

**Die Cystatin C-Hemmung von Cathepsin B ist ein
entscheidender Schutzmechanismus des Pankreas gegen
die Wirkung von vorzeitig aktivierten Verdauungsenzymen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Jana Marielle Modenbach

Greifswald, den 18.05.2021

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Gerald Kerth

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Bornscheuer

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus M. Lerch

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Patrick Michl

Tag der Promotion: 27.09.2021

***„Logik bringt dich von A nach B. Deine Phantasie
bringt dich überall hin.“ – Albert Einstein***

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	HINTERGRUND UND WISSENSSTAND	3
2.1.1	<i>Das Pankreas.....</i>	3
2.1.2	<i>Die Pankreatitis</i>	4
2.1.2.1	Akute Pankreatitis.....	5
2.1.2.2	Chronische Pankreatitis	6
2.1.3	<i>Pankreatische Proteasen & deren Rolle in der Pankreatitis</i>	7
2.1.4	<i>Cathepsine & seine Inhibitoren</i>	12
2.1.4.1	Cathepsin B & seine Rolle in der Protease-Aktivierung.....	15
2.1.4.2	Inhibitoren des Cathepsin B	19
2.2	ZIEL- UND AUFGABENSTELLUNG.....	21
3	MATERIAL UND METHODEN.....	22
3.1	MATERIAL.....	22
3.1.1	<i>Antikörper.....</i>	22
3.1.2	<i>Enzyme und Inhibitoren.....</i>	23
3.1.3	<i>Substrate.....</i>	23
3.1.4	<i>Chemikalien.....</i>	24
3.1.5	<i>Kits</i>	26
3.1.6	<i>Allgemeine Puffer, Medien und Lösungen</i>	27
3.1.7	<i>Geräte & Arbeitsmaterialien.....</i>	29
3.1.7.1	Geräte.....	29
3.1.7.2	sonstige Arbeitsmaterialien	31
3.1.8	<i>Tierstämme</i>	32
3.1.9	<i>Software</i>	32
3.2	METHODEN.....	33
3.2.1	<i>Tierhaltung & Genotypisierung</i>	33
3.2.2	<i>Induktion einer Caerulein Pankreatitis</i>	33
3.2.2.1	Akute Pankreatitis.....	33
3.2.2.2	Chronische Pankreatitis	33
3.2.3	<i>Histologische Methoden</i>	34
3.2.3.1	Fixierung von Geweben	34
3.2.3.2	Hämatoxylin & Eosin Färbung.....	34
3.2.3.3	Masson-Goldner Färbung	35

3.2.3.4	Azan nach Heidenhain.....	35
3.2.3.5	Immunofluoreszenz Färbung	36
3.2.3.6	TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)- Assay	36
3.2.4	<i>Enzymatische Methoden</i>	37
3.2.4.1	Gewebevorbereitung für die Enzymatische Aktivitätsmessung.....	37
3.2.4.1.1	Gewinnung von Pankreas- und Azinuszellhomogenaten.....	37
3.2.4.1.2	Subzelluläre Fraktionierung.....	37
3.2.4.2	Enzymatische Aktivitätsmessungen	38
3.2.4.3	Bestimmung der Amylase- und Lipase-Aktivität im Serum	38
3.2.4.4	Myeloperoxidase (MPO)-Bestimmung in Lunge	39
3.2.4.5	Präparation lebender Azini.....	39
3.2.4.6	Messung intrazellulärer Proteaseaktivität in lebenden Azini	40
3.2.5	<i>Proteinchemische Methoden</i>	41
3.2.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford.....	41
3.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Kit.....	41
3.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.2.5.4	Proteintransfer mittels Immunoblotting (Western Blot)	42
3.2.5.5	Coomassie-Färbung	43
3.2.6	<i>In vitro Experimente</i>	43
3.2.6.1	Degradation von Cystatin C durch Trypsin.....	43
3.2.6.2	Enzymatische Aktivitätsmessung von CTSB und CTSL mit Trypsin und degradierten Cystatin C.....	44
3.2.7	<i>Statistische Analyse</i>	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	LOKALISIERUNG VON CYSTATIN C UND AKTIVEM CTSB IM SEKRETORISCHEN KOMPARTIMENT.....	45
4.2	SUBZELLULÄRE UMVERTEILUNG PANKREATISCHER PROTEASEN	48
4.3	DEGRADATION VON CYSTATIN C DURCH TRYPSIN STABILISIERT DIE CATHEPSIN B- AKTIVITÄT	52
4.4	EXPRESSION VON CYSTATIN C IM PANKREASHOMOGENAT.....	58
4.5	SUBZELLULÄRE UMVERTEILUNG IN WILDTYP UND CYSTATIN C-DEFIZIENTEN MÄUSEN IN DER AKUTEN PANKREATITIS.....	61
4.6	CYSTATIN C IN ISOLIERTEN AZINUSZELLEN	63
4.7	EINFLUSS VON CYSTATIN C AUF DEN SCHWEREGRAD DER AKUTEN UND CHRONISCHEN PANKREATITIS	66

5	DISKUSSION	72
5.1	DIE ROLLE VON CYSTATIN C AUF DIE LYSOSOMALE HYDROLASE CTSB.....	72
5.2	CYSTATIN B – CYTOSOLISCHE INHIBITION VON CATHEPSIN B	74
5.3	CYSTATIN C – INHIBITION VON CATHEPSIN B IM SEKRETORISCHEN KOMPARTIMENT ...	76
5.4	DIE DELETION VON CYSTATIN C IM MAUSMODELL DER AKUTEN UND CHRONISCHEN PANKREATITIS	79
5.5	AUSBLICK UND RELEVANZ	83
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	85
7	TABELLENVERZEICHNIS	89
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	90
9	LITERATURVERZEICHNIS	92
10	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	107
11	LEBENS LAUF	108
12	VERÖFFENTLICHUNGEN & ABSTRACTS	109
12.1	PUBLIKATIONEN	109
12.2	KONGRESSBEITRÄGE UND ABSTRACTS	109
13	PREISE	111
14	DANKSAGUNG	112
15	FÖRDERHINWEIS	113

1 Zusammenfassung

Die akute Pankreatitis ist durch eine vorzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymen noch innerhalb der Azinuszellen gekennzeichnet. Die lysosomale Hydrolase Cathepsin B (CTSB) spielt hierbei eine entscheidende Rolle, indem sie Trypsinogen zu Trypsin aktiviert. Für die Trypsinogenaktivierung durch CTSB ist eine Co-Lokalisierung beider Enzyme innerhalb desselben subzellulären Kompartiments erforderlich. Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der CTSB-Aktivität durch den Cysteinprotease-Inhibitor Cystatin C im Verlauf der akuten und chronischen Pankreatitis näher zu untersuchen.

Subzelluläre Fraktionierungsexperimente zeigten eine deutliche Lokalisation von Cystatin C und aktiven Cathepsin B im sekretorischen Kompartiment muriner Azinuszellen. Immunofluoreszenzfärbungen zeigten ebenfalls, dass Cystatin C zusammen mit der pankreatischen Amylase im sekretorischen Kompartiment von Azinuszellen lokalisiert ist. Auch in humanen Probenmaterial konnten wir zeigen, dass Cystatin C im sekretorischen Kompartiment lokalisiert ist und auch sekretiert wird. Experimente mit rekombinanten Proteinen zeigten eine deutliche pH-abhängige inhibitorische Wirkung von Cystatin C auf Cathepsin B. Unter sauren pH Bedingungen dimerisiert Cystatin C und ist somit nicht mehr in der Lage die Aktivität von CTSB zu inhibieren. Weiterhin konnten wir zeigen, dass aktives Trypsin Cystatin C prozessiert. Bei dieser Spaltung entsteht ein Cystatin C-Fragment, welches nicht mehr in der Lage ist, CTSB zu inhibieren, sondern vielmehr die auto-inhibitorische Kapazität von Cathepsin B unterbindet und somit die Aktivität stabilisiert. Neben Cystatin C wird in Azinuszellen auch Cystatin B exprimiert, ein weiterer Inhibitor der Cystein-Proteasen. Im Gegensatz zu Cystatin C ist Cystatin B exklusiv im cytosolischen Kompartiment der Azinuszelle lokalisiert. Dies ist wahrscheinlich ein Schutzmechanismus, welcher die Zelle vor einer cytosolischen Cathepsin-Aktivität schützen soll. Die genetische Deletion von Cystatin C im Mausmodell der akuten Pankreatitis führte zu einer erhöhten Aktivität sekretorischer Proteasen in Azinuszellen, sowie im Gesamthomogenat und in subzellulären Fraktionen. Dementsprechend zeigte sich auch ein deutlich erhöhter Schweregrad in der akuten und chronischen Pankreatitis.

Unsere Experimente lassen vermuten, dass die Aktivität von Cathepsin B unter physiologischen Bedingungen durch Cystatin C unterbunden wird, um so eine verfrühte Aktivierung des Trypsinogens zu verhindern. Im Verlauf der Pankreatitis wird dieser protektive Mechanismus jedoch überwunden. Die Aktivität von Cathepsin B steigt deutlich in der schweren Zymogengranula-Fraktion an, trotz der Präsenz von Cystatin C.

Zusammenfassend lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass prozessiertes (aktives) Cathepsin B selbst unter physiologischen Bedingungen im sekretorischen Kompartiment von Azinuszellen bereits vorhanden ist. Seine Aktivität wird dort durch Cystatin C inhibiert,

Zusammenfassung

wodurch eine vorzeitige, durch CTSB induzierte Trypsinogenaktivierung verhindert wird. Die Ansäuerung der sekretorischen Vesikel, wie bei der Pankreatitis, verringert die CTSB-Hemmung durch Cystatin C, während es gleichzeitig zu einer Cystatin C-Degradation durch Trypsin kommt. Dies ermöglicht eine verlängerte und pH-unempfindliche Protease-Aktivierung über CTSB in der Anfangsphase der Pankreatitis. Cystatin C spielt somit eine wesentliche Rolle für die Regulation der CTSB-Aktivität im sekretorischen Kompartiment von Azinuszellen und stellt damit einen entscheidenden pathophysiologisch relevanten Mechanismus für die akute und chronische Pankreatitis dar.

2 Einleitung

2.1 Hintergrund und Wissensstand

2.1.1 Das Pankreas

Das Pankreas, auch Bauchspeicheldrüse genannt, ist ein retroperitoneales Organ im oberen Bauchraum mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 70-80 g und einer Größe von ca. 13-18 cm. Es besteht aus Kopf (Caput pancreatis), Körper (Corpus pancreatis) und Schwanz (Cauda pancreatis) und sekretiert ca. 1,5-2 L Pankreassaft (enzymreicher, alkalischer Verdauungssaft) pro Tag in das Duodenum¹. Des Weiteren ist es neben dem Duodenum mit weiteren abdominalen Organen wie der Milz, dem Magen und dem Colon verbunden (Abb. 1).

