur 10 Wochen-Gruppe wieder ab. Bei den RAGE^{-/-} Tieren hingegen war bei der 3 Wochen-Gruppe keine Entzündungsaktivität sichtbar. Tendenziell zeigte sich weniger entzündliche Infiltration und Aktivität im RAGE^{-/-} Tier.

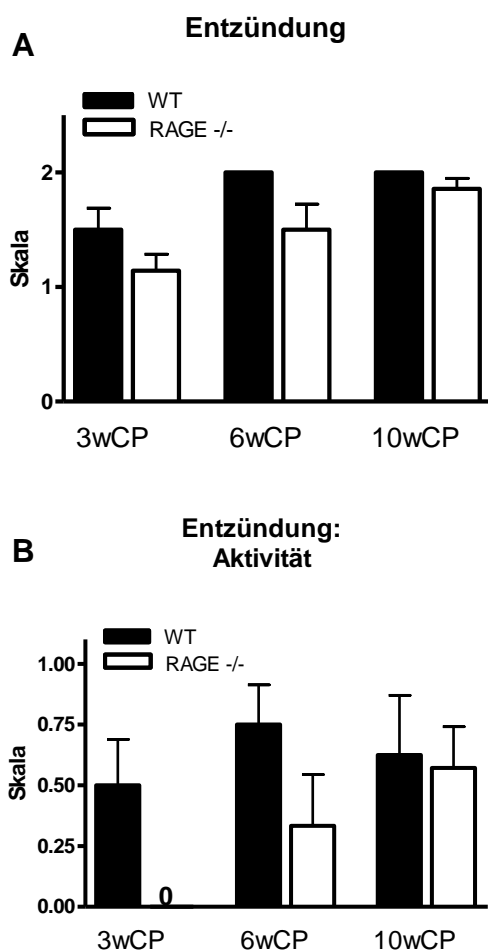


Abbildung 3-9: Entzündung (A) und Entzündungsaktivität (B)

Bild A zeigt die Entzündung (auch chronische Entzündungsinfiltrate, wie z.B. Lymphozyten, Plasmazellen) bei allen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstiergruppen. Bei den 10 Wochen-Versuchstieren ist das Entzündungsgeschehen besonders ausgeprägt. Bild B zeigt die Entzündungsaktivität (ausschließlich Infiltration neutrophiler Granulozyten) bei allen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstiergruppen. Bei den 3 Wochen RAGE^{-/-} Versuchstieren zeigt sich im Gegensatz zu den RAGE^{+/+} Tieren keine Entzündungsaktivität. Bei den 6- und 10 Wochen-Tieren ist die die Entzündungsaktivität bei RAGE^{-/-} Versuchstieren tendenziell geringer ausgeprägt, vergleichbar zu den RAGE^{+/+} Tieren. Aufgrund der Gruppengröße waren die Ergebnisse des Scoring-Systems nicht signifikant.

Um einen möglichen Einfluss von RAGE auf die Anzahl der Mastzellen zu untersuchen, wurden Toluidinblau Färbungen durchgeführt und ausgewertet. Generell zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren. Tendenziell zeigte sich allerdings eine Umverteilung der Mastzellen mit eher peripherer Infiltration bei RAGE^{-/-} Tieren. Im Verlauf der Versuchsdauer 3, 6 und 10 Wochen stieg die Anzahl der Mastzellen im peripankreatischen Gewebe signifikant an, wobei kein erkennbarer Unterschied zwischen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren sichtbar wurde (s. Abbildung 3-10). Die Werte der Mastzellinfiltration um die großen Gänge des Pankreasgewebes der Wildtypen, lagen in allen Versuchstiergruppen über den Werten der RAGE^{-/-} Tieren. Tendenziell zeigte die 6 Wochen-Gruppe die höchsten Werte auf. Die Anzahl der Mastzellen stieg im Verlauf der Versuchsdauer 3, 6 und 10 Wochen im Bereich der kleinen Gänge signifikant an, wobei die RAGE^{-/-} Tiere in der 10 Wochen-Gruppe höhere Werte zeigten als die RAGE^{+/+} Tiere. Beim Cerulein-Modell war bei den 6 und 10 Wochen-Versuchstiergruppen mit CP eine deutliche Akkumulation von Mastzellen sichtbar.

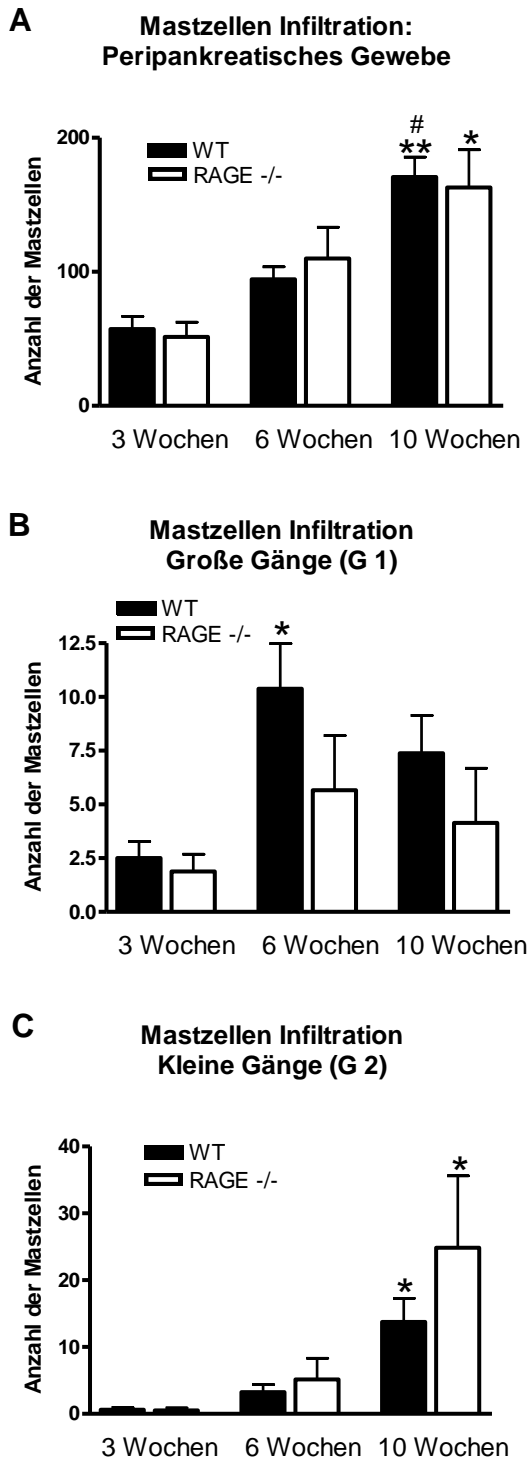


Abbildung 3-10: Ausmaß der Mastzellinfiltration im peripankreatischen Gewebe (A), in den großen Gängen (B) und den kleinen Gängen (C)

Die Anzahl der Mastzellen sind im peripankreatischen Gewebe (A) und in den kleinen Gängen (C) bei der 10 Wochen-RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstiergruppe am Höchsten. In den großen Gängen (B) ist die Anzahl der Mastzellen in der 6 Wochen-Gruppe am Höchsten (**p < 0,01 vs. 3wCP, *p < 0,05 vs. 3wCP, #p < 0,01 vs. 6wCP (A); *p < 0,05 vs. 3wCP (B); *p < 0,05 vs. 3wCP (C)). Kruskal-Wallis Test. Tendenziell zeigt sich bei den RAGE^{-/-} Tieren eine periphere Umverteilung der Mastzellen.

In der pathohistologischen Beurteilung zeigten sich sowohl in der intralobulären Fibrose (A) als auch in der interlobulären Fibrose (B) keine signifikanten Unterschiede zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren. Tendenziell zeigten die RAGE^{-/-} Tiere aber eine verminderte Fibrose (Abbildung 3-11). Die Fibrose war in der 10 Wochen-Versuchstiergruppe am stärksten ausgeprägt (Abbildung 3-11).

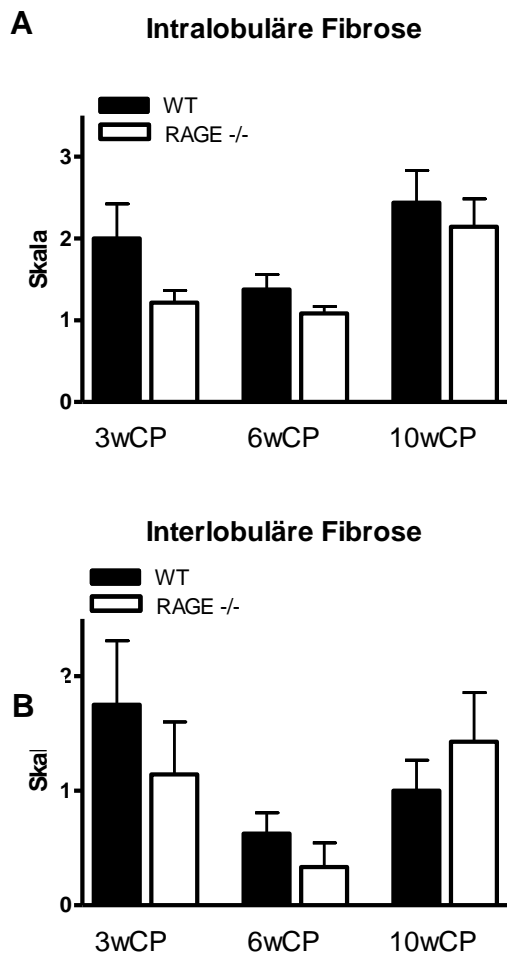


Abbildung 3-11: Ausprägung der intralobulären und interlobulären Fibrose

A: intralobuläre Fibrose (pathohistologische Beurteilung). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstiergruppen. Bei der 10 Wochen-Versuchstiergruppe ist die intralobuläre Fibrose besonders ausgeprägt. **B:** interlobuläre Fibrose (pathohistologische Beurteilung). Hier zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstiergruppen, bei den 6 Wochen-Versuchstieren ist die intralobuläre Fibrose besonders gering und steigt zur 10 Wochen-Gruppe wieder an. Tendenziell zeigen die RAGE^{-/-} Versuchstiergruppen eine geringere Ausprägung der Fibrose. Aufgrund der Gruppengröße sind die Daten nicht signifikant.

Anhand der pathohistologischen Beurteilung zeigten die RAGE^{-/-}-Versuchstiergruppen eine geringere Ausprägung der Fibrose, zur sensitiveren Analyse wurde eine Immunhistochemie mit dem Kollagen-Antikörper anhand der 10 Wochen-CP

Versuchstiere durchgeführt (Abbildung 3-12). Bei den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstieren wurden jeweils gleich große Pankreasgänge gemessen, was sich daran zeigte, dass die Lumenweiten vergleichbar waren. Die periduktale und parenchymatöse Fibrose war bei den RAGE^{+/+} Tieren deutlich stärker ausgeprägt als bei den RAGE^{-/-} Tieren.

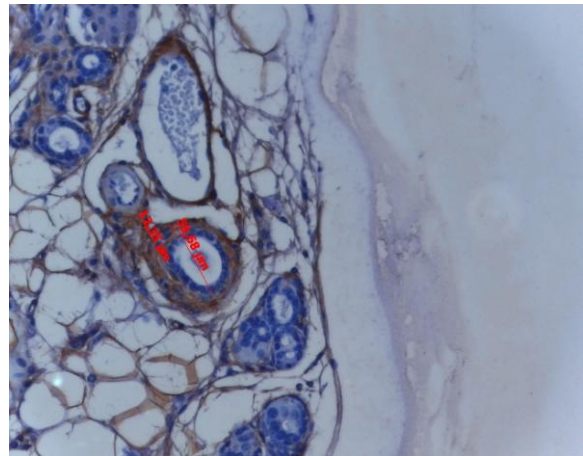
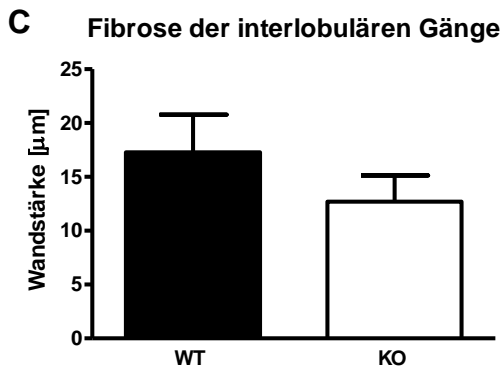
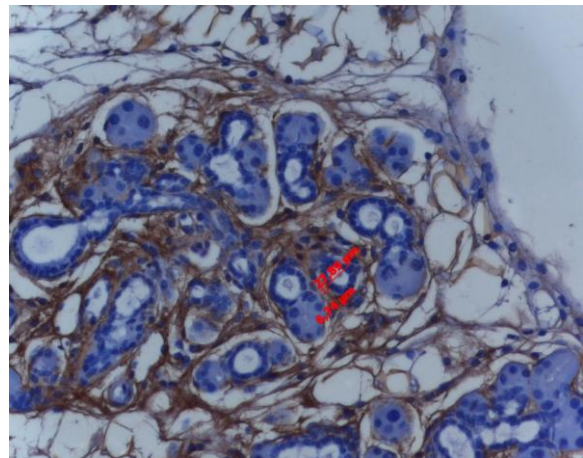
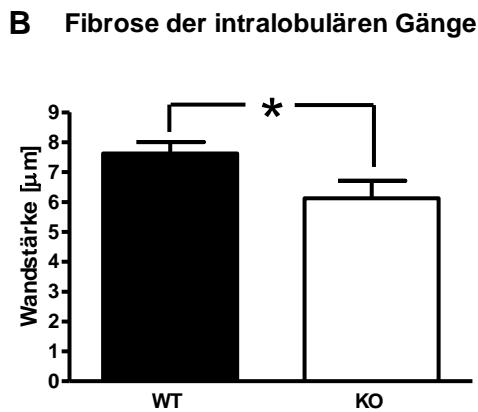
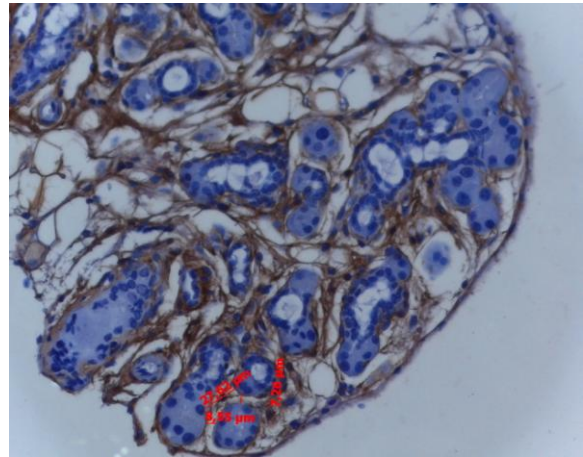
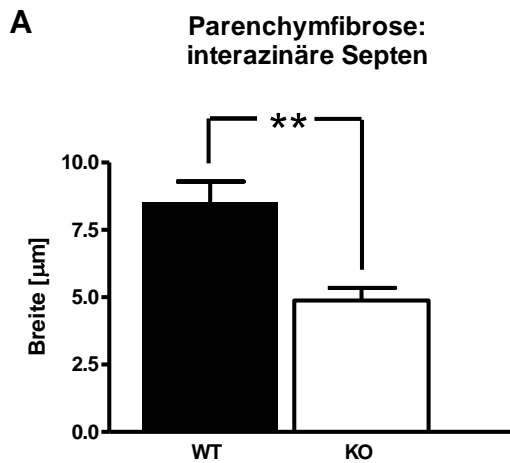
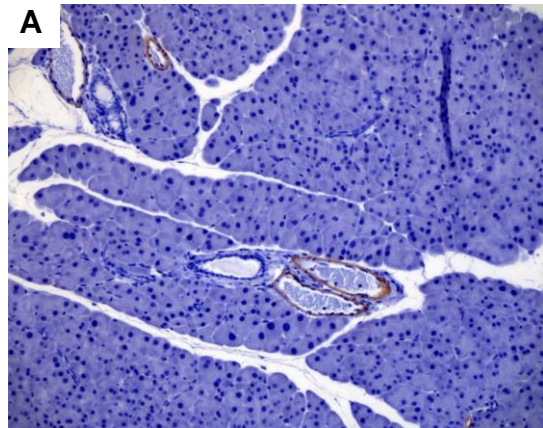


Abbildung 3-12: Kollagen-Expression in der CP

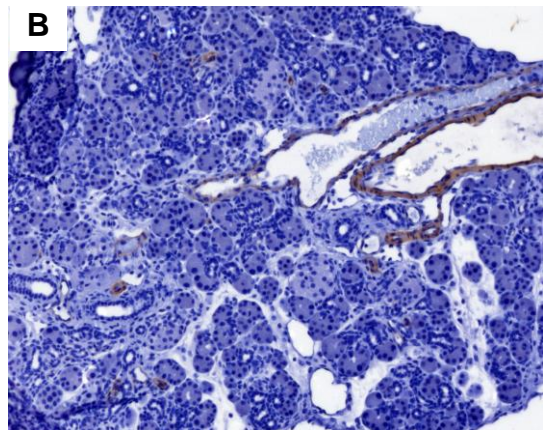
Bei der Parenchymfibrose (A) zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstieren. Der Vergleich der Fibrose der intralobulären Gänge (B) zeigt ebenfalls signifikant niedrigere Werte bei den RAGE^{-/-} Versuchstieren. Bei den interlobulären Gängen (C) sind die Werte der RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstieren tendenziell erhöht, aber nicht signifikant erhöht. Rechts ist jeweils ein Beispiel einer Kollagen-Färbung in einem RAGE^{+/+} Tier gegeben. (t-Test; **p < 0,01 vs. WT und KO, *p < 0,050 vs. WT und KO)

Um den Aktivitätsgrad der Fibrose in der CP und mögliche aktive Pankreassternzellen festzustellen, wurden immunhistochemische Analysen mit dem α -SMA Antikörper durchgeführt. Das Pankreasgewebe mit Ausprägung einer CP zeigte im Cerulein-Modell im Vergleich zum Kontrollgewebe keine Überexpression von α -SMA. α -SMA war lediglich in den Gefäßwänden nachweisbar. Somit war zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstieren auch kein Unterschied der α -SMA Expression erkennbar (Abbildung 3-13).

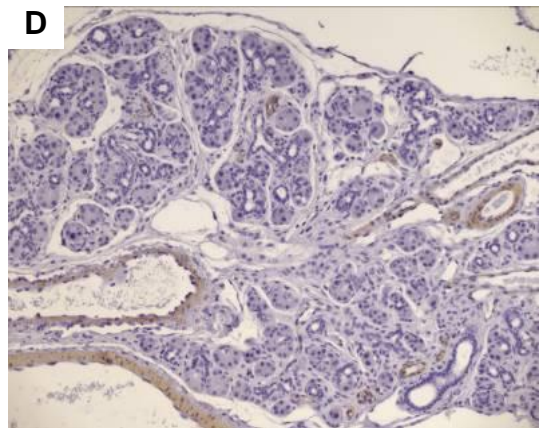
Kontrolltier



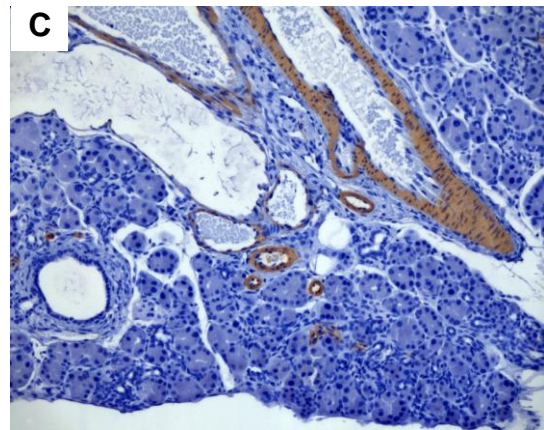
3 Wochen $RAGE^{+/+}$



10 Wochen $RAGE^{+/+}$



3 Wochen $RAGE^{-/-}$



10 Wochen $RAGE^{-/-}$

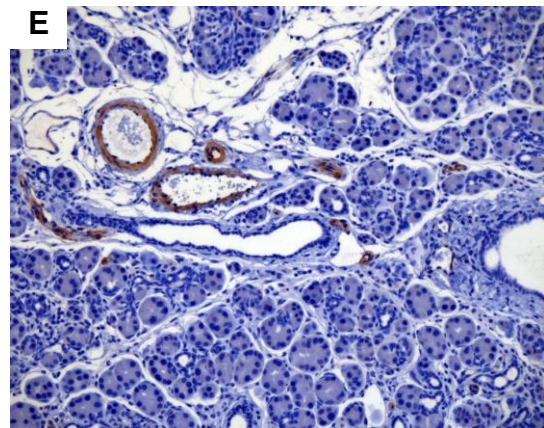


Abbildung 3-13: Expression von α -SMA

Immunhistochemische Analysen mit dem α -SMA Antikörper: Bild **A** zeigt gesundes Pankreasgewebe, die Bilder **B-E** zeigen $RAGE^{+/+}$ und $RAGE^{-/-}$ Tiere mit CP. Bei allen Tieren wird keine Anfärbung im fibrotischen Bindegewebe, sondern nur in den Gefäßwänden sichtbar. (100-fache Vergrößerung)

Duktale Metaplastische Läsionen

Zur Untersuchung möglicher Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, wurde zunächst die Häufigkeit tubulärer Komplexe histomorphologisch ausgewertet (Abbildung 3-14). Die Ausbildung tubulärer Komplexe war bei den Versuchstierdauern von 3 und 6 Wochen der RAGE^{+/+} Tieren seltener als bei den RAGE^{-/-} Tieren. Ab der Versuchsdauer von 10 Wochen zeigten die RAGE^{+/+} höhere Werte auf. Es zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren.

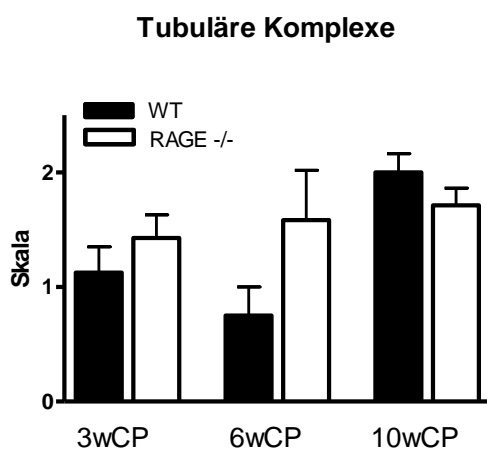


Abbildung 3-14: Ausbildung tubulärer Komplexe

Bei allen Versuchstiergruppen bilden sich tubuläre Komplexe (TC) aus, es zeigen sich aber aufgrund der Gruppengrößen keine signifikanten Unterschiede zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstieren. Die Ausbildung von tubulären Komplexen ist bei den 10 Wochen-RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Versuchstieren besonders ausgeprägt.

MML haben als Tumovorläufer eine besondere Bedeutung, deshalb wurden sie in dieser Arbeit im Gegensatz zu TC zusätzlich zur histopathologischen Begutachtung zur genaueren Analyse histochemisch identifiziert und quantifiziert. Abbildung 3-15 zeigt die Ausprägung der muzinösen Metaplasie im Cerulein-Modell (G2-kleine oder intralobuläre Gänge, G1-große oder interlobuläre Gänge). Alle Versuchstiere mit einer CP zeigten muzinös metaplastische Läsionen, wobei in allen Gruppen PAS-Läsionen häufiger vorkamen als AB-Läsionen. Die Tiere, welche 6 Wochen (A) lang injiziert wurden, zeigten bei den intralobulären Gängen (G2) der Wildtypen eine deutlich höhere Frequenz muzinös metaplastischer Läsionen als bei den RAGE^{-/-} Tieren. Nach 10 Wochen (B) war die Frequenz der muzinösen Läsionen in RAGE^{+/+} Tieren signifikant höher als in RAGE^{-/-} Tieren. Bei den Metaplasien der interlobulären

Gängen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren in der PAS- und der AB-Färbung. Insgesamt zeigten sich im Cerulein-Modell bei den RAGE^{-/-} Tieren weniger muzinös metaplastische Läsionen als in den RAGE^{+/+} Tieren.

Im Gangligatur-Modell wurde die Metaplasie nicht quantifiziert, da das Epithelgewebe schwand und deshalb keine Metaplasie erkennbar war.