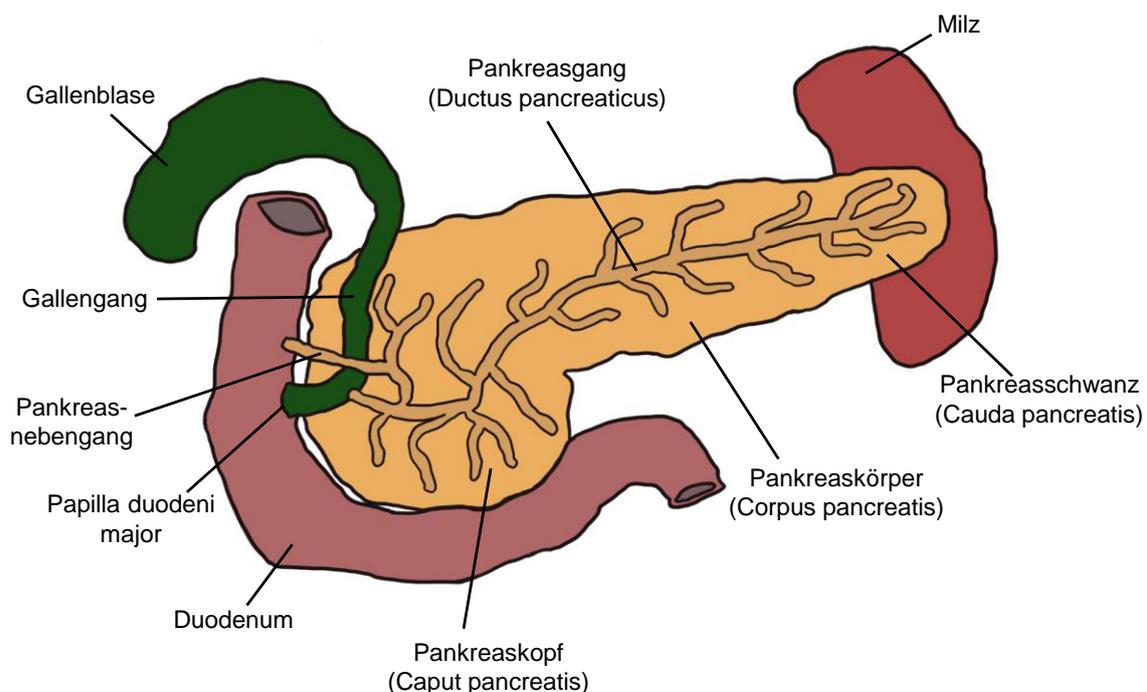


Abb. 1: Schematische Darstellung des Pankreas und seine Lage im menschlichen Körper. Der Pankreaskopf wird vom Duodenum umschlossen, verjüngt sich in Richtung des Pankreasschwanzes und grenzt dort an die Milz. Der große Gallengang und der Pankreasgang (Ductus pancreaticus) münden gemeinsam in die prominente Schleimhautfalte im Duodenum (Papilla duodeni major) und entleeren dort die Galle bzw. das Pankreassekret in das Duodenum.

Das Pankreas ist das essenzielle Organ für den Nährstoffmetabolismus und besitzt eine endokrine, sowie exokrine Drüsenfunktion. Die endokrine Drüse (ca. 2 % der Organmasse) besteht aus mehreren endokrinen Zelltypen (α -, β -, δ -, PP-, ϵ -Zellen), welche sich in

Zellclustern zu den sogenannten Langerhans-Inseln in den Pankreasläppchen zwischen den Azini zusammenlagern. In ihrer Gesamtheit werden die Langerhans-Inseln als Inselorgan bezeichnet und sind für die Regulation der Glucose-Homöostase durch Sezernierung von Hormonen (Insulin, Glucagon, Somatostatin, Pankreatisches Polypeptid, Ghrelin) in den Blutkreislauf verantwortlich. Die exokrine Drüse macht die Hauptmasse des Organs aus und ist eine seröse (wässrige) Drüse mit azinösen Endstücken. Das Parenchym ist aus Lappen und Läppchen, sogenannte Lobuli, aufgebaut. Die Lobuli bestehen aus vielen prismatischen bzw. pyramidenförmigen Azinuszellen, welche zu kreisförmigen Azinus-Komplexen zusammengelagert sind. Diese Azinuszell-Komplexe bestehen aus 15 bis 100 einzelnen Azinuszellen, welche polarisiert sind. Sie sind durch einem basolateralen Abschnitt, einem apikalen Pol und einem zentral liegenden Zellkern gekennzeichnet. Dabei besteht der basolaterale Abschnitt vor allem aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum (RER), welches für die Enzymproduktion zuständig ist. In der apikalen Region sind der Golgi-Apparat und die Zymogengranula, welche inaktive Enzymvorläufer enthalten, lokalisiert ². An der luminalen Oberfläche sind die Azinuszellen durch apikale *tight junctions* (dichte Zellkontakte) verbunden und an der basalen Oberfläche werden sie von einer Basallamina gestützt ^{3,4}. Erfolgt ein Stimulus, werden die sekretorischen Granula durch Exozytose ins Azinulumen entleert. Die Hauptfunktion der exokrinen Drüse ist die Bildung des Bauchspeichelsekrets. Dieses Sekret enthält kohlenhydrat- (α -Amylase) und fettspaltende (Lipase) Enzyme, sowie proteolytische Proenzyme (Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Pro-Elastase, Pro-Carboxypeptidasen), aber auch RNAsen und DNAsen. Durch die Anreicherung des Sekrets mit Bicarbonat über die pankreatischen Gangzellen hat der Pankreassaft einen alkalischen pH-Wert (zur Neutralisierung des sauren Mageninhalts) ². Das Vorliegen der eiweißspaltenden Enzyme in einer inaktiven Vorstufe (Zymogene) dient als Schutzmechanismus des Pankreas vor der Autodigestion (Selbstverdau). Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Aktivierung der Pro-Enzyme außerhalb des Pankreas. Der Pankreassaft gelangt über den Ductus pancreaticus (Pankreasgang) in das Duodenum. Hier wird, durch die am Bürstensaum gebildete Enterokinase (membran-ständige Enteropeptidase), das inaktive Trypsinogen durch Abspaltung einer Peptidkette in aktives Trypsin umgewandelt. Trypsin ist in der Lage weitere Proenzyme zu aktivieren.

2.1.2 Die Pankreatitis

Die Pankreatitis ist eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Sie wird in zwei verschiedenen Verlaufsformen unterteilt: der akuten Pankreatitis und der chronischen Pankreatitis ⁵. Die häufigsten Ursachen für eine akute Pankreatitis sind Alkoholabusus und

genetische Faktoren, wobei sich die chronische Pankreatitis durch wiederkehrende Schübe manifestiert.

2.1.2.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist eine primär sterile Entzündungsreaktion des Pankreas. Die häufigsten Symptome sind ein akuter abdominaler Schmerz, begleitet von einer erhöhten Serum Lipase Konzentrationen. In den meisten Fällen nimmt die Pankreatitis einen milden sich selbst limitierenden Verlauf. In 20 % der Fälle kommt es jedoch zu einem moderaten oder schweren Krankheitsverlauf mit lokalen und systemischen Komplikationen, wie z.B. einer infizierten Pankreasnekrose und/oder multiples Organversagen ⁶. Die akute Pankreatitis wird durch eine vorzeitige Aktivierung der pankreatischen Verdauungsenzyme noch innerhalb des Pankreas ausgelöst, wodurch es zu einer enzymatischen Zerstörung der Azinuszellen kommt. Dies definierte erstmals der deutsch-österreichische Pathologe Hans Chiari 1896 als den Selbstverdau des Pankreas durch seine eigenen Enzyme ⁷. Die globale Inzidenz für die akute Pankreatitis liegt bei 34 je 100.000 Einwohner pro Jahr, wobei Männer und Frauen gleichermaßen betroffen sind ⁸. Jedoch variiert die Inzidenz innerhalb der Welt stark. Die europäischen Länder gehören zu den Ländern mit einer geringen Inzidenz von 29 je 100.000 Einwohner pro Jahr für die akute Pankreatitis ⁹. Die zwei häufigsten Ursachen sind zu einem der Verschluss des Pankreasgangs durch Gallensteine ¹⁰ sowie akuter Alkoholabusus ¹¹. Andere seltener Ursachen können Rauchen, Diabetes mellitus Typ 2, abdominales Trauma, Hypertriglyceridämie, Hypercalcämie, Autoimmunerkrankungen wie Zöliakie oder Infektionen sein. Des Weiteren wird beschrieben, dass es auch im Anschluss einer endoskopischen retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) zu einer sogenannten Post-ERCP Pankreatitis kommen kann ^{5,12}. Bei 15-25 % ist die Ursache der Pankreatitis unbekannt ¹³. Bisher sind auch einige Medikamente beschrieben, die eine akute Pankreatitis auslösen können ¹⁴. Dazu zählen z.B. Tetrazykline ¹⁵, orale Glukokortikoide ¹⁶, sowie ACE-Hemmer und Calciumkanalblocker ¹⁷. Ein großer Anteil der Patienten erholt sich wieder von einer akuten Pankreatitis, dennoch gibt es eine große Anzahl von Patienten, die eine chronische Pankreatitis entwickeln ¹⁸. Bisher gibt es noch keine nachhaltig wirksame Therapie. Demzufolge ist die Untersuchung für neue Therapieansätze für die Pankreatitis von bedeutender Wichtigkeit.