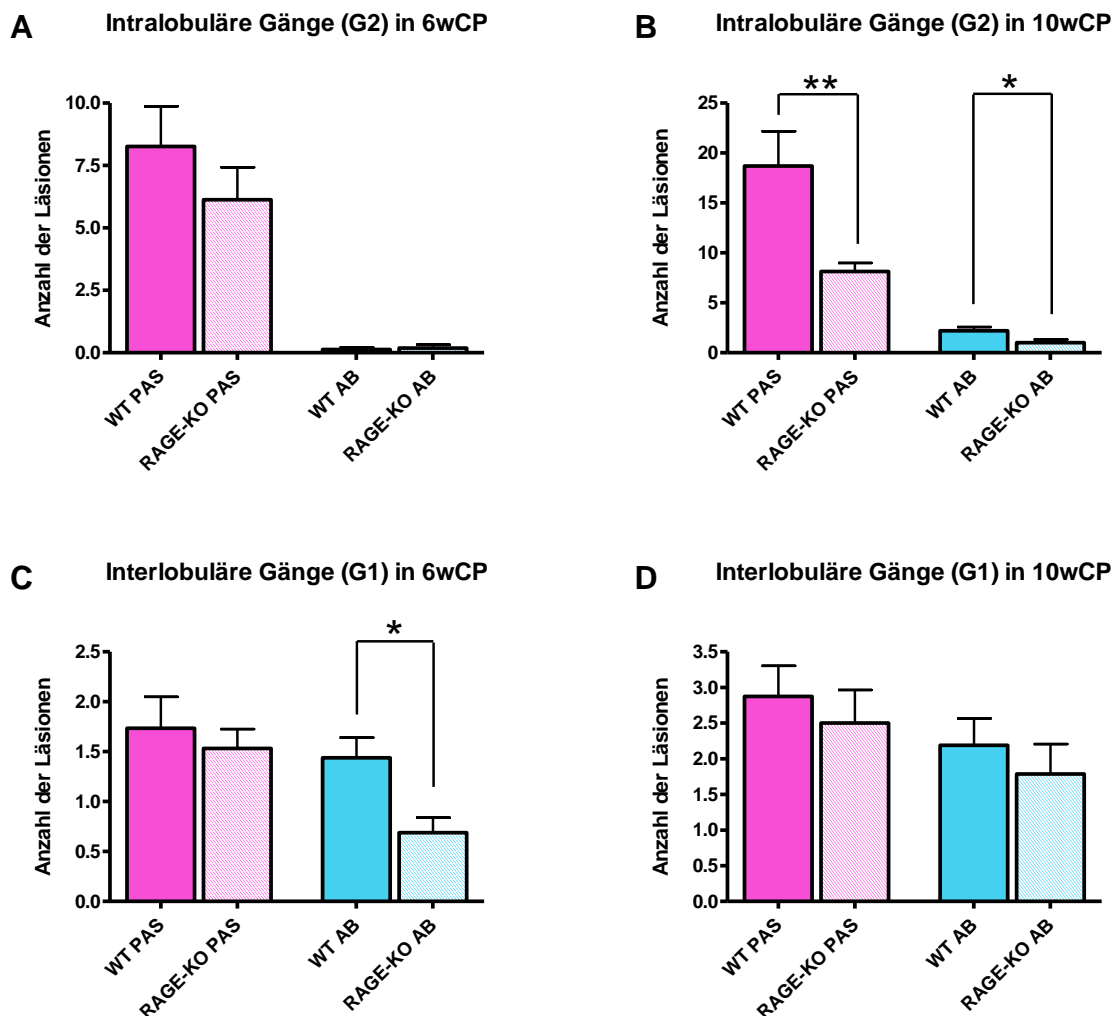


Abbildung 3-15: Ausbildung muzinöser metaplastischer Gang-Läsionen

A, B: intralobuläre Gänge (G2) Versuchstiergruppen 6 und 10 Wochen-CP. Es zeigt sich eine signifikant niedrigere Anzahl von PAS- und AB-positiven MML bei den RAGE^{-/-} Versuchstieren in der 10 Wochen-Versuchstiergruppe (**p = 0,0016 vs. RAGE^{-/-}, *p = 0,0429 vs. RAGE^{-/-}). **C, D:** interlobuläre Gänge (G1) der Versuchstiergruppen 6 und 10 Wochen-CP. Hier bestehen signifikant niedrigere Anzahlen von AB-positiven MML in der 6 Wochen-Versuchstiergruppe (*p = 0,0429 vs. RAGE^{-/-}). PAS-positive Läsionen sind in magenta und AB-positive Läsionen sind in türkis dargestellt.

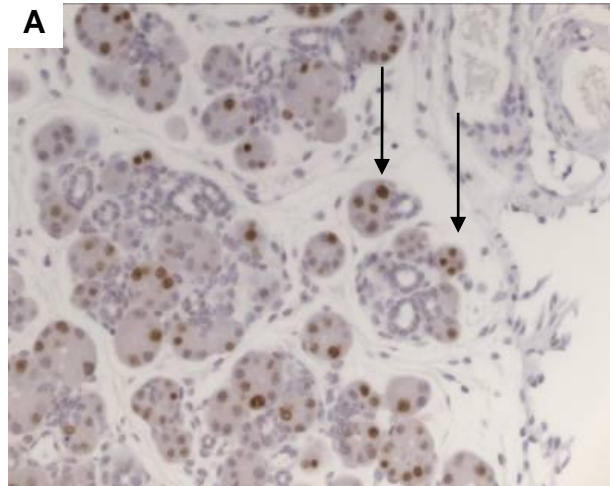
Mann-Whitney Test.

Proliferation der Azinuszellen

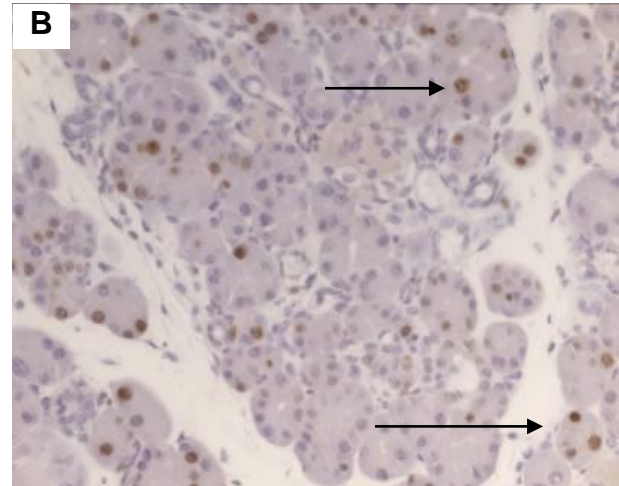
Um das Ausmaß der Antwort auf die Gewebsschädigung zu untersuchen, wurde eine Immunhistochemie mit dem Ki-67 Antikörper durchgeführt (Abbildung 3-16). Bei den Kontrolltieren zeigte sich keine Proliferation der Azinuszellen (nicht gezeigt). Die Proliferation der Azinuszellen ließ sich bei beiden Versuchstiergruppen belegen. Zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren war jedoch kein Unterschied erkennbar.

Sowohl in $RAGE^{+/+}$ als auch in $RAGE^{-/-}$ Tieren zeigte sich nach 3 Wochen eine höhere Proliferation der Azinuszellen als nach 10 Wochen.

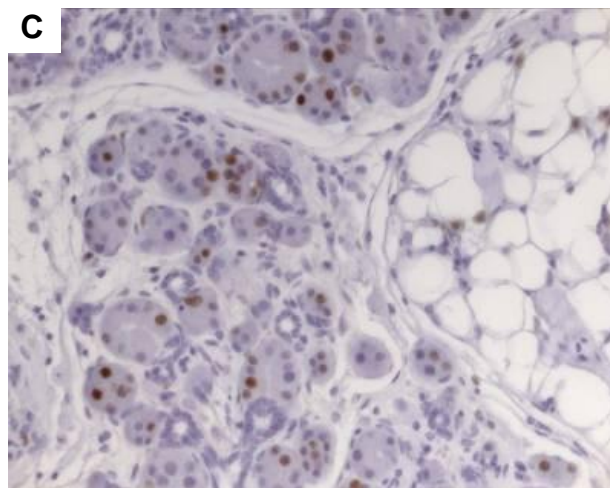
3 Wochen CP, $RAGE^{+/+}$



3 Wochen CP, $RAGE^{-/-}$



10 Wochen CP, $RAGE^{+/+}$



10 Wochen CP, $RAGE^{-/-}$

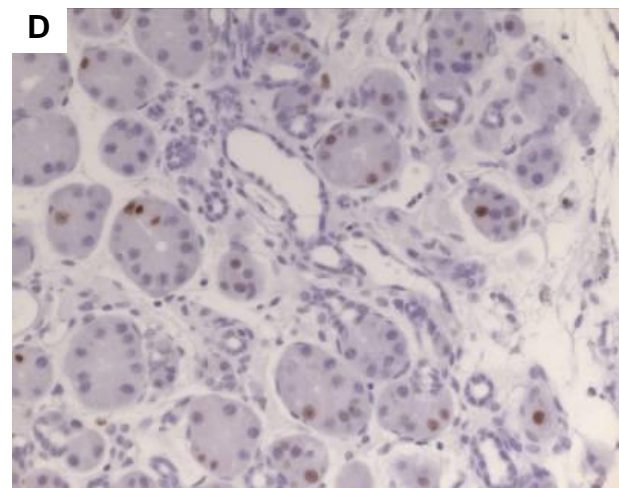


Abbildung 3-16: Proliferationsaktivität in der CP anhand der Ki-67 Expression

Vergleich der $RAGE^{+/+}$ (A, C) und $RAGE^{-/-}$ Tiere (B, D) im Cerulein-Modell. Es ist kein Unterschied der Zellproliferation zwischen den Versuchstieren sichtbar. Im Verlauf der CP zeigt sich bei den 3 Wochen-Tiere eine höhere Proliferation als bei den 10 Wochen-Tieren. Proliferierende Zellen sind Ki-67 positiv (braun). (siehe → und ↓). (200-fache Vergrößerung)

Als weiteres Maß für die Gewebsschädigung des Pankreas wurde die Ödembildung histomorphologisch von F. Bergmann untersucht. Die Ödembildung zeigte sich bei den $RAGE^{+/+}$ und $RAGE^{-/-}$ Tieren der 3-, 6- und 10 Wochen-Gruppe (Abbildung 3-17). Sie stieg bei den Tiermodellen bis zu 6 Wochen an und war in der 10. Woche wieder niedriger. Bei den $RAGE^{+/+}$ Tieren war die Ödembildung tendenziell stärker ausgeprägt als bei den $RAGE^{-/-}$ Mäusen. Die Unterschiede waren aber aufgrund der Gruppengrößen nicht signifikant.

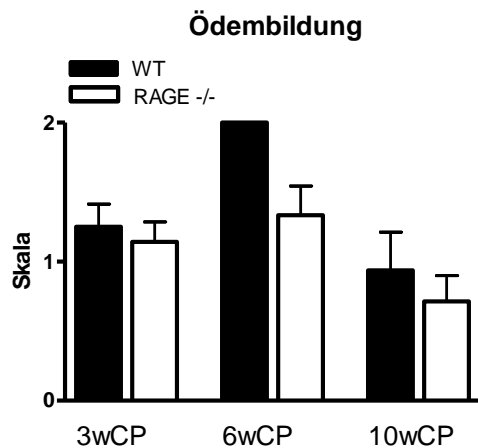


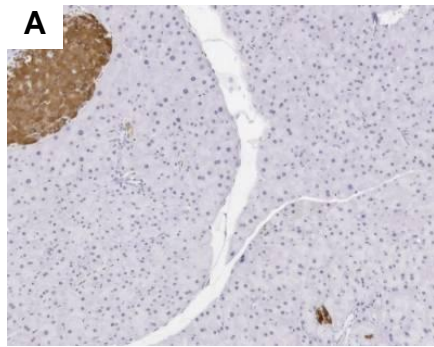
Abbildung 3-17: Ödembildung

Die Ödembildung ist bei den 6 Wochen-Versuchstieren besonders ausgeprägt. Die Unterschiede sind aufgrund der Gruppengröße nicht signifikant.

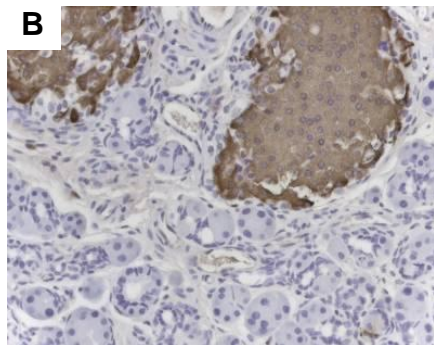
Untersuchung des endokrinen Pankreas

Um einen möglichen Einfluss von RAGE auf im Rahmen der Pankreatitis auftretende Veränderungen an den Langerhans'schen Inseln festzustellen, wurde ein immunhistochemischer Nachweis des Insulins durchgeführt. Die Langerhans'schen Inseln zeigten sich bei der Pankreatitis im Vergleich zum Kontrollgewebe in Anzahl und Größe unverändert (Abbildung 3-18). Auch im Vergleich zwischen Wildtyp und RAGE-Knockout zeigte sich kein Unterschied in der Größe und Anzahl der Langerhans'schen Inseln und kleiner Cluster von Inselzellen.