2.1.2.2 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis wird klinisch als eine meist schubweise, steril verlaufende chronische Entzündung der Bauchspeicheldrüse definiert. Sie verursacht anhaltende sowie oft fortschreitende und irreversible morphologische Veränderungen, die typischerweise durch abdominelle Schmerzen und eine dauerhaft beeinträchtigte Pankreasfunktion begleitet ist. Die Inzidenz liegt bei 5 bis 14 pro 100.000 Einwohner, wobei die Prävalenz (ca. 30-50 pro 100.000 Einwohner) der chronischen Pankreatitis mit dem Alter zunimmt^{5,19-24}. Das mittlere Alter bei der Diagnose liegt zwischen 51 und 58 Jahren^{20,23,25-27}. Eine frühere Erkrankung, wie z.B. im Kindesalter, ist meist auf genetische Risikofaktoren zurückzuführen^{28,29}. Die häufigste Ursache für eine chronische Pankreatitis ist ein jahrelanger Alkoholabusus³⁰. Histologisch gesehen kommt es bei einer chronischen Pankreatitis zu Fibrosen des Parenchyms, Obstruktion des Pankreasganges durch Pankreassteine, Gewebeverkalkung sowie die Entwicklung von Pseudozysten³¹. Im weiteren Verlauf führt es zu einem Verlust der endokrinen und exokrinen Funktion des Pankreas aufgrund von Atrophie und/oder Ersatz durch fibrotisches Gewebe. Zu den funktionellen Folgen gehören wiederkehrende oder persistierende Bauchschmerzen, Diabetes mellitus (endokrine Insuffizienz)³² und Maldigestion (exokrine Insuffizienz)^{33,34}. Es wird angenommen, dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren zur Pathogenese der chronischen Pankreatitis beitragen. Zu den möglichen Umweltfaktoren gehören metabolisch-toxische Faktoren wie Alkohol oder Rauchen³⁰. Hier konnte gezeigt werden, dass es durch Rauchen und Alkoholkonsum zu einem erhöhtem ER-Stress in Azinuszellen kommt und somit die Ursache für die Pankreatitis sein kann³⁵⁻³⁷. Jedoch können auch eine rezidivierende/schwere akute Pankreatitis, idiopathische Mechanismen, genetische Veränderungen, Autoimmunreaktionen und obstruktive Mechanismen zu einer chronischen Pankreatitis führen^{38,39}. Die vorzeitige Aktivierung der Verdauungsenzyme innerhalb des Pankreas hat eine enorme Bedeutung für die Entstehung der Pankreatitis. Dies zeigt sich auch in den genetischen Ursachen der hereditären Pankreatitis. Die wichtigsten Mutationen, welche mit einem erhöhten Risiko an chronischer Pankreatitis zu erkranken assoziiert sind, liegen in Genen, die direkt oder indirekt mit der Proteasekaskade im Zusammenhang stehen. Dabei konnten mehrere autosomal-dominant vererbte Mutationen im PRSS1-Gen des kationischen Trypsinogens sowie Mutationen in weiteren regulatorischen Proteinen, wie z.B. dem SPINK-1 (Serine peptidase inhibitor kazal type 1), dem Chymotrypsin C (CTRC), der Carboxypeptidase A1 (CPA1) und der pankreatischen Elastase, gefunden werden⁴⁰⁻⁴⁴. SPINK-1 spielt eine wichtige Rolle als Inhibitor für aktives Trypsin, während CTCRC Trypsinogen Ca^{2+} -abhängig aktivieren oder degradieren kann. Seit 1996 sind mehr als 35 verschiedene Mutationen im PRSS1-Gen entdeckt worden, welche mit der hereditären

Pankreatitis assoziiert werden. Dabei sind R122H, R122C, N29I und A16V die vier häufigsten Mutationen im PRSS1-Gen⁴⁵⁻⁴⁷. Die am häufigsten auftretende Mutation im SPINK-1-Gen, welche mit einer chronischen Pankreatitis assoziiert wird, ist die N43S Variante^{41,48}. Des Weiteren konnten auch Mutationen im CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) nachgewiesen werden⁴⁹. CFTR ist ein Chlorid-Kanal, welcher durch das 3',5'-cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) reguliert wird. Er ist an der apikalen Plasmamembran von Pankreasgangzellen lokalisiert und spielt für die Bicarbonat Sekretion eine wichtige Rolle⁵⁰. Bisher sind noch nicht alle pathophysiologischen Mechanismen der einzelnen Mutationen vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass neben einer erhöhten Proteaseaktivität, auch ER-Stress durch Proteinefehlfaltungen in den Verdauungsenzymen eine Rolle spielt^{51,52}. Da die Azinuszellen eine der höchsten Proteinsyntheseraten (nur 20 Proteine für ca. 50 % der Syntheserate zuständig) im menschlichen Körper haben, kann es durch Proteinefehlfaltungen zu einem erhöhten ER-Stress Level in den Azinuszellen kommen. Dies resultiert final in einer Schädigung der Zellen. Fehlfaltungsmutationen in den Verdauungsenzymen können zu einem großen Stressfaktor im ER werden, da die Rückfaltungs- und Degradationsmechanismen mit der immer größer werdenden Menge an fehlgefalteten Proteinen überfordert sind^{52,53}. Bereits bekannte Genmutationen, welche mit erhöhtem ER-Stress und einer chronischen Pankreatitis assoziiert sind, befinden sich in der Carboxylesterlipase (CEL) oder auch im CPA1⁵⁴⁻⁵⁶.

2.1.3 Pankreatische Proteasen & deren Rolle in der Pankreatitis

Die exokrine Drüse des Pankreas sekretiert eine Vielzahl von Verdauungsenzymen (Proteasen, Lipasen und α -Amylase) für den Nahrungsaufschluss im Duodenum. Daher stellt die vorzeitige Aktivierung noch innerhalb des Pankreas eine große Gefahr dar. Unter physiologischen Bedingungen werden die pankreatischen Proteasen als inaktive Vorstufen (Zymogene) in der Azinuszelle in Form von Zymogengranula gespeichert und sekretiert. Im Zuge der Pankreatitis kommt es zu einer verfrühten Aktivierung dieser Proteasen im Pankreas bzw. in der Azinuszelle, wodurch es zu einem Selbstverdau der Azinuszellen und schließlich zu deren Zelltod kommt. Hierbei ist die pankreatische Serinprotease Trypsin von entscheidender Bedeutung. Trypsin wird als inaktives Trypsinogen in der Azinuszelle sekretiert und unter physiologischen Bedingungen durch das Bürstensaumenzym Enterokinase im Duodenum proteolytisch prozessiert⁵⁷. Durch die Abspaltung des Trypsin-Aktivierungs-Peptid (TAP) wird das katalytisch aktive Trypsin frei. Anschließend aktiviert Trypsin alle weiteren Enzymen wie Pro-Elastase, Chymotrypsinogen, Pro-Carboxypeptidase und Pro-Phospholipase A2^{57,58} (Abb. 2).

**Physiologisch:
im Duodenum**

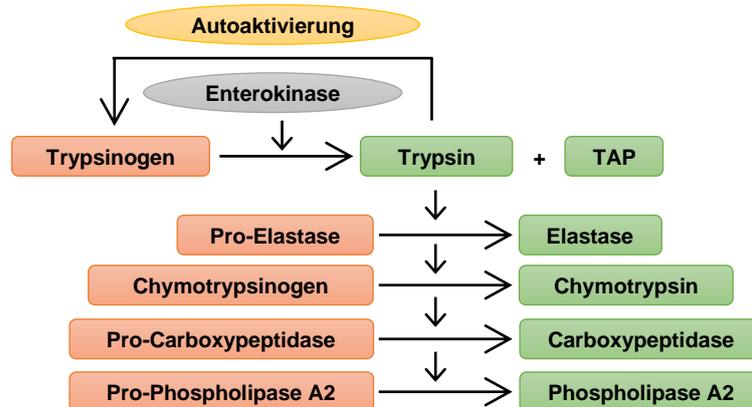


Abb. 2: Physiologische Aktivierung der Proteasekaskade im Duodenum. Das Trypsinogen wird durch das Bürstensaumenzym Enterokinase in das aktive Trypsin und das Trypsin-Aktivierungs-Peptid (TAP) gespalten. Anschließend kann das aktive Trypsin alle weiteren pankreatischen Proteasen proteolytisch und sich selbst (Autoaktivierung) aktivieren. Die aktiven Proteasen sind für den Nahrungsaufschluss zuständig.

In der Azinuszelle gibt es unterschiedliche Schutzmechanismen, die vor einer verfrühten Aktivierung von Trypsinogen schützen sollen. Unter anderem exprimieren Azinuszellen keine Enterokinase, wodurch die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin mittels der Enterokinase nicht der ausschlaggebende Faktor in der Pankreatitis sein kann. Im Falle einer Pankreatitis werden diese Schutzmechanismen überwunden und es kommt zu einer Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin durch die lysosomale Hydrolase Cathepsin B (CTSB)⁵⁹, wodurch die Aktivierung durch CTSB als das initiale Ereignis in der Pankreatitis angesehen wird^{53,59-61}. Das aktive Trypsin kann, wie auch schon unter physiologischen Bedingungen, die weiteren Verdauungsenzyme (Pro-Elastase, Chymotrypsinogen, etc.) aktivieren. Folglich kommt es zur Induktion der gesamten Proteasekaskade und dem Selbstverdau des Pankreas durch seine eigenen Proteasen⁶⁰. Um diese vorzeitige Aktivierung von Trypsinogen zu unterbinden, gibt es noch weitere intrazelluläre Schutzmechanismen in der Azinuszelle. Zum einen werden die proteolytischen Enzyme in einer inaktiven Vorstufe in der Azinuszelle sekretiert und erst im Duodenum aktiviert. Zum anderen werden auch Proteaseinhibitoren, wie der Trypsin-Inhibitor SPINK-1, exprimiert⁶². Dieser versucht durch die Inhibition von aktivem Trypsin die Aktivierung der weiteren Proteasekaskade zu unterbinden⁵³. Darüber hinaus ist das Kompartiment der Zymogene angesäuert⁶³. Demzufolge können die Verdauungsenzyme kaum aktiv sein, da ihr pH-Optimum meist im leicht basischen Bereich von pH 8,0 (wie es auch im Duodenum vorherrscht) liegt. Ein weiterer Schutzmechanismus ist die Degradation von Trypsin und die

daraus folgende Reduktion der Aktivität von Trypsin durch die lysosomale Protease Cathepsin L (CTSL) ⁶⁴ und Chymotrypsin C (CTRC) ⁴², wobei CTRC in der Lage ist Trypsin zu inaktivieren ^{65,66}. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass das Mesotrypsin in der Lage ist SPINK-1 zu degradieren und somit die Inhibition von Trypsin zu hemmen ⁶⁷⁻⁶⁹. Dadurch könnte Mesotrypsin ebenfalls ein wichtiger krankheitsrelevanter Faktor sein. (Abb. 3).

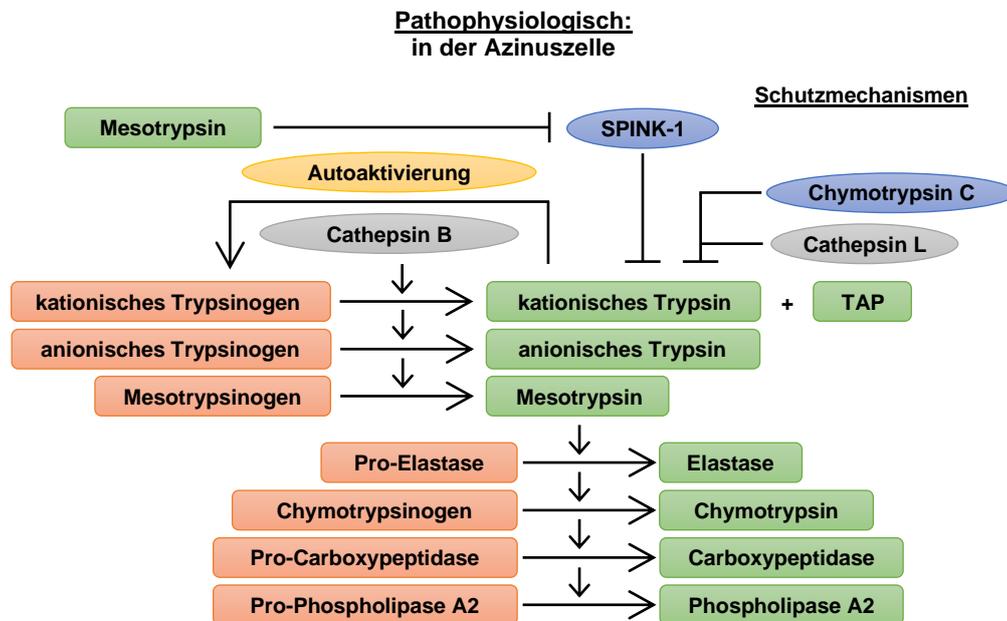


Abb. 3: Pathophysiologische Aktivierung der Proteasekaskade in der Azinuszelle. Das Trypsinogen wird durch Cathepsin B in das aktive Trypsin und das Trypsin-Aktivierungs-Peptid (TAP) gespalten. Wie bereits im Duodenum kann das aktive Trypsin alle weiteren pankreatischen Proteasen proteolytisch und sich selbst (Autoaktivierung) aktivieren. Es gibt eine Reihe von intrazelluläre, protektive Mechanismen, die die Azinuszellen vor einer verfrühten Proteaseaktivierung schützen sollen. SPINK-1 ist ein endogener Trypsin-Inhibitor und Chymotrypsin C sowie Cathepsin L können aktives Trypsin degradieren. Auf diesem Wege versuchen sie eine weitere Aktivierung der Proteasen zu verhindern. Diese Schutzmechanismen müssen im Falle einer Pankreatitis überwunden werden, wodurch es intrazellulär zu einer massiven Aktivierung von Proteasen kommt.

CTSB und Trypsinogen werden schon im Golgi-Apparat in unterschiedliche Kompartimente sortiert ⁷⁰. CTSB wird hauptsächlich mittels des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors in die Lysosomen und Trypsinogen in das sekretorische Kompartiment, sogenannte Zymogengranula (kondensierte Vakuolen), der Azinuszellen sortiert ⁷¹. Damit beide Enzyme miteinander interagieren können, müssen sie im selben subzellulären Kompartiment vorliegen ⁷². Es gibt verschiedene Hypothesen, wie es zu dieser Co-Lokalisierung in Azinuszellen kommt ⁷³. Die erste Hypothese ist, dass es zu einer Fusion beider Kompartimente kommt. Das heißt es erfolgt eine Fusion der Lysosomen mit dem

Zymogengranula ⁷⁴. Die zweite Hypothese ist, dass es bereits zu einer Fehlsortierung der lysosomalen Enzyme in das sekretorische Kompartiment im Golgi-Apparat kommt ⁷⁵. Die dritte Hypothese besagt, dass CTSB bereits im sekretorischen Kompartiment vorhanden ist und dort nur aktiviert bzw. aktiver wird ⁶⁰ (Abb. 4).

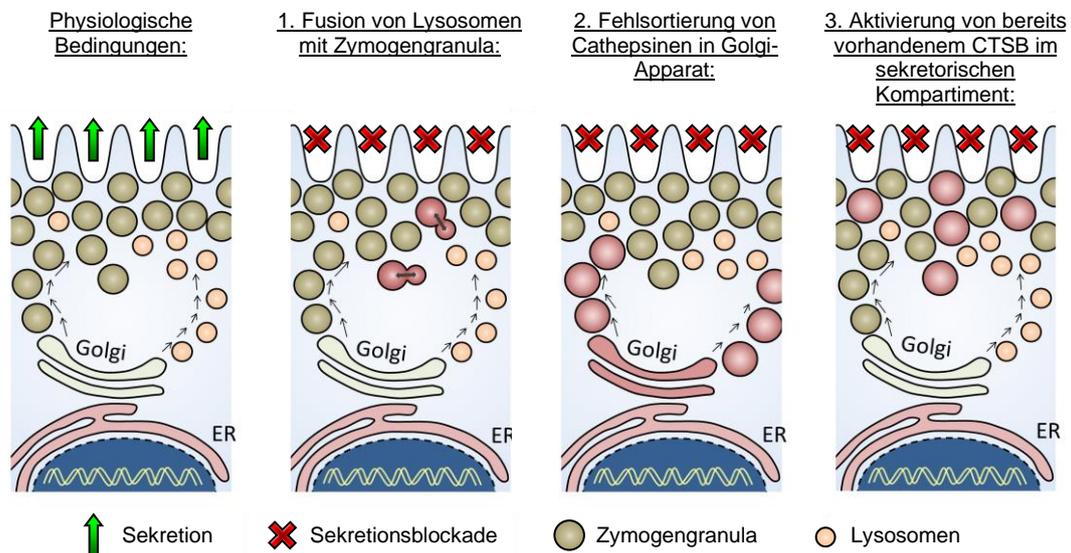


Abb. 4: Die Co-Lokalisierung von Cathepsin B und Trypsinogen ist entscheidend für die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin. Unter physiologischen Bedingungen werden sekretorische (Trypsinogen) und lysosomale (Cathepsin B) Proteine im Golgi-Apparat sortiert und in unterschiedliche subzelluläre Kompartimente verteilt (linke Zelle). Ein pathophysiologischer Stimulus führt zu einer Sekretionsblockade. Trypsinogen und CTSB können co-lokalisieren, wodurch es zur Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin kommt. Es gibt drei Haupthypothesen, wie dies geschieht: 1.) eine Fusion von Lysosomen und sekretorischen Vesikeln, 2.) eine Fehlsortierung von Cathepsinen in das sekretorische Kompartiment und 3.) Cathepsin B ist bereits im sekretorischen Kompartiment vorhanden und wird unter pathophysiologischen Bedingungen aktiv bzw. aktiver.

Bis heute ist nicht vollständig geklärt, in welchem subzellulären Kompartiment die Co-Lokalisierung wirklich erfolgt und sich die vorzeitige Proteaseaktivierung ereignet ⁷⁶. Jedoch konnte gezeigt werden, dass ein überschießendes intrazelluläres Ca^{2+} -Signal der Co-Lokalisierung vorausgeht und auch erforderlich ist, damit es zu einer Induktion der intrazellulären Proteaseaktivierung kommt ⁷⁷.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Sekretion der Verdauungsenzyme über ein oszillierendes Calciumsignal gesteuert. Hierbei kommt es durch Cholecystokin (CCK) ^{78,79} und Acetylcholin (Ach) ⁸⁰ zu einer fluktuierenden Freisetzung von Calcium-Ionen aus den intrazellulären Speichern. Dies führt schließlich zu einer Sekretion der Zymogene am apikalen Pol der Azinuszelle ^{81,82}. Bei einer pathologischen Calciumfreisetzung erfolgt ein langanhaltendes, intrazelluläres Calciumsignal, wodurch es zu einer Überforderung der

intrazellulären Calcium-Speicher des Endoplasmatischen Retikulum (ER) kommen kann. Demzufolge öffnen sich die Calcium-Kanäle der Zellmembran und Calcium-Ionen aus dem Extrazellulärraum können in die Zelle strömen. Schließlich erfolgt keine geregelte Sekretion der Zymogene, sondern es kommt zu einer Sekretionsblockade^{77,82}. Als Folge daraus führt die Sekretionsblockade zu einer Co-Lokalisierung von Trypsinogen und CTSB, wodurch die intrazelluläre Proteasekaskade aktiviert wird⁷⁷.

Es sind verschiedene Calcium-Kanäle und -Transporter bekannt, die hierbei eine Rolle spielen. Das ist zu einem der Calcium-Sensor STIM1 (Stromal interaction molecule 1) und zum anderen der Calcium-Kanal ORAI (Calcium release-activated calcium channel protein 1). Beide Kanäle wechselwirken miteinander. STIM1 erkennt den Abfall der Calcium-Konzentration im ER und aktiviert ORAI in der Zellmembran. Im Anschluss leitet ORAI große Mengen an Calcium-Ionen aus dem extrazellulären Raum in das Cytoplasma, wodurch ein langanhaltendes cytosolisches Calciumsignal induziert wird^{83,84}. Jedoch konnten Romac et al. 2018 zeigen, dass auch der Druckrezeptor Piezo1 mit der intrazellulären Proteaseaktivierung während der Pankreatitis assoziiert werden und direkt den Calcium-Kanal TRPV4 (Transient receptor potential channel subfamily V member 4) öffnen kann. Dabei registriert Piezo1 eine Druckerhöhung im Pankreasgang, wie z.B. bei einer gallen-induzierten Pankreatitis und löst ein pathophysiologisches Calciumsignal mittels des TRPV4-Kanals aus⁸⁵.

Die Überladung der Zellen mit Calcium-Ionen kann nicht nur zu einer intrazellulären Proteaseaktivierung führen, sondern auch zu einer Schädigung der Mitochondrien⁸⁶, zur Induktion von ER-Stress^{51,87} und einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)^{88,89}. Dieser kann zu einer Expression von proinflammatorischen Zytokine führen und somit die Immunantwort induzieren. Mitochondrien versuchen das erhöhte Calciumsignal abzuschwächen, indem sie cytosolisches Ca²⁺ aufnehmen. Eine Überladung der Mitochondrien mit Ca²⁺ führt jedoch zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und somit auch zu einem Zusammenbruch der Energieversorgung der Zellen mit ATP (Adenosintriphosphat), welches nicht mehr produziert werden kann^{86,90}. Infolgedessen sind protektive Mechanismen, wie z.B. die Autophagie, eingeschränkt⁹¹. Unter normalen Bedingungen ist diese für eine geregelte Degradation der aktivierten Proteasen verantwortlich. Weiterhin kann auch die Ca²⁺-ATPase den cytosolischen Ca²⁺-Spiegel nicht wiederherstellen. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, die gestörte autophagosomale Degradation und die Aktivierung von NFκB laufen parallel zueinander ab und führen zu einer weiter gesteigerten intrazellulären Proteaseaktivierung. Dies resultiert schließlich in einen nekrotischen Zelltod der Azinuszellen und eine Aktivierung des Immunsystems⁹².

Der Schweregrad der Pankreatitis wird nicht durch die initiale Proteaseaktivierung in den Azinuszellen bestimmt, sondern ist eine Folge der daraus resultierenden überschießenden systemischen Immunantwort, wodurch es zu Organversagen oder auch Infektion der Pankreasnekrose kommen kann ^{6,93}.