Kontrolltier



RAGE^{+/+} 10 Wochen



RAGE^{-/-} 10 Wochen

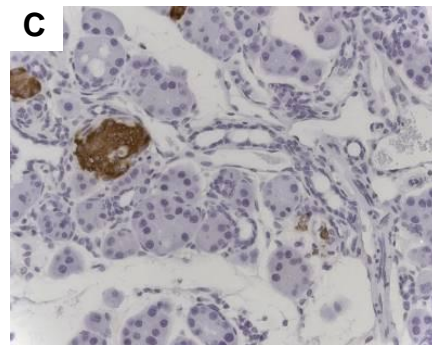


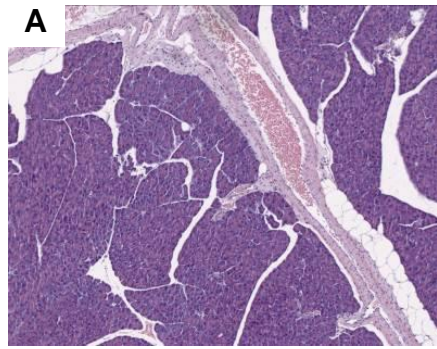
Abbildung 3-18: Untersuchung des endokrinen Pankreas

Pankreasgewebe mit den Langerhans'schen Inseln (Insulin: braun) in Kontrolltieren (A), und RAGE^{+/+} Tieren (B) und RAGE^{-/-} Tieren (C) mit CP. Es zeigt sich keine Veränderung der Langerhans'schen Inseln zwischen den verschiedenen Gruppen. (200-fache Vergrößerung)

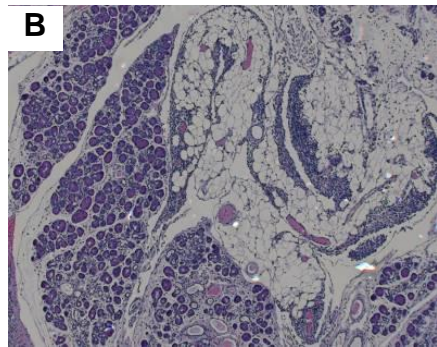
Gangligatur-Modell

Im Gangligatur-Modell wurde in der CP im Vergleich zum Kontrolltier die lipomatöse Umwandlung des Pankreasgewebes und der Verlust von funktionellem Drüsengewebe sichtbar (Abbildung 3-19). Hier bestand kein Unterschied zwischen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren. Aufgrund der lipomatösen Umwandlung des Pankreasgewebes konnten Fibrose und Metaplasie nicht weiter untersucht werden.

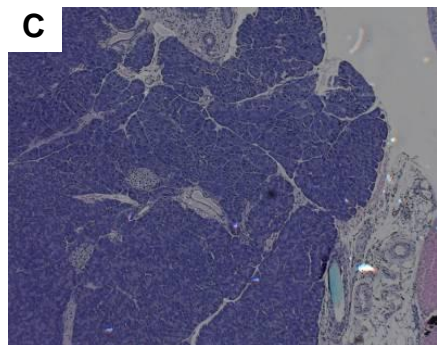
Kontrolltier



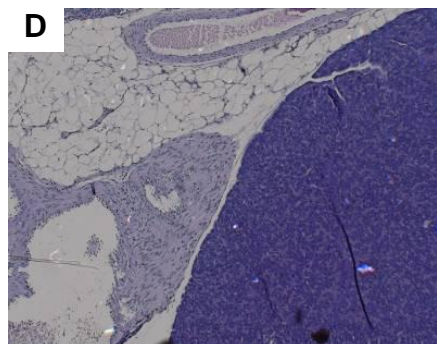
3 Wochen RAGE^{+/+}



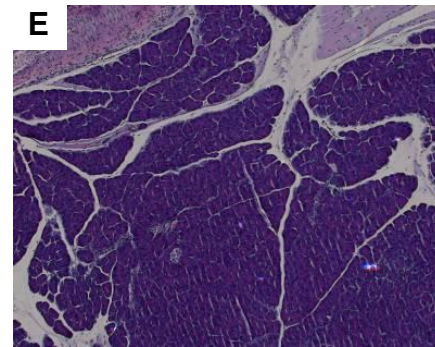
6 Wochen RAGE^{+/+}



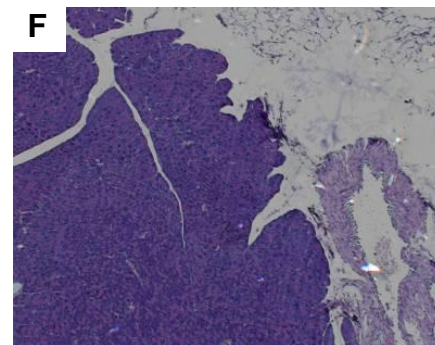
10 Wochen RAGE^{+/+}



3 Wochen RAGE^{-/-}



6 Wochen RAGE^{-/-}



10 Wochen RAGE^{-/-}

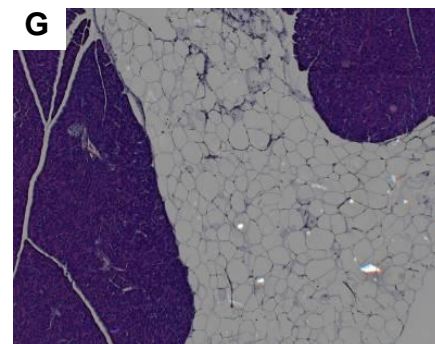


Abbildung 3-19: Histologische Veränderungen des Pankreas im Gangligatur-Modell

Normales Pankreas (A), CP mit der lipomatösen Atrophie bei RAGE^{+/+} (B, C, D) und RAGE^{-/-} Tieren (E, F, G) (50-fache Vergrößerung). Die lipomatöse Atrophie ist in RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren gleich stark ausgeprägt.

3.1.5 Gewichtsvergleich

Um mögliche Beeinträchtigungen der Tiere, wie z.B. eine im Rahmen der CP ausgelöste Kachexie zu untersuchen, wurde ein Gewichtsvergleich zwischen den Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf der CP durchgeführt. Generell wurde bei allen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren eine nicht signifikante Gewichtszunahme mit fortschreitendem Alter im Verlauf der 10 Wochen-Versuchsdauer beobachtet (Abbildung 3-20). Eine Kachexie als Zeichen einer schweren exokrinen Pankreasinsuffizienz wurde in den verwendeten Modellen nicht beobachtet. Ferner zeigte der Gewichtsvergleich zwischen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren, dass RAGE^{-/-} Tiere tendenziell schwerer waren, RAGE aber keinen messbaren Einfluss auf die Gewichtsentwicklung hatte.

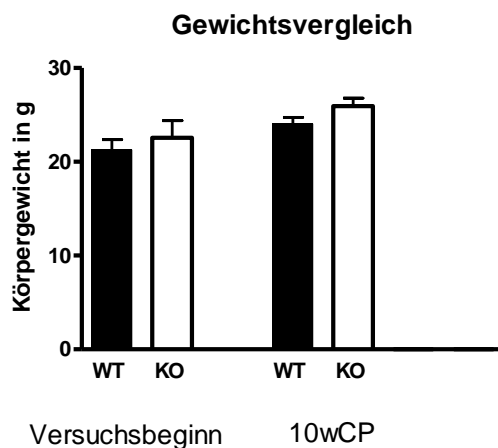


Abbildung 3-20: Gewichtsvergleich der 10 Wochen-Tiere

Mit fortschreitendem Verlauf der CP wird bei allen Tieren eine geringe Gewichtszunahme beobachtet. Die RAGE^{-/-} Tiere sind im Vergleich zu den RAGE^{+/+} Tieren zu Beginn und am Ende des Versuchs tendenziell schwerer.

3.2 Expressionsanalyse in humanen Proben

Um die Ergebnisse der Mausversuche auf ihre Übertragbarkeit auf die Pathophysiologie der chronischen Pankreatitis beim Menschen zu überprüfen, wurden Expressionsanalysen an humanem Pankreasgewebe durchgeführt.

3.2.1 Expression von RAGE

Mit der RAGE mRNA Analyse wurde die Expression von RAGE an gesundem humanem Pankreasgewebe im Vergleich zur CP und dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) untersucht. Entsprechend den Ergebnissen am Mausmodell, zeigte die Echtzeit Polymerasekettenreaktion eine Hochregulation der Expression von RAGE in der chronischen Pankreatitis und im PDAC im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe (Donor) (Abbildung 3-21). In allen untersuchten Pankreata wurde der Nachweis von RAGE-Expression belegt.

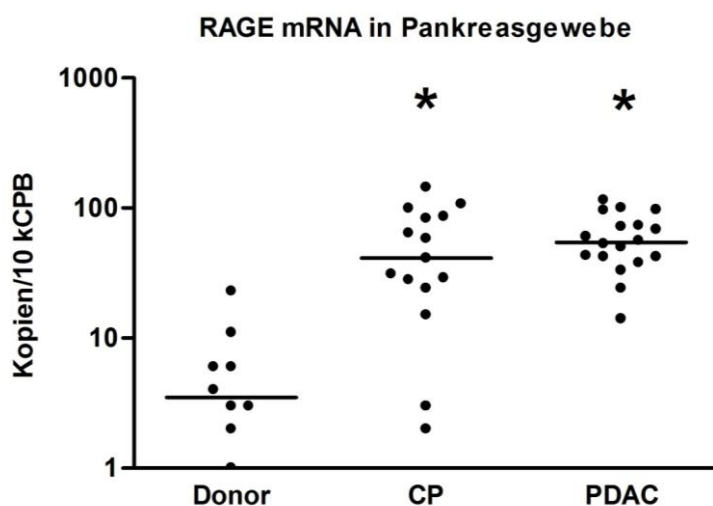


Abbildung 3-21: RAGE-Expression in humanem Gewebe

Expression von RAGE mRNA in Gewebe von Organspendern (Donor) (n=9), Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP) (n=15) und dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) (n=18). Im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe zeigt sich in der chronischen Pankreatitis sowie dem duktalem Adenokarzinom eine signifikant erhöhte Expression von RAGE (* $p < 0.01$, One-way ANOVA).

4 Diskussion

4.1 Wahl des Modells

Die chronische Pankreatitis ist eine für die Patienten sehr beeinträchtigende Erkrankung, die mangels kausaler Therapieansätze aktuell nicht heilbar ist und zu schweren lokalen Komplikationen, wie z.B. infizierte Pseudozysten, Pfortaderthrombose, Magenausgangsstenose, Gallengangsobstruktion, sowie zu exokriner Insuffizienz und zu Diabetes mellitus führen kann (HACKER and CHOBANIAN 1987). Klinisch stehen jedoch rezidivierende und schwer zu behandelnde Oberbauchschmerzen im Mittelpunkt. Im Verlauf der Erkrankung ist auf dem Boden der chronischen Entzündung zudem die Entstehung eines Pankreaskarzinoms möglich. Als einzige effektive Therapiemöglichkeit gilt die Resektion des betroffenen Gewebes. Um medikamentöse Therapieansätze zu einer Verhinderung des Fortschreitens der Erkrankung oder zur Heilung zu finden, ist ein besseres Verständnis der Pathophysiologie wichtig. Da dies nur in einem Organismus möglich ist, der die Physiologie des menschlichen Organismus möglichst exakt abbildet, müssen entsprechende Studien im Tierversuch mit Säugetieren erfolgen. Die Knockout-Technologie mit Vergleich von Wildtyp- und Knockout-Tieren gilt als wissenschaftlich hochwertige Methode, um die Rolle eines spezifischen Gens bei einer Erkrankung zu untersuchen. Für Knockout-Experimente werden aufgrund der Entschlüsselung des genetischen Codes und wegen ihrer einfachen Handhabung und kurzen Generationsdauer in der Regel Mäuse verwendet.

Das in Kapitel 2.1.2.1 beschriebene Cerulein-Modell der Pankreatitis gestattet ein schnelles und zuverlässiges Auftreten einer chronischen Pankreatitis. Die morphologischen und molekularen Veränderungen in den Wildtyp-Tieren zeigen, dass das Modell die humane chronische Pankreatitis gut widerspiegelt. Durch die Applikation der Substanz Cerulein ist es möglich eine CP auf minimal invasivem Weg zu induzieren (STROBEL, DOR et al. 2007).

Das Gangligatur-Modell (Kapitel 2.1.2.2) ist ebenfalls geeignet eine CP auszulösen. Allerdings führte dieses Modell in unseren Händen zu einer ausgeprägten

lipomatösen Atrophie und war damit für weitere Untersuchungen zu den wichtigsten Zielparametern Fibrose und duktales Metaplasie ungeeignet.