2.1.4 Cathepsine & seine Inhibitoren

Der Name Cathepsin wurde von dem griechischen Wort „Kathepsin“ abgeleitet und bedeutet übersetzt „Verdauen“. Diesen Namen bekamen schließlich alle Proteasen, die in einer leicht sauren Umgebung aktiv sind ⁹⁴. Später wurde der Name, basierend auf ihrer katalytischen Aminosäure, für die Serinproteasen Cathepsin A und G, die Asparaginproteasen Cathepsin D und E und für die 11 menschlichen Cystein-Cathepsine B, C, F, H, K, L, O, S, V, X und W festgelegt ⁹⁵. Der Hauptunterschied zwischen den Unterfamilien besteht in der Sequenz ihres Pro-Peptids und deren Länge ⁹⁶. Hierbei sind die Cystein-Cathepsine die größte und am besten untersuchte Klasse von Cathepsinen. Sie gehören zur Papain-ähnlichen Familie C1 des Clans CA ^{95,97}. Die Cathepsine werden als inaktive Präproenzyme synthetisiert und im rauem Endoplasmatischen Retikulum (RER) durch Abspaltung des Präpeptids prozessiert. Im Anschluss erfolgt eine posttranslationale Glykosylierung im Golgi-Apparat und der Transport zum lysosomalen Kompartiment mittels des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors, wodurch die Prozessierung in das katalytisch aktive Enzym durch eine kontrollierte Proteolyse des Pro-Peptids stattfindet ⁹⁸⁻¹⁰⁰. Die Cathepsine können sich gegenseitig unter Abspaltung des Pro-Peptids aktivieren ¹⁰¹ (Mechanismus s. Abb. 5).

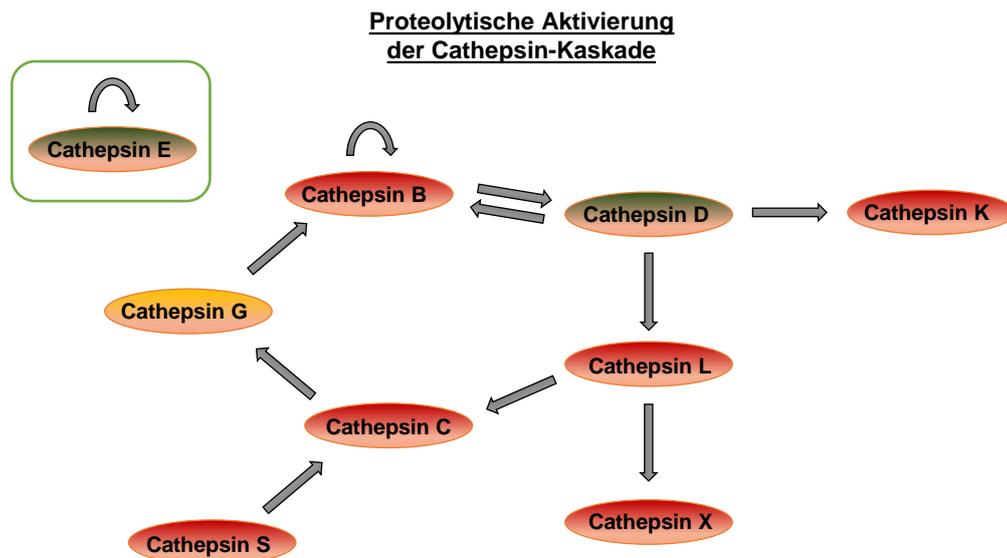


Abb. 5: Proteolytische Aktivierung der Cathepsin-Kaskade. Cathepsine werden als Präproenzyme synthetisiert. Nach Entfernung des Präpeptids im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) werden die Pro-Cathepsine zum Lysosom transportiert und unter Entfernung des Pro-Peptids über die Cathepsin-Kaskade aktiviert. Pro-Cathepsin B wird durch Cathepsin D (CTSD) aktiviert und kann sich autoaktivieren. Cathepsin B (CTSB) aktiviert wiederum Pro-CTSD. CTSD spaltet Cathepsin K und Cathepsin L (CTSL). Daraufhin kann CTSL die Freisetzung des Pro-Peptids von Cathepsin Z und C (CTSC) induzieren. Cathepsin S kann ebenfalls Pro-CTSC aktivieren. Anschließend aktiviert Pro-CTSC und CTSC das CTSB mittels Entfernung des Pro-Peptids von Pro-Cathepsin G. Cathepsin E ist einzigartig in diesem Netzwerk, jedoch wird vermutet, dass es durch Selbstentfernung des Pro-Peptids aktiviert wird. Diese Kaskade ist komplex und wurde hauptsächlich durch *in vitro* Studien untersucht. Der Wirkmechanismus dieses komplexen Netzwerks muss unter physiologischen Bedingungen noch identifiziert werden. Darüber hinaus verkomplizieren kompensatorische Aktivitäten der Cathepsine füreinander, welche nicht in der Abbildung dargestellt sind, das physiologische Netzwerk dieser Proteasen (modifiziert nach Khaket et al., 2019) ¹⁰¹.

Daher sind die Cathepsine nach ihrer Freisetzung aus dem Lysosom voll aktiv und benötigen keine weitere Konformationsänderung. Cathepsine sind lysosomale Peptidasen. Die meisten von ihnen sind Endopeptidasen, mit der Ausnahme von Cathepsin C und X, welche Exopeptidasen sind. Cathepsin C ist eine Aminodipeptidase ¹⁰² und das Cathepsin H ist zusätzlich zu einer Endopeptidase eine Aminopeptidase ¹⁰³. Das Cathepsin X ist eine Carboxymonopeptidase ¹⁰⁴, während Cathepsin B gleichzeitig eine Endopeptidase und eine Carboxymonopeptidase ist ¹⁰⁵. Die Endopeptidasen leiten die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen im Inneren einer Peptidkette und somit den Proteinabbau ein. Die dabei entstandenen kleineren Fragmente bieten den Exopeptidasen mehrere Angriffspunkte für den weiteren proteolytischen Abbau und den damit verbundenen Aufschluss in einzelne Aminosäuren. Die Mehrheit der Cathepsine wird

ubiquitär exprimiert, wie Cathepsin B, L, H, C, F, O, V und X und andere werden von spezifischen Zellen und Geweben exprimiert (Cathepsin K, S und W)^{95,106–113}. Die Aktivität der Cathepsine wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, wie z.B. die Regulierung der Synthese, die Zymogenprozessierung, die Hemmung durch endogene Inhibitoren und der pH-Stabilität^{96,114}. Die lysosomalen Cathepsine benötigen ein leicht saures Milieu, welches auch in Lysosomen zu finden ist, um optimal aktiv zu sein. Bei neutralem pH-Wert sind sie meist instabil und ihre Lebensdauer wird durch die entfaltungsinduzierte Inaktivierung begrenzt^{115,116}. Die einzige Ausnahme ist das Cathepsin S, welches bei neutralem und leicht basischen pH-Wert stabil ist und den größten Teil seiner Aktivität beibehält¹¹⁷. Im Gegensatz dazu ist das Cathepsin L das instabilste der Cathepsine und es erfolgt eine rasche Inaktivierung bei einem neutralen pH-Wert¹¹⁸. Daher wurden die Cystein-Cathepsine zunächst als intrazelluläre Enzyme bzw. Hydrolasen betrachtet, die für die spezifische Proteolyse in der sauren Umgebung des endosomalen/lysosomalen Kompartiment für den Abbau von intrazellulären und extrazellulären Proteinen verantwortlich sind^{96,119}. Jedoch hat sich die Ansicht in Laufe der Jahre geändert. Da gezeigt wurde, dass sie neben ihrer Hauptfunktion des lysosomalen Protein-Recycling, auch eine Rolle bei einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen spielen. Sie sind z.B. beteiligt an der Reifung des MHC-Klasse-II-Komplexes, dem Knochenumbau, der Keratinozytendifferenzierung, der Tumorprogression und Metastasierung, sowie an entzündlichen Prozessen wie der rheumatoiden Arthritis, Osteoarthritis, der Atherosklerose, der Gastritis und Pankreatitis^{59,120}. Des Weiteren konnte durch gezielte Deletionen von den Cystein-Cathepsin kodierenden Genen eine wichtige Rollen des ubiquitär exprimierten Cathepsine B und L identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass der Phänotyp in dem entsprechenden Mausmodell mit Defiziten in beiden Proteasen letal durch neuronale Atrophie war¹²¹. Als wichtige Regulatoren der katalytisch aktiven Cystein-Cathepsine gelten endogene Proteaseinhibitoren. Ihre Inhibition erfolgt meist durch kleine Moleküle, die ihren Substraten ähneln und so das aktive Zentrum blockieren können. Zu ihnen werden Stefine, Cystatine, Kininogene, Thyropine und Serpine gezählt. Es handelt sich dabei um grundsätzlich kompetitive, reversible, eng bindende Inhibitoren, die eine Substratbindung an dieselbe aktive Stelle verhindern. Basierend auf ihre physiologische Rolle werden sie in sogenannte *emergency*- und *regulatory*-Inhibitoren unterteilt^{95,122}. Typische *emergency*-Inhibitoren sind die Cystatine, die von ihrem Zielenzym getrennt sind und wirken primär auf entkommene Proteasen¹²², sowie Proteasen von eindringenden Pathogenen¹²³. Gleiches wurde auch für die Thyropine gezeigt¹²⁴. Die *regulatory*-Inhibitoren werden in 3 Klassen unterteilt: *threshold-type*, *buffer-type* und *delay-type*. Die *regulatory*-Inhibitoren blockieren nicht nur, sondern modulieren auch die Proteaseaktivität und sind oft mit ihren Zielenzymen co-lokalisiert⁹⁵. Auch die Pro-Peptide der lysosomalen

Cahepsine können als Inhibitoren fungieren und gehören höchstwahrscheinlich zu dem *buffer-type* der *regulatory*-Inhibitoren^{96,125}. Die *buffer-type* Inhibitoren halten die Proteasen in Abwesenheit von Substraten komplexiert und setzen sie in Anwesenheit von Substraten frei. Damit verhindern sie eine unangemessene Proteolyse. Alle 4 Typen von Inhibitoren (*emergency*, *reshold*, *buffer* und *delay*) sind wichtig, um das Gleichgewicht unter physiologischen Bedingungen halten zu können^{95,122}.