4.2 Physiologische Bedeutung von RAGE bei der chronischen Pankreatitis im Mausmodell

Die Expression von RAGE war bei allen Wildtypen mit Pankreatitis im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht. Um zu untersuchen, in welchen Zellen RAGE vermehrt exprimiert wurde, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigten, dass die Expression von RAGE vor allem in den einwandernden Entzündungszellen, den pankreatischen Sternzellen und den muzinös metaplastischen Läsionen lokalisiert war. Daher scheint die Hochregulierung von RAGE durch mehrere Mechanismen ausgelöst zu werden, wie z.B. durch die Infiltration von Entzündungszellen, durch Fibrose oder auch Metaplasie. Gleichzeitig ergibt sich daraus die Frage, ob RAGE an diesen pathophysiologischen Prozessen auch kausal beteiligt ist. Diese Frage wurde durch vergleichende Untersuchungen an RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren analysiert. Die Expression des RAGE-Liganden HMGB1 war bei den Tieren mit Pankreatitis ebenfalls erhöht. Der Vergleich zwischen RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren zeigte keinen Unterschied in der HMGB1-Expression. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass HMGB1 bei chronischer Pankreatitis unabhängig von RAGE reguliert wird. Für HMGB1 sind alternative Rezeptoren bekannt, wie z.B. die Toll-Like Rezeptoren -2 und -4 (PARK, GAMBONI-ROBERTSON et al. 2006). Daher könnten RAGE-Liganden wie HMGB1 bei RAGE^{-/-} Tieren über alternative Rezeptoren wirken. Die Werte der NF-κB-p65-Expression waren in Wildtyp-Tieren, bei den Kontrolltieren und allen Tieren mit CP vergleichbar. Erstaunlicherweise zeigten die RAGE^{-/-} Kontrolltiere jedoch signifikant höhere Werte im Vergleich zu den RAGE^{+/+} Kontrolltieren. Dies legt nahe, dass RAGE^{-/-} Tiere einen proinflammatorischen Genotyp besitzen, der über eine vermehrte Bindung von RAGE-Liganden an alternative proinflammatorische Rezeptoren wie TLR in Abwesenheit von RAGE vermittelt werden könnte. Als alternative Rezeptoren kommen die Toll-Like Rezeptoren -2 und -4 in Frage (PARK, SVETKAUSKAITE et al. 2004; PARK, GAMBONI-ROBERTSON et al. 2006). Um dies genauer zu untersuchen, könnten in einem weiteren Versuch Tripel-Knockout-Mäuse generiert

werden, z.B. RAGE-TLR-2-TLR-4-Knockout. In jedem Fall zeigen die Ergebnisse von NF- κ B-p65-Expression und der proinflammatorischen Zytokine TNF α und TGF β , dass in der CP eine nicht über RAGE vermittelte Entzündungsreaktion ablaufen muss. Über diese RAGE-unabhängige Mechanismen scheint es dabei zu einer kompletten Kompensation einer RAGE-Defizienz hinsichtlich der Entzündungsreaktion zu kommen. Die Ergebnisse zeigen, dass Mastzellen einen Teil der Immunzellen darstellen, die im Rahmen der Pankreatitis die Bauchspeicheldrüse infiltrieren. Die Mastzelleninfiltration spielt eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese (CRIVELLATO, NICO et al. 2008). Es zeigte sich eine deutliche Mastzelleninfiltration bei Tieren mit Pankreatitis. RAGE scheint tendenziell eine Umverteilung der Mastzellinfiltration zu vermitteln, jedoch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren festgestellt. Insgesamt moduliert RAGE die entzündliche Infiltration, wobei dies bei der pathohistologischen Beurteilung erst in der späteren Phase der CP deutlich wird. Eine RAGE-Defizienz bedingt jedoch keine verminderte Entzündungsreaktion, sondern wahrscheinlich sogar eine kompensatorisch überregulierte Entzündung, die über alternative Rezeptoren vermittelt werden könnte.

Neben der Entzündung standen die Fibrose und die Metaplasie als weitere Zielparameter im Mittelpunkt des Interesses. Im Gegensatz zur Entzündungsreaktion selbst, zeigen die Ergebnisse deutlich den Einfluss von RAGE sowohl auf die Fibrose als auch auf die Metaplasie.

Die CP ist histologisch gekennzeichnet durch einen fibrotischen Umbau (MUEHLING, KOLB et al. 2004). Es konnte bereits gezeigt werden, dass RAGE in verschiedenen Geweben und Erkrankungen eine Fibrose vermittelt, wie beispielsweise die Lungenfibrose (HE, KUBO et al. 2007), die peritoneale Fibrose bei Peritonealdialyse (DE VRIESE, TILTON et al. 2006; SCHWENGER 2006) und die Fibrose der Nieren (LI, WANG et al. 2004; BOHLENDER, FRANKE et al. 2005). Diese Arbeit zeigt nun, dass RAGE auch bei der Fibrosierung des Pankreas eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Ergebnisse zeigen tendenziell weniger Fibrose bei den RAGE^{-/-} als bei den RAGE^{+/+} Tieren. RAGE scheint eine wahrscheinlich entzündungsunabhängige Rolle zu spielen, möglicherweise direkt über Regulation von Fibrose-induzierten Genen. Die molekularen Mechanismen müssen weiter

aufgeklärt werden. In unserem CP Modell war dies nicht zu klären, da die Fibrose im Cerulein-Modell bei den Versuchstieren im Vergleich zum humanen Gewebe einen relativ niedrigen Aktivitätsgrad aufwies, wie die fehlende Hochregulation der α -SMA-Expression zeigt. Die α -SMA Färbung zeigt den Aktivitätsgrad der CP und markiert aktive Pankreassternzellen (ERKAN, MICHALSKI et al. 2008). Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Es ist bekannt, dass RAGE einen Einfluss auf die entzündungsabhängige Karzinogenese hat (GEBHARDT, RIEHL et al. 2008). Im Pankreas entstehen duktale Metaplasien als frühe Mechanismen der Karzinogenese (STROBEL, DOR et al. 2007; STROBEL, DOR et al. 2007), deshalb wurde in dieser Studie der Einfluss von RAGE auf die Entstehung verschiedener metaplastischen Läsionen untersucht. Bei den tubulären Komplexen zeigte sich die ansteigende Ausbildung während der 10 Wochen-Versuchstiergruppen, allerdings war hier kein signifikanter Unterschied zwischen den $RAGE^{+/+}$ und $RAGE^{-/-}$ Tieren sichtbar. Dagegen zeigten die Untersuchungen der MML bei den $RAGE^{-/-}$ Tieren insgesamt weniger muzinös metaplastische Läsionen. Bei den Untersuchungen der intralobulären Gängen waren die Werte der $RAGE^{+/+}$ Tiere signifikant erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, dass RAGE eine wichtige Rolle bei der Bildung von MML spielt. Eine RAGE-Defizienz hat eine verminderte Frequenz der MML zur Folge und scheint damit einen protektiven Einfluss in der Karzinogenese zu haben.

Die Proliferation der Azinuszellen ist bei $RAGE^{+/+}$ und $RAGE^{-/-}$ Tieren vergleichbar. RAGE scheint somit keinen Einfluss auf die Regeneration der Azinuszellen zu haben. Da in $RAGE^{-/-}$ Tieren ein geringerer Verlust von Azinuszellen zu beobachten ist, könnte es sein, dass eine RAGE-Defizienz vor Azinuzellschädigung schützt.

Da RAGE eine große Rolle im Diabetes Mellitus spielt (BIERHAUS and NAWROTH 2009), wurde der Inselzellerhalt untersucht. Bei den Inselzellen zeigten sich viele kleine Inselzellhaufen, die bei $RAGE^{+/+}$ und $RAGE^{-/-}$ Tieren gleich häufig waren (STROBEL, DOR et al. 2007). Dies lässt darauf schließen, dass RAGE keinen Einfluss auf die Homöostase der Inselzellen bei der chronischen Pankreatitis hat.

Der Gewichtsvergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren mit CP zeigte sowohl bei Wildtyp- als auch bei RAGE-Knockout-Mäusen keinen signifikanten Unterschied. Die RAGE^{-/-} Tiere hatten im Vergleich zu den Wildtypen sowohl vor als auch nach dem Versuch tendenziell ein leicht höheres Körpergewicht. Eine starke Gewichtsabnahme im Rahmen der CP als Zeichen einer exokrinen Insuffizienz wurde nicht beobachtet.

4.3 Bedeutung von RAGE in der Karzinomentstehung

Gebhardt et al. zeigten, dass RAGE unter Aufrechterhaltung der Entzündung einen Effekt auf die Karzinogenese hat (GEBHARDT, RIEHL et al. 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass RAGE auch einen Einfluss auf die Ausprägung einer Fibrose hat (HE, KUBO et al. 2007). In den durchgeführten Versuchen waren jedoch bei den RAGE^{-/-} Tieren seltener Metaplasie und geringere Fibrose erkennbar. RAGE scheint an der muzinösen Metaplasie und Genese von potentieller Karzinomentstehung beteiligt zu sein, sowie an der Fibrosebildung. Die hierfür verantwortlichen Mechanismen sind nicht bekannt. Es gibt Studien die darauf hindeuten, dass RAGE auf vielen Zelltypen exprimiert wird wie z.B. auf Pankreassternzellen, Tumorzellen und Entzündungszellen. Verschiedene RAGE-Liganden wie z.B. HMGB1, S100A8/A9 werden von diesen Zelltypen sezerniert. Über RAGE ist eine entzündungsunabhängige Kommunikation zwischen dem Tumor und den Zellen der Mikroumgebung insbesondere des Stromas möglich (LOGSDON, FUENTES et al. 2007). Eine RAGE-Inhibition könnte somit in der Zukunft ein prophylaktischer oder therapeutischer Ansatz bei der CP und beim Pankreaskarzinom sein.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zeigten, dass sich die zentralen Entzündungswerte zwischen den RAGE^{+/+} und RAGE^{-/-} Tieren nicht unterschieden. Hingegen gab es bei der Metaplasie und der Fibrose Unterschiede. Diese Beobachtungen legen nahe, dass entzündungsunabhängige Mechanismen, beispielsweise eine RAGE-vermittelte Kommunikation zwischen Epithelgewebe und Stroma beteiligt sind. Hierfür sind weitere Untersuchungen z.B. an Co-Kulturen von Karzinom- und Bindegewebszellen notwendig. Um die Relevanz der RAGE-Expression im Pankreasgewebe nachzuweisen, könnten Experimente an Chimären durchgeführt werden. Hierbei werden Tiere deplementiert und deren Knochenmark transplantiert. Um weitere Erkenntnisse zu erlangen, könnte die RAGE-Defizienz im transgenen Karzinommodell (CLARK, HINGORANI et al. 2007) sowie die Bedeutung

einer RAGE-Defizienz in CP und Karzinom bei diabetischen und nicht diabetischen Tieren untersucht werden. Bei diabetischen Tieren könnte eine größere Relevanz existieren, da hier mehr AGE's und damit mehr RAGE-Liganden anfallen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass RAGE über nicht entzündungsvermittelte Mechanismen an der Entwicklung von Fibrose und muzinöser Metaplasie und damit an frühen Schritten der Karzinogenese im Pankreas beteiligt ist.

4.4 Rückschlüsse auf die humane Erkrankung

Um Rückschlüsse auf die humane Erkrankung zu ziehen, wurden eine funktionelle Studie an der Maus sowie eine Expressionsanalyse von RAGE an menschlichem Gewebe durchgeführt. Hierbei zeigten sich vergleichbare Ergebnisse, was die Zulässigkeit der Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Maus auf den Mensch nahe legt.