2.1.4.1 Cathepsin B & seine Rolle in der Protease-Aktivierung

Cathepsin B (CTSB) [EC 3.4.22.1, Cathepsin B1, APP Sekretase] ist eines der am besten untersuchten Mitglieder der Papain-Superfamilie von Cysteinproteasen. Es wird als inaktives Zymogen synthetisiert und bei sauren pH-Wert durch Autoproteolyse aktiviert¹²⁶. Des Weiteren entfaltet es im sauren Milieu (pH 4-6) seine optimale enzymatische Aktivität, ist jedoch bis pH 7 stabil. CTSB fungiert hauptsächlich als lysosomale Hydrolase und degradiert intrazelluläre Proteine. Jedoch ist es auch an extrazellulären Prozessen beteiligt sowie an der proteolytischen Prozessierung von dem Amyloid-Precursor-Protein (APP)¹²⁷. CTSB wird ubiquitär exprimiert und ist daher an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. dem intrazellulären Proteinabbau, der Immunantwort, der Prohormonverarbeitung, verschiedenen Krebsarten und Arthritis¹²⁸⁻¹³⁵. Seine proteolytische Aktivität wird durch endogene Inhibitoren (Stefine und Cystatine) reguliert¹²². Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Papain-Superfamilie, die meist eine Endopeptidase-Aktivität aufweisen, zeigt CTSB sowohl eine Exopeptidase-(Dipeptidyl-Carboxypeptidase) als auch eine Endopeptidase-Aktivität^{136,137}. Röntgenkristallstrukturanalysen des humanen CTSB haben gezeigt, dass CTSB ein zusätzliches Strukturelement besitzt. Dabei handelt es sich um eine 20 Aminosäuren lange Insertionsschleife, welche das aktive Zentrum (Cys29) teilweise blockiert und dadurch die Substrat- und Inhibitorbindenden Eigenschaften des Enzyms moduliert. Durch dieses „Verschließen“ der Substratbindungsstelle hat diese Insertionsschleife den Namen „*occluding loop*“ (Okklusionsschleife) bekommen. Es wurde vermutet, dass sie essentiell für die Dipeptidyl-Carboxypeptidase-Aktivität ist^{105,138}. Illy et al. konnten dies durch gezielte Mutagenese bestätigen und zeigten, dass die Deletion der *occluding loop* von CTSB zu einer vollständigen Eliminierung der Exopeptidase-Aktivität führt¹³⁸. Die Konformation und die genaue Orientierung der *occluding loop* in CTSB wird durch Kontakte zwischen Resten innerhalb der Schleife selbst, sowie durch Wechselwirkungen mit dem Rest des Proteins stabilisiert. Dabei spielen zwei Histidinreste (His110 und His111) eine Rolle, da sie den positiv geladenen „Anker“ für die C-terminale Carboxylat-Gruppe von Peptidylsubstraten darstellen¹⁰⁵. Diese Beobachtungen konnten durch die Kristallstruktur des Komplexes

eines Substrat-nachahmenden Inhibitors CA030 (Ethylester von Epoxysuccinyl-Ile-Pro-OH), der über seine C-terminale Carboxylgruppe mit den beiden Histidinresten interagiert, bestätigt werden ¹³⁹. Des Weiteren wird die *occluding loop* durch eine Disulfidbindung zwischen dem Cys108 und Cys119 zusammengehalten und ihre Anbindung an den Enzymkörper durch zwei Salzbrücken (zwischen His110 und Asp22, sowie Arg116 und Asp224) stabilisiert, wodurch es zu einer kompakten Struktur kommt ¹⁰⁵ (Abb. 6).

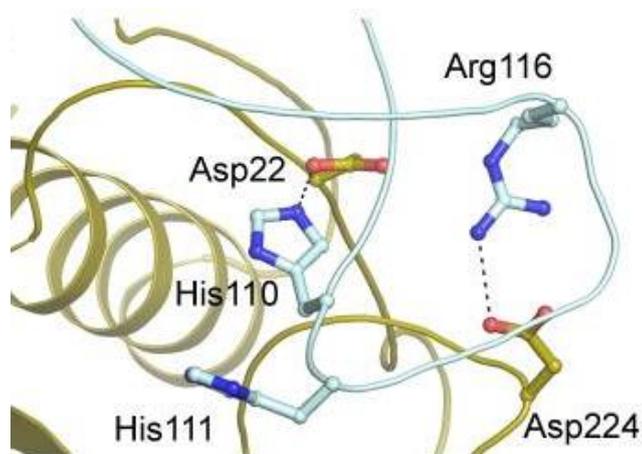


Abb. 6: Interaktion in der *occluding loop* im humanen Cathepsin B. Die Anbindung an den Enzymkörper wird durch zwei Salzbrücken (His110-Asp22, Arg116-Asp224) stabilisiert, wodurch es zu einer kompakten Struktur kommt. Dabei sind die wichtigen Wechselwirkungen der *occluding loop* (helles Türkis) in Band-/Kugel- und Stabdarstellungen veranschaulicht. (Abbildung aus Kerr et al., 2010 ¹⁴⁰)

Jedoch konnten die Kristallstrukturen der reifen aktiven Form von CTSB zu Anfang nur die Relevanz der *occluding loop* für die Exopeptidase-Aktivität erklären ¹⁰⁵, aber nicht die Mechanismen der Endopeptidase-Aktivität, sowie die Hemmung des Enzyms durch ihre endogenen Inhibitoren (Stefine und Cystatine) ¹⁴¹. Dies konnte durch die Kristallstrukturen von humanen ¹⁴² und Ratten Pro-CTSB ¹⁴³ beantwortet werden. Sie zeigten mittels der Kristallstruktur von Pro-CTSB, dass die *occluding loop* im Proenzym eine ganz andere Konformation als im reifen Enzym annimmt. Die Kontakte von His110-Asp22 und Arg116-Asp224 mittels Salzbrücken, welche die Schleife im reifen Enzym in Position halten, sind im Proenzym nicht vorhanden. Dadurch kommt es zu einer „offenen“ Konformation im Pro-CTSB ¹⁴³ (Abb. 7).

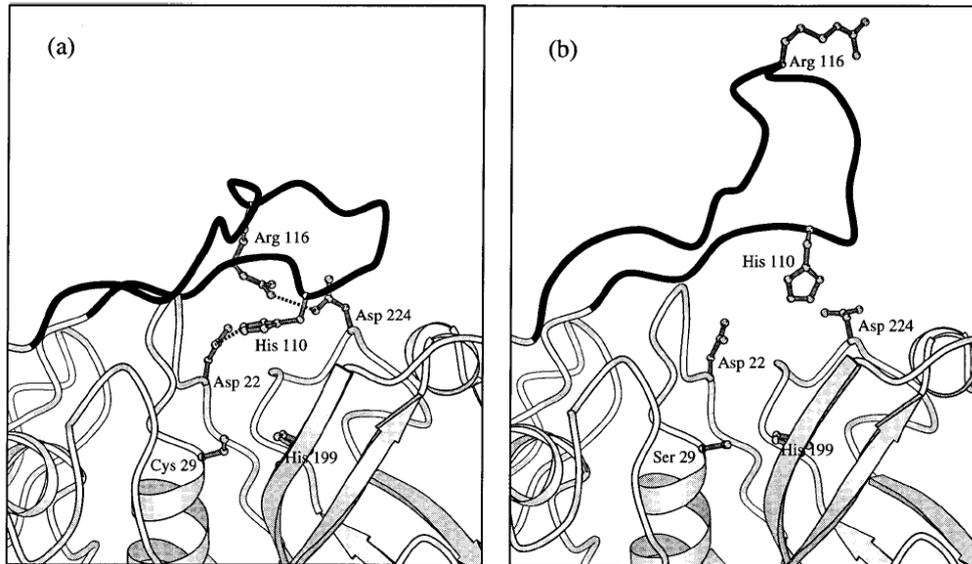


Abb. 7: Konformationen der *occluding loop* im Cathepsin B (a) und Pro-Cathepsin B (b). Im Cathepsin B wird der Enzymkontakt mittels zwei Salzbrücken (His110-Asp22, Arg116-Asp224) stabilisiert, wodurch eine kompakte Struktur entsteht. Dabei sind die wichtigen Wechselwirkungen der *occluding loop* (schwarz) in Band-/Kugel- und Stabdarstellungen veranschaulicht. Weiterhin sind die Reste des aktiven Zentrums Cys29 (Ser29 in der Pro-Cathepsin B Struktur) und His199 dargestellt. Die Salzbrücken von His110-Asp22 und Arg116-Asp224, welche die Schleife im reifen Enzym in Position halten, sind im Proenzym nicht vorhanden. Hierdurch kommt es zu einer „offenen“ Konformation im Pro-Cathepsin B. Bei der Pro-Cathepsin B Struktur ist die Proregion nicht dargestellt, um die Konformation der Schleife besser sichtbar zu machen. (Abbildung aus Nägler et al., 1997 ¹⁴⁴)

Nägler et al. zeigte schließlich durch gezielte Mutagenese, dass CTSB eine sehr hohe Endopeptidase-Aktivität besitzt, wenn die Kontakte zwischen der *occluding loop* und dem Enzym unterbrochen sind bzw. entfernt werden. Dabei steigt die Endopeptidase-Aktivität von CTSB auf ein Niveau, das den Cysteinproteasen ähnelt, die keine *occluding loop* besitzen ¹⁴⁴. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Flexibilität der *occluding loop* für die Endopeptidase-Aktivität von CTSB verantwortlich ist, sowie dass die Endopeptidase-Aktivität mit der Verdrängung der *occluding loop* aus dem Spalt des aktiven Zentrums verbunden ist. Weiterhin konnte neben den verschiedenen Mutagenese-Studien, auch mit pH-Studien gezeigt werden, dass die *occluding loop* ein Wasserstoffionen-abhängiges Tor ist, das nicht nur die Art der Proteolyse (exo- oder endoproteolytisch) beeinflusst, sondern auch die Reifung des Pro-Enzyms kontrolliert ^{138,144,145}. Das heißt, bei einem niedrigen pH-Wert bilden His110-Asp22 eine Salzbrücke und die *occluding loop* wird in ihrer geschlossenen Konformation stabilisiert. Die *occluding loop* konkurriert stärker mit dem Pro-Peptid. Bei höheren pH-Werten findet eine Deprotonierung von His110 statt, wodurch die Salzbrücke zwischen His110-Asp22 zerstört wird und es zu einer

Destabilisierung der geschlossenen Konformation kommt. Die Schleife ist nun frei beweglich, sodass CTSB als Endopeptidase wirken kann ^{144,145}. Dies lässt schlussfolgern, dass ein Zusammenhang zwischen der pH-Abhängigkeit der Konformation der *occluding loop* von CTSB und der Pro-Peptid-Bindungsaffinität besteht ¹⁴⁵.