4.5 Schlussfolgerungen

RAGE scheint eine wichtige Rolle bei der CP zu spielen. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Expression von RAGE bei der CP hochreguliert wird. Hierfür scheinen die Entzündungs- und Sternzellen sowie metaplastische Läsionen verantwortlich zu sein. Demgegenüber zeigen die Expressionsanalysen verschiedener Entzündungsmediatoren, dass die Entzündungsreaktion RAGE-unabhängig abläuft, wahrscheinlich über alternative Rezeptoren wie TLRs. Im Gegensatz zur Entzündungsreaktion, für die RAGE nicht notwendig zu sein scheint, zeigen die Ergebnisse eine wichtige Rolle von RAGE sowohl für die Ausbildung der Fibrose als auch für die Ausbildung muzinös metaplastischer Läsionen. Der Einfluss von RAGE scheint hier unabhängig von der Entzündungsreaktion zu sein, und könnte durch eine direkte Interaktion von Epithel- und Bindegewebszellen über „RAGE-Signaling“ bedingt sein. Eine RAGE-Defizienz scheint vor Fibrose sowie vor der Ausbildung muzinös metaplastischer Läsionen zu schützen. Zur Klärung der

beteiligten molekularen Mechanismen sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

5 Zusammenfassung

Bei der chronischen Pankreatitis (CP) kommt es durch eine anhaltende Entzündungsreaktion zu einer dauerhaften Gewebeschädigung der Bauchspeicheldrüse mit Störung der exokrinen und endokrinen Funktion. Die CP ist histologisch gekennzeichnet durch Fibrose und Metaplasie der Ausführungsgänge. Eine muzinöse Metaplasie ist auch in der Umgebung eines Pankreaskarzinoms zu beobachten und gilt als ein früher wesentlicher Schritt in der Tumorentstehung. Dem „Receptor for Advanced Glycation End-products: RAGE“ wird eine Schlüsselrolle beim Verlauf von chronischen Entzündungsprozessen zugeschrieben und er scheint auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Fibrose zu spielen. Auch bei den sekundären Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus (Retinopathien und Nephropathien) spielt RAGE eine wichtige Rolle. Hingegen ist über eine mögliche Beteiligung von RAGE bei der Entstehung einer CP und in der Karzinogenese im Pankreas bisher nichts bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die mögliche kausale Rolle von RAGE bei der Entwicklung sowohl der Entzündung als auch bei der Fibrose und der duktaalen Metaplasie, sowie bei der Schädigung des endokrinen Pankreasanteils im Laufe der chronischen Pankreatitis zu untersuchen.

Die Versuche wurden anhand zweier verschiedener Modelle, dem Cerulein- und Gangligatur-Modell, durch den Vergleich einer experimentell induzierten CP zwischen Wildtyp- ($RAGE^{+/+}$) und RAGE-Knockout-Mäusen ($RAGE^{-/-}$) durchgeführt. Zur Evaluation wurden histologische und molekularbiologische Methoden an Gewebeproben des Pankreas eingesetzt.

Für dieses Versuchsvorhaben stellte sich das Cerulein-Modell als geeignet heraus. Alle Tiere zeigten eine chronische Pankreatitis. RAGE scheint eine wichtige Rolle bei der CP zu spielen. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die Expression von RAGE bei der CP hochreguliert wird. Hierfür scheinen die Entzündungs- und Sternzellen sowie metaplastische Läsionen verantwortlich zu sein. Demgegenüber zeigen die Expressionsanalysen verschiedener Entzündungsmediatoren, dass die

Entzündungsreaktion RAGE-unabhängig abläuft, wahrscheinlich über alternative Rezeptoren wie TLRs. Im Gegensatz zur Entzündungsreaktion, für die RAGE nicht notwendig zu sein scheint, zeigen die Ergebnisse eine wichtige Rolle von RAGE sowohl für die Ausbildung der Fibrose als auch für die Ausbildung muzinös metaplastischer Läsionen. Der Einfluss von RAGE scheint hier unabhängig von der Entzündungsreaktion zu sein, und könnte durch eine direkte Interaktion von Epithel- und Bindegewebszellen über „RAGE-Signaling“ bedingt sein. Eine RAGE-Defizienz scheint vor Fibrose sowie vor der Ausbildung muzinös metaplastischer Läsionen zu schützen. Zur Klärung der beteiligten molekularen Mechanismen sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass die RAGE-Expression eine Rolle bei der Entstehung einer CP spielt, wobei Tiere mit normaler RAGE-Expression grundsätzlich eine intensivere Form der CP entwickelten als RAGE-defiziente Tiere. Hingegen scheint RAGE die Entzündungsreaktion selbst nur zu modulieren. Bei RAGE-Defizienz wird die Entzündungsreaktion wahrscheinlich über alternative Signaltransduktionswege vermittelt, deren Identifikation aussteht. RAGE scheint einen Einfluss auf die Fibrose, sowie die Ausbildung muzinös metaplastischer Läsionen zu haben; die genauen Mechanismen bleiben jedoch noch unbekannt.

6 Summary

In chronic pancreatitis (CP) a sustained inflammation leads to permanent tissue damage of the pancreas with disturbance of the exocrine and endocrine function. CP is histologically characterized by fibrosis and ductal metaplasia. A mucinous metaplasia is also observed in the environment of pancreatic cancer and is considered as fundamental early step in tumor development. In other tissues the "Receptor for Advanced Glycation End-products: RAGE" is thought to play a key role in the progression of chronic inflammation and in the pathogenesis of fibrosis. RAGE is also involved in the secondary complications of diabetes mellitus such as retinopathy and nephropathy. However nothing is known so far about the possible involvement of RAGE in the pathogenesis of CP and in carcinogenesis in the pancreas.

Thus, the aim of this study was to examine the potential causal role of RAGE in the development of both inflammation and fibrosis as well as ductal metaplasia and in the damage of the endocrine pancreas in the course of chronic pancreatitis.

The experiments were based on two different models of experimentally induced CP, the cerulein and ligature model. The role of RAGE was assessed by comparison of wild type ($RAGE^{+/+}$) and RAGE-knockout ($RAGE^{-/-}$) mice. Analysis included histological and molecular assessment of pancreatic tissue samples.

For this experimental project the cerulein model turned out to be more suitable. All animals in the cerulein group consistently developed chronic pancreatitis. RAGE seems to play an important role in CP. The performed investigations showed that the expression of RAGE is upregulated in the CP. By immunohistochemistry RAGE-expression was localized to inflammatory cells, stellate cells as well as metaplastic ductal lesions. In contrast, the expression analysis of different inflammatory mediators indicated that RAGE is not necessary for the inflammatory response – RAGE modulates inflammation, but in absence of RAGE the inflammation appears to be mediated by alternative receptors such as TLRs. In contrast to the inflammatory response, for which RAGE does not seem to be required, the results show an

important role of RAGE both for the development of fibrosis as well as for the development of mucinous metaplastic lesions. The effect of RAGE here seems to be independent from the inflammatory response and could, therefore, result from a direct interaction between epithelial and connective tissue cells mediated by RAGE signaling. A RAGE deficiency seems to protect from fibrosis and the development of mucinous metaplastic lesions. Further studies are necessary to identify the underlying molecular mechanisms in more detail.

In conclusion RAGE-expression plays a role in the development of CP. Animals with regular RAGE-expression developed a more intensive form of CP compared to RAGE-deficient animals. However, RAGE seems to be only a modulator of the inflammatory response itself. In RAGE-deficiency the inflammatory response is probably communicated via alternative pathways, whose identification is to be determined. RAGE seems to have a direct effect on fibrosis and the development of mucinous metaplastic lesions, probably mediating a crosstalk between epithelium and stroma, but the exact mechanisms remain unknown.

7 Literaturverzeichnis

- Akira, S., K. Takeda and T. Kaisho (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." *Nat Immunol* **2**(8): 675-80.
- Andersson, U. and K. J. Tracey (2003). "HMGB1 in sepsis." *Scand J Infect Dis* **35**(9): 577-84.
- Arumugam, T., D. M. Simeone, K. Van Golen and C. D. Logsdon (2005). "S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion." *Clin Cancer Res* **11**(15): 5356-64.
- Bartling, B., H. S. Hofmann, B. Weigle, R. E. Silber and A. Simm (2005). "Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma." *Carcinogenesis* **26**(2): 293-301.
- Basta, G., G. Lazzarini, M. Massaro, T. Simoncini, P. Tanganelli, C. Fu, T. Kislinger, D. M. Stern, A. M. Schmidt and R. De Caterina (2002). "Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses." *Circulation* **105**(7): 816-22.
- Baynes, J. W. (1991). "Role of oxidative stress in development of complications in diabetes." *Diabetes* **40**(4): 405-12.
- Bianchi, M. E. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." *J Leukoc Biol* **81**(1): 1-5.
- Bierhaus, A., S. Chevion, M. Chevion, M. Hofmann, P. Quehenberger, T. Illmer, T. Luther, E. Berentshtein, H. Tritschler, M. Muller, P. Wahl, R. Ziegler and P. P. Nawroth (1997). "Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells." *Diabetes* **46**(9): 1481-90.
- Bierhaus, A., P. M. Humpert, M. Morcos, T. Wendt, T. Chavakis, B. Arnold, D. M. Stern and P. P. Nawroth (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med.* **83**: 876-86.
- Bierhaus, A. and P. P. Nawroth (2009). "Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications." *Diabetologia* **52**(11): 2251-63.
- Bierhaus, A., S. Schiekofer, M. Schwaninger, M. Andrassy, P. M. Humpert, J. Chen, M. Hong, T. Luther, T. Henle, I. Kloting, M. Morcos, M. Hofmann, H. Tritschler, B. Weigle, M. Kasper, M. Smith, G. Perry, A. M. Schmidt, D. M. Stern, H. U. Haring, E. Schleicher and P. P. Nawroth (2001). "Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB." *Diabetes* **50**(12): 2792-808.
- Bockman, D. E., W. R. Boydston and M. C. Anderson (1982). "Origin of tubular complexes in human chronic pancreatitis." *Am J Surg* **144**(2): 243-9.
- Bohlender, J. M., S. Franke, G. Stein and G. Wolf (2005). "Advanced glycation end products and the kidney." *Am J Physiol Renal Physiol* **289**(4): F645-59.
- Brett, J., A. M. Schmidt, S. D. Yan, Y. S. Zou, E. Weidman, D. Pinsky, R. Nowygrod, M. Neeper, C. Przysiecki, A. Shaw and et al. (1993). "Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues." *Am J Pathol* **143**(6): 1699-712.

- Brownlee, M., A. Cerami and H. Vlassara (1988). "Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications." *N Engl J Med* **318**(20): 1315-21.
- Bustin, M., D. A. Lehn and D. Landsman (1990). "Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes." *Biochim Biophys Acta* **1049**(3): 231-43.
- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, M. Kadihasanoglu, M. Erkan, W. Park, U. Hinz, T. Giese, M. W. Muller, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess (2007). "The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis." *Gut* **56**(4): 534-44.
- Chapman, M. R., L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark and S. J. Hultgren (2002). "Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation." *Science* **295**(5556): 851-5.
- Chavakis, T., A. Bierhaus, N. Al-Fakhri, D. Schneider, S. Witte, T. Linn, M. Nagashima, J. Morser, B. Arnold, K. T. Preissner and P. P. Nawroth (2003). "The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment." *J Exp Med* **198**(10): 1507-15.
- Clark, C. E., S. R. Hingorani, R. Mick, C. Combs, D. A. Tuveson and R. H. Vonderheide (2007). "Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion." *Cancer Res* **67**(19): 9518-27.
- Crivellato, E., B. Nico and D. Ribatti (2008). "Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis." *Cancer Lett* **269**(1): 1-6.
- Dale, I., M. K. Fagerhol and I. Naesgaard (1983). "Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen." *Eur J Biochem* **134**(1): 1-6.
- De Vriese, A. S., R. G. Tilton, S. Mortier and N. H. Lameire (2006). "Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia." *Nephrol Dial Transplant* **21**(9): 2549-55.
- Demols, A., J. L. Van Laethem, E. Quertinmont, C. Degraef, M. Delhaye, A. Geerts and J. Deviere (2002). "Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(6): G1105-12.
- Donato, R. (2001). "S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(7): 637-68.
- Du Yan, S., H. Zhu, J. Fu, S. F. Yan, A. Roher, W. W. Tourtellotte, T. Rajavashisth, X. Chen, G. C. Godman, D. Stern and A. M. Schmidt (1997). "Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5296-301.
- Erkan, M., C. W. Michalski, S. Rieder, C. Reiser-Erkan, I. Abiatari, A. Kolb, N. A. Giese, I. Esposito, H. Friess and J. Kleeff (2008). "The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma." *Clin Gastroenterol Hepatol* **6**(10): 1155-61.
- Erspamer, V. (1970). "Progress report: caerulein." *Gut* **11**(1): 79-87.
- Foell, D., M. Frosch, C. Sorg and J. Roth (2004). "Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation." *Clin Chim Acta* **344**(1-2): 37-51.
- Gebhardt, C., J. Nemeth, P. Angel and J. Hess (2006). "S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer." *Biochem Pharmacol* **72**(11): 1622-31.

- Gebhardt, C., A. Riehl, M. Durchdewald, J. Nemeth, G. Furstenberger, K. Muller-Decker, A. Enk, B. Arnold, A. Bierhaus, P. P. Nawroth, J. Hess and P. Angel (2008). "RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development." *J Exp Med* **205**(2): 275-85.
- Goodwin, G. H. and E. W. Johns (1977). "The isolation and purification of the high mobility group (HMG) nonhistone chromosomal proteins." *Methods Cell Biol* **16**: 257-67.
- Goova, M. T., J. Li, T. Kislinger, W. Qu, Y. Lu, L. G. Bucciarelli, S. Nowygrod, B. M. Wolf, X. Caliste, S. F. Yan, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2001). "Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice." *Am J Pathol* **159**(2): 513-25.
- Hacker, J. F. and S. J. Chobanian (1987). "Pain of chronic pancreatitis: etiology, natural history, therapy." *Dig Dis* **5**(1): 41-8.
- He, M., H. Kubo, K. Ishizawa, A. E. Hegab, Y. Yamamoto, H. Yamamoto and M. Yamaya (2007). "The role of the receptor for advanced glycation end-products in lung fibrosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**(6): L1427-36.
- Hermani, A., B. De Servi, S. Medunjanin, P. A. Tessier and D. Mayer (2006). "S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells." *Exp Cell Res* **312**(2): 184-97.
- Hermani, A., J. Hess, B. De Servi, S. Medunjanin, R. Grobholz, L. Trojan, P. Angel and D. Mayer (2005). "Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer." *Clin Cancer Res* **11**(14): 5146-52.
- Hofmann, M. A., S. Drury, C. Fu, W. Qu, A. Taguchi, Y. Lu, C. Avila, N. Kambham, A. Bierhaus, P. Nawroth, M. F. Neurath, T. Slattery, D. Beach, J. McClary, M. Nagashima, J. Morser, D. Stern and A. M. Schmidt (1999). "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides." *Cell* **97**(7): 889-901.
- Hofmann, M. A., S. Drury, B. I. Hudson, M. R. Gleason, W. Qu, Y. Lu, E. Lalla, S. Chitnis, J. Monteiro, M. H. Stickland, L. G. Bucciarelli, B. Moser, G. Moxley, S. Itescu, P. J. Grant, P. K. Gregersen, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2002). "RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response." *Genes Immun* **3**(3): 123-35.
- Hofmann, M. A., E. Lalla, Y. Lu, M. R. Gleason, B. M. Wolf, N. Tanji, L. J. Ferran, Jr., B. Kohl, V. Rao, W. Kisiel, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2001). "Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model." *J Clin Invest* **107**(6): 675-83.
- Hori, O., J. Brett, T. Slattery, R. Cao, J. Zhang, J. X. Chen, M. Nagashima, E. R. Lundh, S. Vijay, D. Nitecki and et al. (1995). "The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system." *J Biol Chem* **270**(43): 25752-61.
- Hou, F. F., J. P. Jiang, J. Q. Guo, G. B. Wang, X. Zhang, D. M. Stern, A. M. Schmidt and W. F. Owen, Jr. (2002). "Receptor for advanced glycation end products on human synovial fibroblasts: role in the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis." *J Am Soc Nephrol* **13**(5): 1296-306.
- Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E. S. Garrett, S. N. Goodman, S. E. Kern, D. S. Klimstra, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges and G. J. Offerhaus (2001). "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new

- nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." *Am J Surg Pathol* **25**(5): 579-86.
- Hudson, B. I., M. H. Stickland, T. S. Futers and P. J. Grant (2001). "Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy." *Diabetes* **50**(6): 1505-11.
- Ishiguro, H., N. Nakaigawa, Y. Miyoshi, K. Fujinami, Y. Kubota and H. Uemura (2005). "Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development." *Prostate* **64**(1): 92-100.
- Jing, R., M. Cui, J. Wang and H. Wang "Receptor for advanced glycation end products (RAGE) soluble form (sRAGE): a new biomarker for lung cancer." *Neoplasma* **57**(1): 55-61.
- Kislinger, T., C. Fu, B. Huber, W. Qu, A. Taguchi, S. Du Yan, M. Hofmann, S. F. Yan, M. Pischetsrieder, D. Stern and A. M. Schmidt (1999). "N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression." *J Biol Chem* **274**(44): 31740-9.
- Kislinger, T., N. Tanji, T. Wendt, W. Qu, Y. Lu, L. J. Ferran, Jr., A. Taguchi, K. Olson, L. Bucciarelli, M. Goova, M. A. Hofmann, G. Cataldegirmen, V. D'Agati, M. Pischetsrieder, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2001). "Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(6): 905-10.
- Lalla, E., I. B. Lamster, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2001). "Receptor for advanced glycation end products, inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: mechanisms and insights into therapeutic modalities." *Ann Periodontol* **6**(1): 113-8.
- Landsman, D. and M. Bustin (1993). "A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins." *Bioessays* **15**(8): 539-46.
- Lechene de la Porte, P., J. Iovanna, C. Odaira, R. Choux, H. Sarles and Z. Berger (1991). "Involvement of tubular complexes in pancreatic regeneration after acute necrohemorrhagic pancreatitis." *Pancreas* **6**(3): 298-306.
- Li, J. H., W. Wang, X. R. Huang, M. Oldfield, A. M. Schmidt, M. E. Cooper and H. Y. Lan (2004). "Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway." *Am J Pathol* **164**(4): 1389-97.
- Lillensiek, B., M. A. Weigand, A. Bierhaus, W. Nicklas, M. Kasper, S. Hofer, J. Plachky, H. J. Grone, F. C. Kurschus, A. M. Schmidt, S. D. Yan, E. Martin, E. Schleicher, D. M. Stern, G. G. Hammerling, P. P. Nawroth and B. Arnold (2004). "Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response." *J Clin Invest* **113**(11): 1641-50.
- Logsdon, C. D., M. K. Fuentes, E. H. Huang and T. Arumugam (2007). "RAGE and RAGE ligands in cancer." *Curr Mol Med* **7**(8): 777-89.
- Lue, L. F., D. G. Walker, L. Brachova, T. G. Beach, J. Rogers, A. M. Schmidt, D. M. Stern and S. D. Yan (2001). "Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism." *Exp Neurol* **171**(1): 29-45.
- Malherbe, P., J. G. Richards, H. Gaillard, A. Thompson, C. Diener, A. Schuler and G. Huber (1999). "cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-

- expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein." *Brain Res Mol Brain Res* **71**(2): 159-70.
- Marenholz, I., C. W. Heizmann and G. Fritz (2004). "S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)." *Biochem Biophys Res Commun* **322**(4): 1111-22.
- Muehling, B., A. Kolb, M. Ramadani, E. Schmidt, F. Gansauge and H. G. Beger (2004). "Comparative analysis of extracellular matrix proteins in chronic pancreatitis: differences between pancreatic head and tail." *Pancreas* **28**(2): 174-80.
- Neeper, M., A. M. Schmidt, J. Brett, S. D. Yan, F. Wang, Y. C. Pan, K. Elliston, D. Stern and A. Shaw (1992). "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins." *J Biol Chem* **267**(21): 14998-5004.
- Neuschwander-Tetri, B. A., L. D. Ferrell, R. J. Sukhabote and J. H. Grendell (1992). "Glutathione monoethyl ester ameliorates caerulein-induced pancreatitis in the mouse." *J Clin Invest* **89**(1): 109-16.
- Oldfield, M. D., L. A. Bach, J. M. Forbes, D. Nikolic-Paterson, A. McRobert, V. Thallas, R. C. Atkins, T. Osicka, G. Jerums and M. E. Cooper (2001). "Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE)." *J Clin Invest* **108**(12): 1853-63.
- Park, J. S., F. Gamboni-Robertson, Q. He, D. Svetkauskaite, J. Y. Kim, D. Strassheim, J. W. Sohn, S. Yamada, I. Maruyama, A. Banerjee, A. Ishizaka and E. Abraham (2006). "High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(3): C917-24.
- Park, J. S., D. Svetkauskaite, Q. He, J. Y. Kim, D. Strassheim, A. Ishizaka and E. Abraham (2004). "Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein." *J Biol Chem* **279**(9): 7370-7.
- Park, L., K. G. Raman, K. J. Lee, Y. Lu, L. J. Ferran, Jr., W. S. Chow, D. Stern and A. M. Schmidt (1998). "Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts." *Nat Med* **4**(9): 1025-31.
- Parsa, I., D. S. Longnecker, D. G. Scarpelli, P. Pour, J. K. Reddy and M. Lefkowitz (1985). "Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma." *Cancer Res* **45**(3): 1285-90.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity." *Microbes Infect* **6**(15): 1382-7.
- Raimondi, S., A. B. Lowenfels, A. M. Morselli-Labate, P. Maisonneuve and R. Pezzilli "Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **24**(3): 349-58.
- Roth, J., T. Vogl, C. Sorg and C. Sunderkotter (2003). "Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules." *Trends Immunol* **24**(4): 155-8.
- Ruderman, N. B., J. R. Williamson and M. Brownlee (1992). "Glucose and diabetic vascular disease." *Faseb J* **6**(11): 2905-14.
- Ryckman, C., K. Vandal, P. Rouleau, M. Talbot and P. A. Tessier (2003). "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion." *J Immunol* **170**(6): 3233-42.
- Sachs, U. J. and B. Nieswandt (2007). "In vivo thrombus formation in murine models." *Circ Res* **100**(7): 979-91.

- Sakaguchi, Y., M. Inaba, K. Kusafuka, K. Okazaki and S. Ikehara (2006). "Establishment of animal models for three types of pancreatitis and analyses of regeneration mechanisms." *Pancreas* **33**(4): 371-81.
- Sasaki, N., M. Takeuchi, H. Chowei, S. Kikuchi, Y. Hayashi, N. Nakano, H. Ikeda, S. Yamagishi, T. Kitamoto, T. Saito and Z. Makita (2002). "Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques." *Neurosci Lett* **326**(2): 117-20.
- Schmidt, A. M., M. Hofmann, A. Taguchi, S. D. Yan and D. M. Stern (2000). "RAGE: a multiligand receptor contributing to the cellular response in diabetic vasculopathy and inflammation." *Semin Thromb Hemost* **26**(5): 485-93.
- Schmidt, A. M., R. Mora, R. Cao, S. D. Yan, J. Brett, R. Ramakrishnan, T. C. Tsang, M. Simionescu and D. Stern (1994). "The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide." *J Biol Chem* **269**(13): 9882-8.
- Schmidt, A. M. and D. Stern (2000). "Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection." *Curr Atheroscler Rep* **2**(5): 430-6.
- Schmidt, A. M., M. Vianna, M. Gerlach, J. Brett, J. Ryan, J. Kao, C. Esposito, H. Hegarty, W. Hurley, M. Clauss and et al. (1992). "Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface." *J Biol Chem* **267**(21): 14987-97.
- Schmidt, A. M., S. D. Yan, S. F. Yan and D. M. Stern (2001). "The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses." *J Clin Invest* **108**(7): 949-55.
- Schutte, B. C., J. D. Carpten, A. Forus, S. G. Gregory, A. Horii and P. S. White (2001). "Report and abstracts of the sixth international workshop on human chromosome 1 mapping 2000. Iowa City, Iowa, USA. 30 September-3 October 2000." *Cytogenet Cell Genet* **92**(1-2): 23-41.
- Schwenger, V. (2006). "GDP and AGE receptors: mechanisms of peritoneal damage." *Contrib Nephrol* **150**: 77-83.
- Steinbakk, M., C. F. Naess-Andresen, E. Lingaas, I. Dale, P. Brandtzaeg and M. K. Fagerhol (1990). "Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin." *Lancet* **336**(8718): 763-5.
- Stevens, T., D. L. Conwell and G. Zuccaro (2004). "Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments." *Am J Gastroenterol* **99**(11): 2256-70.
- Strobel, O., M. W. Buchler and J. Werner (2009). "Surgical therapy of chronic pancreatitis: indications, techniques and results." *Int J Surg* **7**(4): 305-12.
- Strobel, O., Y. Dor, J. Alsina, A. Stirman, G. Lauwers, A. Trainor, C. F. Castillo, A. L. Warshaw and S. P. Thayer (2007). "In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia." *Gastroenterology* **133**(6): 1999-2009.
- Strobel, O., Y. Dor, A. Stirman, A. Trainor, C. Fernandez-del Castillo, A. L. Warshaw and S. P. Thayer (2007). "Beta cell transdifferentiation does not contribute to preneoplastic/metaplastic ductal lesions of the pancreas by genetic lineage tracing in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11): 4419-24.
- Strobel, O., D. E. Rosow, E. Y. Rakhlin, G. Y. Lauwers, A. G. Trainor, J. Alsina, C. F. Castillo, A. L. Warshaw and S. P. Thayer (2009). "Pancreatic Duct Glands Are Distinct Ductal Compartments That React to Chronic Injury and Mediate Shh-Induced Metaplasia." *Gastroenterology*.