Bereits in den 1950er Jahren konnte gezeigt werden, dass die lysosomale Hydrolase Cathepsin B (CTSB) eine Schlüsselrolle in der Pankreatitis spielt. CTSB fungiert als das Trypsinogen aktivierende Enzym in den Azinuszellen, wodurch die Prozessierung von Trypsinogen zu Trypsin durch CTSB als das initiale Ereignis in der Pankreatitis angesehen wird ¹⁴⁶. Auch durch tierexperimentelle Daten ließ sich die Vermutung der verfrühten intrazellulären Aktivierung von Trypsinogen durch CTSB bestätigen ^{147–149}. Den Beweis für diese Theorie lieferten schließlich CTSB-defiziente Mäuse. Hiermit konnte gezeigt werden, dass ein Verlust an CTSB zu einer deutlich verminderten Trypsinaktivität im Verlauf der Pankreatitis führt und somit auch zu einem verminderten Schweregrad der Erkrankung ^{59,150}. Um Trypsinogen aktivieren zu können, muss CTSB die Schutzmechanismen (s. Abschnitt 2.1.3) überwinden. Eine weitere wesentliche Voraussetzung ist, dass sich Trypsinogen und CTSB in demselben subzellulären Kompartiment befinden müssen, damit sie miteinander interagieren können. Niederau und Grendell konnten zeigen, dass bereits in einer frühen Phase der Erkrankung CTSB und aktives Trypsin im gleichen Kompartiment zu finden sind ⁷². Eine Co-Lokalisierung beider Enzyme ist ein essentieller pathophysiologischer Mechanismus für die Ausbildung einer Pankreatitis ⁷³. Hierfür gibt es verschiedene Hypothesen: eine Fehlsortierung im Golgi-Apparat ⁷⁵, eine Fusion von beiden Kompartimenten ⁷⁴ und CTSB liegt bereits im sekretorischen Kompartiment vor ⁶⁰ (s. Abschnitt 2.1.3). Im Menschen werden drei Isoformen des Trypsinogens (kationisches, anionisches, Meso-Form) exprimiert, welche CTSB alle aktivieren kann. Im weiteren Verlauf können die aktiven Formen des Trypsins die restliche Proteasekaskade in der Azinuszelle induzieren. Da CTSB und Trypsinogen schon im Golgi-Apparat in unterschiedliche Kompartimente sortiert werden, stellt dies eine räumliche Trennung beider Enzyme sicher. Weiterhin indizierten subzelluläre Fraktionierungsversuche von Saluja et al., dass es im Verlauf der Pankreatitis zu einer schnellen Umverteilung der CTSB-Aktivität von der lysosomalen Fraktion in die Zymogengranula-Fraktion kommt ⁷⁰. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen bereits eine nicht unerhebliche Menge an CTSB in der Zymogengranula-Fraktion vorliegt ^{60,150,151}, was wiederum nicht die Co-Lokalisierungs-Hypothesen der Fehlsortierung bzw. der Fusion unterstützen würde.

2.1.4.2 Inhibitoren des Cathepsin B

Die meisten Cathepsine sind Endopeptidasen und haben ein offenes, leicht zugängliches aktives Zentrum^{152–154}. Dadurch kann die Inhibition der Cystatine über eine einfache Einstufenreaktion erfolgen^{155–158} und sie binden meist mit einer extrem hohen Affinität¹⁵⁹. Im Gegensatz dazu besitzt CTSB eine sogenannte *occluding loop*, welche teilweise das aktive Zentrum blockiert und wodurch CTSB auch als Dipeptidase agieren kann^{105,138}. Hierdurch wird auch die Inhibition von CTSB im Vergleich zu den Endopeptidasen erschwert. Cystatine sind die am besten untersuchten Inhibitoren der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen und kommen in einer Vielzahl von Organismen vor. Sie besitzen eine intrazelluläre und extrazelluläre Funktion und wirken durch eine enge reversible Bildung von Komplexen mit ihrem Zielenzym¹⁶⁰. Sie gehören zu der Familie I25 und werden in drei Subfamilien unterteilt: Stefine (I25A), Cystatine (I25B) und Kininogene (I25C). Dabei gehören die Stefine zur Subfamilie I und sind einkettige Polypeptide, die aus 100 Aminosäureresten bestehen und keine Disulfidbrücken besitzen. Die Subfamilie II sind die Cystatine, welche auch einkettige Polypeptide sind, die aus 120 Aminosäureresten bestehen und zwei interne Disulfidbrücken besitzen. Die Kininogene gehören zur Subfamilie III und sind hochmolekulare Glykoproteine^{161–163}. Diese Arbeit befasst sich mit dem Zusammenspiel von CTSB und seinem endogenen Inhibitor Cystatin C. Aus diesem Grund wird im Weiteren mehr auf Cystatin C eingegangen. Wie oben bereits erwähnt, besitzt CTSB als zusätzliches Strukturelement die *occluding loop*, wodurch die Inhibition von CTSB nicht über eine Einstufenreaktion erfolgen kann. Kinetikstudien haben gezeigt, dass die Inhibition von CTSB durch Cystatin C über eine Zweistufenreaktion stattfindet. Zuerst kommt es zu einer anfänglich schwachen Interaktion, der im zweiten Schritt eine Konformationsänderung folgt. Das heißt, der Inhibitor muss die *occluding loop* erst verdrängen, damit ein enger Komplex gebildet werden kann^{105,164}. Hierdurch ist die Affinität im Vergleich zu den anderen Cysteinproteasen wesentlich geringer¹⁶¹. Jedoch konnte auch durch gezielte Mutagenese gezeigt werden, dass die Mobilität der *occluding loop* von CTSB erhöht werden kann, wenn die Salzbrücke zwischen His110 und Asp22 unterbrochen wird¹⁴⁴. Auch eine 40-fache höhere Affinität für Cystatin C konnte mit gezielter Mutagenese erreicht werden. Dies lässt schlussfolgern, dass die *occluding loop* normalerweise den Zugang des Inhibitors zum aktiven Zentrum einschränkt¹³⁸. Weiterhin konnte auch mit Röntgenstrukturanalysen von Pro-CTSB die Beweglichkeit der *occluding loop* gezeigt werden. Dabei wird diese von dem Pro-Peptid verdrängt und bindet an dem aktiven Zentrum, wodurch das Enzym in einem inaktiven Zustand gehalten wird^{142,143,165}. Durch die Entfernung der *occluding loop* durch gezielte Mutagenese konnte die Bindungsaffinität des Pro-Peptids um mehr als das 50-fache erhöht werden¹³⁸. Ferner konnte gezeigt werden,

dass auch das Pro-Peptid ein Inhibitor für CTSB ist ¹²⁵. Bei den Typ-2 Cystatinen ist das Cystatin C [CST3, I25.004] das am besten untersuchte. 1982 wurde die Primärstruktur des Proteins von Grubb und Löffberg bestimmt ¹⁶⁶. Es ist ein wichtiger Inhibitor in Säugetieren, der in einer Vielzahl von menschlichen Flüssigkeiten, Geweben und Zellen produziert wird, mit besonders hohen Konzentrationen im Seminalplasma und in der Zerebrospinalflüssigkeit. Weiterhin ist es das Typ-2-Cystatin, das die größte Verteilung im Körper aufweist. Die Konzentrationen von Cystatin C sind hoch, wodurch es jede lysosomale Cysteinprotease effizient hemmen kann, wenn diese in eine Körperflüssigkeit freigesetzt wird. Jedoch zeigt Cystatin C die höchste Affinität für CTSB, H und L. Dies deutet daraufhin, dass Cystatin C der Hauptakteur für die extrazelluläre Cathepsin B-Aktivität ist ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Da Cystatin C in einer Vielzahl von Geweben und Körperflüssigkeiten vorkommt, gibt es auch einige pathophysiologische Prozesse, in denen es eine Rolle spielt. Eine Punktmutation im Cystatin C-Gen (Substitution Leu68→Gln) führt zu den dominant vererbten isländischen Typ der Amyloidose, der sogenannten hereditären Cystatin C-Amyloid-Angiopathie (HCCAA). Patienten mit der neurodegenerativen Erkrankung HCCAA leiden aufgrund von sukzessiven Hirnblutungen ab einem jungen Alter an Lähmungen und Demenz. Außerdem sterben sie meist in einem Alter von 30 Jahren. Dabei sind abnorme Proteinaggregate für die Pathologie zuständig ¹⁷⁰. Auch andere Arbeiten zeigen, dass Cystatin C eine Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer spielt ¹⁷¹. Des Weiteren zeigen sich auch verschiedene Rollen für Cystatin C in einer Vielzahl von Krebserkrankungen ¹⁷²⁻¹⁷⁷ und in der Atherosklerose ^{178,179}. In der Nephrologie ist Cystatin C schon lange als Marker für die glomeruläre Filtrationsrate bekannt und somit als Marker der Nierenfunktion ¹⁸⁰. Für die Pankreatitis konnte gezeigt werden, dass die endogenen CTSB-Inhibitoren Cystatin B und Cystatin C eine wichtige Rolle spielen ⁶⁰. Da Cystatin B und Cystatin C reichlich vorhanden sind, können sie CTSB inhibieren und sind somit ein effizienter Schutzmechanismus zur Vorbeugung von zellulären Schäden. Jedoch gibt es keine Veröffentlichungen zu der Rolle von Cystatin C und Cystatin B in der Pankreatitis, obwohl sie durch die Inhibition von CTSB, welcher der Initiator der Pankreatitis ist, eine wichtige Funktion einnehmen.

2.2 Ziel- und Aufgabenstellung

Die akute Pankreatitis ist durch eine vorzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymen noch innerhalb der Azinuszellen gekennzeichnet. Die lysosomale Hydrolase Cathepsin B (CTSB) spielt hierbei eine entscheidende Rolle, indem sie Trypsinogen zu Trypsin aktiviert. Für die Trypsinogenaktivierung durch CTSB ist eine Co-Lokalisierung beider Enzyme innerhalb desselben subzellulären Kompartiments erforderlich. Cystatin C ist ein potenter Inhibitor von Cathepsin B. Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der Regulation der Cathepsin B-Aktivität durch den Cysteinprotease-Inhibitor Cystatin C im Verlauf der akuten und der chronischen Pankreatitis. Zur Untersuchung sollen *in vivo* und *in vitro* Modelle herangezogen werden.

Mit Hilfe von C57BL6/J Wildtyp Mäusen soll die subzelluläre Verteilung von Cystatin C als auch Cathepsin B im Pankreas untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf die inhibitorische Funktion von Cystatin C gelegt. Es soll aufgeklärt werden, warum im Zuge der Pankreatitis die Aktivität von Cathepsin B ansteigt, trotz der Präsenz von Cystatin C im selben subzellulären Kompartiment. Hierbei soll untersucht werden, inwieweit die Funktion von Cystatin C pH-abhängig ist und ob es zu einer proteolytische Degradation von Cystatin C kommt.