- Taguchi, A., D. C. Blood, G. del Toro, A. Canet, D. C. Lee, W. Qu, N. Tanji, Y. Lu, E. Lalla, C. Fu, M. A. Hofmann, T. Kislinger, M. Ingram, A. Lu, H. Tanaka, O. Hori, S. Ogawa, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2000). "Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases." *Nature* **405**(6784): 354-60.
- Toskes, P. P. (1995). "Medical management of chronic pancreatitis." *Scand J Gastroenterol Suppl* **208**: 74-80.
- Treutiger, C. J., G. E. Mullins, A. S. Johansson, A. Rouhiainen, H. M. Rauvala, H. Erlandsson-Harris, U. Andersson, H. Yang, K. J. Tracey, J. Andersson and J. E. Palmblad (2003). "High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium." *J Intern Med* **254**(4): 375-85.
- Wang, H., O. Bloom, M. Zhang, J. M. Vishnubhakat, M. Ombrellino, J. Che, A. Frazier, H. Yang, S. Ivanova, L. Borovikova, K. R. Manogue, E. Faist, E. Abraham, J. Andersson, U. Andersson, P. E. Molina, N. N. Abumrad, A. Sama and K. J. Tracey (1999). "HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice." *Science* **285**(5425): 248-51.
- Wang, H., H. Yang and K. J. Tracey (2004). "Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis." *J Intern Med* **255**(3): 320-31.
- Wendt, T. M., N. Tanji, J. Guo, T. R. Kislinger, W. Qu, Y. Lu, L. G. Bucciarelli, L. L. Rong, B. Moser, G. S. Markowitz, G. Stein, A. Bierhaus, B. Liliensiek, B. Arnold, P. P. Nawroth, D. M. Stern, V. D. D'Agati and A. M. Schmidt (2003). "RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy." *Am J Pathol* **162**(4): 1123-37.
- Willemer, S. and G. Adler (1989). "Histochemical and ultrastructural characteristics of tubular complexes in human acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* **34**(1): 46-55.
- Yamamoto, Y., I. Kato, T. Doi, H. Yonekura, S. Ohashi, M. Takeuchi, T. Watanabe, S. Yamagishi, S. Sakurai, S. Takasawa, H. Okamoto and H. Yamamoto (2001). "Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice." *J Clin Invest* **108**(2): 261-8.
- Yan, S. D., X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Migheli, P. Nawroth, D. Stern and A. M. Schmidt (1996). "RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease." *Nature* **382**(6593): 685-91.
- Yan, S. D., H. Zhu, A. Zhu, A. Golabek, H. Du, A. Roher, J. Yu, C. Soto, A. M. Schmidt, D. Stern and M. Kindy (2000). "Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis." *Nat Med* **6**(6): 643-51.
- Yan, S. F., R. Ramasamy, Y. Naka and A. M. Schmidt (2003). "Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond." *Circ Res* **93**(12): 1159-69.
- Yang, D., Q. Chen, H. Yang, K. J. Tracey, M. Bustin and J. J. Oppenheim (2007). "High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin." *J Leukoc Biol* **81**(1): 59-66.
- Yang, H., H. Wang, C. J. Czura and K. J. Tracey (2005). "The cytokine activity of HMGB1." *J Leukoc Biol* **78**(1): 1-8.
- Yu, J. H., J. W. Lim and H. Kim (2009). "Altered gene expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells: pathologic mechanism of acute pancreatitis." *Korean J Physiol Pharmacol* **13**(6): 409-16.

8 Anhang

8.1 Material

8.1.1 Geräte und Software

Analysenwaage Mettler AM100	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Fast Prep FP 120 Ribolyzer	Thermo Electronics Corp., Dreieich
Gewebeeinbettmaschine Leica EG 1140H	Leica, Bensheim
Gewebeentwässerung Leica ASP 300	Leica, Bensheim
Lichtmikroskop	Leica, Bensheim
Light Cycler Apparat	Roche Applied Science, Mannheim
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrotom JUNG RM 2055	Leica, Bensheim
Mikrowellengerät	Quelle, Fürth
Mini Spin (Tischzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg
OP Lichtmikroskop Leica WILD M 691	Leica, Bensheim
Pipetten 1000, 200, 100, 20, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Schermaschine	Aesculap, Tuttlingen
Streckungsbad	Medax, Redsburg
Thermocycler	Biotron, Göttingen, Deutschland
Vortex	Heidolph, Schwabach
Waage	Waagen Friederichs, Heidelberg
Wärmebad	Lauda, Groton, CT, USA
Wasserbad 42 °C	Medax, Redsburg
Wasserbad Thermolab	Thermo Electron, Dreieich

8.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
EDTA Röhrchen	SARSTEDT, Nümbrecht

Eppendorf® 1,5 ml Röhrchen	Eppendorf AG, Hamburg
Faden nicht-resorbierbar monofil, Prolene	BD Biosciences, Heidelberg
Faden resorbierbar geflochten, Vicryl	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebeeinbettkassette	Neolab, Heidelberg
Kanülen 23G, 24G	BD Biosciences, Heidelberg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
PAP-Pen	DakoCytamation, Glostrup, Dänemark
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen 1 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Sterile Mullkompressen 5 x 5 cm	Fink und Walter, Merchweiler
Wägepapier	Neolab, Heidelberg

8.1.3 Chemikalien und Reagenzien

ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Alcian Blue 8 G	Roth, Karlsruhe
Aqua destillata	Braun, Melsungen
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Calcium Chlorid	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
DAB, SK4100 Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Demaskierungslösung C	Biologo, Kronshagen
Konzentrat auf Citrat- Basis	
Eosin G	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70%ig, vergällt	Roth, Karlsruhe
Flüssigstickstoff	TMG Sol Group, Gersthofen
Haematoxylin	Merck, Darmstadt
Kaliumjodid	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	Roth, Karlsruhe
MagNA Pure Isolierungskit	Roche Applied Science, Mannheim
Mayers Haemalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOM Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge 1 N / 2 N	Merck, Darmstadt
Normal Ziege Serum (10%)	KPL, Gaithersburg, USA
Normal Kaninchen Serum (10%)	KPL, Gaithersburg, USA
Periodsäure	Merck, Darmstadt
Permout®	Fisher, Kehl
Potassium iodide (Kaliumiodid)	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
RNA-Later	Quiagen, Hilden
Roticlear®	Roth, Karlsruhe
Roti-Histofix 4%®	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 1 N / 5 N	Merck, Darmstadt
Salzsäure 2 N	Roth, Karlsruhe
Schiff'sche Reagenz	Roth, Karlsruhe
Toluidinblau	Merck Bioscience, Schwalbach
Tris-Pufferan	Roth, Karlsruhe
TRIS hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Tween® -20	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Urea	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe

8.1.4 Puffer und Lösungen

Citratpuffer pH-Wert 6

30 ml	Demaskierungslösung C
270 ml	VE- Wasser

Ureapuffer pH-Wert 9,5

12,11 g (0,1 M)	Tris-Pufferan
50 g (5%)	Urea (Harnstoff)

pH-Wert 9,5 mit Natronlauge 1N einstellen, dann auf 1 l mit VE-Wasser auffüllen

10 x TBS pH-Wert 7,5

157,6 g (1 M) Tris-HCL

87,66 g (1,5 M) NaCl

in 600 ml VE-Wasser gelöst, den gewünschten pH-Wert eingestellt und auf 1000 ml mit VE-Wasser aufgefüllt

TBS

100 ml 10 x TBS pH-Wert 7,5

900 ml VE-Wasser

TBST (0,05% Tween)

999,5 ml TBS

0,5 ml Tween 20

TBS / 0,1% BSA

100 ml 10 x TBS pH-Wert 7,5

1 g BSA

mit VE-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt

TBST (0,05% Tween) / 0,1% BSA

999,5 ml TBS / 0,1% BSA

0,5 ml Tween 20

Alcian Blue pH-Wert 2,5 (Alcianblau-Lösung)

1,5 g Calcium Chloride

3 g Alcian Blue 8 G

300 ml VE-Wasser

zuerst CaCl dann Alcian Blue in 300 ml VE-Wasser aufgelöst, pH-Wert eingestellt mit Salzsäure 1 N, danach filtriert

Eosin

1 g Eosin

200 ml Ethanol 96%

4 Tropfen Essigsäure 100%

Essigsäure 3%

6 ml Essigsäure
194 ml VE-Wasser

Natriumacetat (0,2 M)

0,544 g Natriumacetat
20 ml Aqua bidest

Natriumchlorid 1%

0,5 g Natriumchlorid
50 ml VE-Wasser

Natriumhydrogencarbonat 0,3%

0,6 g Natriumhydrogencarbonat
auf 200 ml mit VE-Wasser aufgefüllt

Perjodsäurelösung

1,6 g Perjodsäure
40 ml VE-Wasser
gemischt und dazu
20 ml Natriumacetat (0,2 M)
140 ml Ethanol 95%

immer frisch herstellen

Reducing Rinse Lösung

4 g Kaliumjodid
4 g Natriumthiosulfat
80 ml VE-Wasser
gemischt und dazu
120 ml Ethanol 95%
2 ml 2 N Salzsäure

immer frisch herstellen

Toluidinblau Stock Lösung

1 g Toluidinblau
100 ml Ethanol 70%

Toluidinblau Arbeitslösung pH-Wert 2,0- 2,5

20 ml Toluidinblau Stock Lösung
180 ml Natriumchlorid 1%, pH-Wert 2,3

8.1.5 Antikörper

Primärantikörper

AGER (LS-C33936)	Lifespan, Seattle WA, USA
α SMA, Kaninchen (ab5694)	Abcam, Cambridge, UK
Collagen I (ab34710)	Abcam, Cambridge, UK
Insulin (2D11-H5), sc-8033	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Ki-67 (clone Tec 3)	DakoCytamation, Glostrup, Dänemark

Sekundärantikörper

Anti Kaninchen, K4003 EnVision+/HRP Rabbit	DakoCytamation, Glostrup, Dänemark
Anti Kaninchen, K4002	DakoCytamation, Glostrup, Dänemark
Anti Kaninchen, pK-6101	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti Maus, pk-6102	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti Maus, K4000 EnVision+/HRP Mouse	DakoCytamation, Glostrup, Dänemark
Anti Ratte, pk-6104	Vector Laboratories, Burlingame, USA

8.1.6 Medikamente

Cutasept F	Bode, Hamburg
Ketanest S® (Wirkstoff: Ketamin)	Pfizer, Karlsruhe
Rompun 2%® (Wirkstoff: Xylazin)	Bayer Vital, Leverkusen
Takus 40 µg® (Wirkstoff: Ceruletid)	Pfizer, Karlsruhe
Temgesic® (Wirkstoff: Buprenorphin)	Essex Pharma, München
Isotonische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen

Ceruleininjektionslösung

2 ml	Takus 40 µg®
8 ml	NaCl 0,9%

Injektion: 0,1 ml pro 10 g KGW

Narkoseinjektionslösung

Rompun 2% Verdünnung 1:25

0,1 ml	Rompun 2%®
2,4 ml	NaCl 0,9%

Narkoseinjektionslösung

0,45 ml	Rompun 2%® Verdünnung 1:25
0,55 ml	Ketanest S®

Narkose: 0,1 ml Narkoseinjektionslösung pro 10 g KGW i.p.

Analgetikum

Temgesic Verdünnung 1:24

0,1 ml	Temgesic®
2,3 ml	NaCl 0,9%

Analgetikum: 0,1 ml Temgesic® Verdünnung 1:24 pro Maus s.c. (subcutan)

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. vet. Wolfgang Schmahl, für seine Unterstützung bei der Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. W. Büchler, dass es möglich war die Arbeit an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie durchzuführen.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Werner für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung.

Mein persönlicher Dank gilt besonders Herrn PD Dr. med. Oliver Strobel, der mich während der Entstehung dieser Arbeit betreute. Er lehrte mich wissenschaftliches Arbeiten und Denken und brachte mir die zur Durchführung der Experimente notwendigen Techniken bei. Er stand mir bei der Interpretation der Ergebnisse hilfsbereit zur Seite und trug auf diese Weise entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors des Europäischen Pankreasforschungszentrum Heidelberg, die durch ihre Arbeit und ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein herzlicher Dank gebührt Frau Karin Ruf für die zuverlässige Einweisung in die verschiedenen wissenschaftlichen Methoden und ihre immer freundliche Hilfe im Laboralltag.

Besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. med. Frank Bergmann für die kompetente und freundliche Hilfestellung bei histopathologischen Fragestellungen und Auswertungen.

Bei all den lieben Kollegen und Mitdoktoranden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen, bedanke ich mich herzlich.

Insbesondere möchte ich hier Frau Myrto Logothetis, Herrn Simon Welsch und Frau Alexandra Friske nennen.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie, besonders meinen Eltern die mir dieses Studium, und damit eine Promotion, erst ermöglicht haben. Vielen Dank an meine Eltern, meine Schwester und meinen Freund für ihre unerschöpfliche Geduld, für den familiären Rückhalt und die zuverlässige Unterstützung in jeder Hinsicht.