Im Anschluss soll geklärt werden, welchen Einfluss ein kompletter Knockout von Cystatin C im Mausmodell auf den Verlauf bzw. Schweregrad der akuten und chronischen Pankreatitis hat. Hierfür sollen Cystatin C-defiziente Mäuse verwendet werden. Weiterhin soll gezeigt werden, welchen Einfluss die Deletion von Cystatin C auf die Aktivität von verschiedenen Proteasen in isolierten Azinuszellen und in den unterschiedlichen subzellulären Fraktionen (Zymogengranula, Lysosomen, Cytosol) hat.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antikörper inkl. der Herstellerfirma.

Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab (from sheep)	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey)	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
Anti-Glyceraldehyde-3-PDH (H86504M)	Meridian Life Science Inc., Memphis, TN, USA
Anti-Amylase (sc-46657)	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Anti-Cathepsin B (AF953)	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
Anti-Cystatin B (MAB1409)	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
Anti-Cystatin C (ABC20)	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Anti-LIMP-2/lpg85 (NB400-129)	Novus Biological, Littleton, CO, USA
Anti-Syncollin (ab178415)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Trypsin (AB1823)	Chemicon international, Temecula, CA, USA
Cy TM 3 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, UK
Fluorescein (FITC) AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, UK
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, UK
Peroxidase AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) (min X Hu Sr Prot)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, UK

3.1.2 Enzyme und Inhibitoren

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Enzyme und Inhibitoren inkl. der Herstellerfirma.

Caerulein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Cathepsin B, aus humaner Leber	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
Cathepsin B, Maus aus Baculovirus	Novus Biological, Littleton, CO, USA
Cathepsin L, aus humaner Leber	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
Cholecystokinin Fragment 30-33 Amide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Collagenase	Serva, Heidelberg, Deutschland
Cystatin B, Maus aus E.coli	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
Cystatin C, Human aus 293E Zellen	Biolegend, San Diego, CA, USA
Cystatin C, Maus aus E.coli	Abcam, Cambridge, UK
Myeloperoxidase (MPO) Enzym,	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nafamostat	Sigma/Tori Pharmaceuticals, Japan
Trypsin, aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.1.3 Substrate

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Substrate inkl. der Herstellerfirma.

(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala) ₂ -R110	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
(CBZ-Ile-Pro-Arg) ₂ -R110	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
(CBZ-Phe-Arg) ₂ -R110	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Boc-Gln-Ala-Arg-AMC	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Z-Arg-Arg-AMC	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Z-Phe-Arg-AFC	AdipoGen Life Sciences, Liestal, Schweiz
Z-Phe-Arg-AMC·HCl	Bachem, Heidelberg, Deutschland

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien inkl. der Herstellerfirma.

10x Target Retrieval Solution	Dako North America, Carpinteria CA, USA
4,5 % Formaldehyd-Lösung	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serumalbumin	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
Brillant Blau R250	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Bromophenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D(+)-Glucose Monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM Medium-GlutaMAX	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Chemsolute, Renningen, Deutschland
Ethanol	Chemsolute, Renningen, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fluorescent Mounting Medium	Dako North America, Carpinteria CA, USA
Gelatine	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HEPES Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hexacetyltrimethylammoniumbromid	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Hydrogenperoxid (H ₂ O ₂)	Merck Millipore, Burlington, MA, USA

Material und Methoden

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Gleiwitz, Polen
MOPS	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (Temed)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nariumdodecylsulfat (SDS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumborhydrit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumfumarat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumglutamat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
O-Dianisidin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PageRule Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tissue Freezing Medium	Leica, Wetzlar, Deutschland
Tissue-Tek	Sakura, Staufen, Deutschland

Material und Methoden

Trichloressigsäure	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
VectaMount-Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Xylol	J.T. Baker, Gleiwitz, Polen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.1.5 Kits

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kits inkl. der Herstellerfirma.

ApoTag Red <i>In Situ</i> Apoptosis Detection Kit	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bradford Kit	BioRad, Hercules, CA, USA
P-Amyl-Kit (Pankreas- α -Amylase)	Roche-Hitachi, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
P-Lip-Kit (Pankreas Lipase)	Roche-Hitachi, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Super Signal West Pico Plus Maximum Chemiluminescence Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Weigerts Eisenhämatoxylin Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Masson-Goldner Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Azan nach Heidenhain	Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland

3.1.6 Allgemeine Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten allgemeinen Puffer, Medien und Lösungen mit ihrer Zusammensetzung.

Azinuszellen-Isolationsmedium	8 % 100 mM HEPES 73 % DMEM 5 % BSA mit Sauerstoff gesättigt
Azinuszellen-Messmedium	24,5 mM HEPES 96 mM Natriumchlorid 6 mM Kaliumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid 2,5 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 mM Calciumchlorid 11,5 mM Glucose 5 mM Na-Pyruvat 5 mM Na-Glutamat 5 mM Na-Fumarat 1 % DMEM 1 % BSA pH 7,4 (mit Salzsäure eingestellt)
Cathepsin B Messpuffer	100 mM Natriumacetat pH 5,5 (mit Salzsäure eingestellt) 5 mM Calciumchlorid 10 mM Dithiothreitol
Cathepsin B/L Puffer (zur Verdünnung des aufgereinigten Cathepsin B/L)	50 mM Natriumacetat pH 5,0 (eingestellt mit Salzsäure)
Cathepsin L Messpuffer	100 mM Natriumacetat pH 4,0 (mit Salzsäure eingestellt) 5 mM Calciumchlorid 10 mM Dithiothreitol
Coomassie Entfärberlösung	20 % Methanol 5 % Essigsäure 75 % VE-Wasser
Coomassie Färbepuffer	0,1 % Brilliant Blau R250 10 % Essigsäure 40 % Methanol

Material und Methoden

	50 % VE-Wasser
DAPI-Puffer	0,0001 % DAPI in PBS
Homogenisationspuffer (Subzelluläre Fraktionierung)	240 mM Sucrose 5 mM MOPS 1 mM Magnesiumsulfat pH 6,5
Laemmli-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 30 % Glycerin 0,01 % Bromphenolblau 4 % SDS 20 % β -Mercaptoethanol
MPO-Extraktionspuffer	50 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 6,0 (eingestellt mit KOH) 6,4 mM EDTA 0,5 % Hexacetyltrimethylammoniumbromid 0,05 M PMSF
MPO-Homogenisierungspuffer	20 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4 (eingestellt mit KOH)
MPO-Messpuffer	50 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 6,0 (eingestellt mit KOH)
MPO-Substratlösung	10 mL MPO-Messpuffer +100 μ L (1 mL Messpuffer + 7 μ L H ₂ O ₂) +100 μ L (1 mL Messpuffer + 16,7 mg O-Dianisidin)
NET Waschpuffer	150 mM Natriumchlorid 5 mM EDTA (pH 8,0) 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 % Triton X-100
NET-Gelatine Block Puffer	150 mM Natriumchlorid 5 mM EDTA (pH 8,0) 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 % Triton X-100 0,2 % Gelatine
PBS	140 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid

Material und Methoden

	7,1 mM Natriumhydrogenphosphat 0,15 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4
Ponceau S Lösung	0,5 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
Stripping Puffer	62,5 mM Tris-HCL 2 % SDS 100 mM β -Mercaptoethanol
Towbin Transfer Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol pH 6,8
Tris-Lysepuffer (für rekombinantes Cystatin B)	25 mM Tris 100 mM Natriumchlorid pH 7,5
Tris-SDS-Glycin-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS pH 8,0
Trypsin-/Chymotrypsin-/Elastase-Messpuffer	100 mM Tris 5 mM Calciumchlorid pH 8,0

3.1.7 Geräte & Arbeitsmaterialien

3.1.7.1 Geräte

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Geräte inkl. der Herstellerfirma.

Cryo-Mikrotom	Leica, Wetzlar, Deutschland
Eismaschine	Manitowoc Ice, Manitowoc, WI, USA
Feinwaage MC1 Analytic AC 120 S	Satorius, Göttingen, Deutschland
FluorChem SP (Photoimager)	Alpha Innotech Cell Biosciences, San Leandro, CA, USA
Fluorometer (FluorStar Optima)	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland

Material und Methoden

Fusion Fx (Chemilumineszenz-Detektor)	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Gelelektrophorese (PerfectBlue™ Double Gel System Twin M)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Magnetrührer Vanomag Mond	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom	Leica, Wetzlar, Deutschland
Millipore water cartridge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Olympus FLUOVIEW FV1000 Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Pannoramic Midi (Slidescanner)	3D Histech, Budapest, Ungarn
pH Meter HI2211 pH/ORP Meter	HANNA instruments, Woonsocket, RI, USA
Photometer/SpectraMax 190	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Pipetus (Pipettierhilfe)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Power Pac 200	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
QBT Heizblock	Grant, Cambridge, UK
Schüttelwasserbad 1092	GFL, Burgwedel, Deutschland
Schüttler VIBRAX-VXR electronic, ROCKER 2D digital	IKA, Staufen, Deutschland
Tischorbitalschüttler MaxQ 4000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trans-Blot Turbo (Semi-Dry Transfer System)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Vortexer IKA MS3 digital	IKA, Staufen, Deutschland
Vortexer MS2 Minishaker	IKA, Staufen, Deutschland
Waage	OHAUS (Greifensee, Schweiz)
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Universal 320	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugen 5417R, 5424R, 5430R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

3.1.7.2 sonstige Arbeitsmaterialien

Tabelle 8: Auflistung sonstiger verwendeter Arbeitsmaterialien inkl. der Herstellerfirma.

1 mL Spritzen	B.Braun, Melsungen, Deutschland
1,5 mL Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
10 µL Pipettenspitzen	VWR, Radnor, PA, USA und Ratiolab, Dreieich, Deutschland
10 mL Erlenmeyerkolben mit 14/23 Schliff	Lenz Laborglas, Wertheim, Deutschland
1000 µL Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich, Deutschland
10-1000 µL SafeSeal SurPhob Pipettenspitzen	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf,
15 mL Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
2,0 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
200 µL Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
25 mL Erlenmeyerkolben mit 14/23 Schliff	Lenz Laborglas, Wertheim, Deutschland
3,5 mL Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5 mL BD Vacutainer SST II Advance (Serumröhrchen)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
50 mL Reaktionsgefäß	Falcon, Amsterdam, Niederlande und Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
5-25 mL Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Rundbodenplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Amersham Protan Premium 0,2 µm N	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
Deckgläser 24x50 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Douncer	DWK Life Sciences, Wertheim am Main, Deutschland
Kanülen	B. Braun, Melsungen, Deutschland

Material und Methoden

Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	BRAND, Wertheim, Deutschland
Mullkompressen/Verbandsgaze	Fuhrmann, Much, Deutschland
Objekträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland; R. Langerbrink, Emmendingen, Deutschland
OP-Besteck	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.8 Tierstämme

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Tierstämme inkl. ihrer Herkunft.

C57BL6/J	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
Cystatin C ^{-/-}	Eigene Zucht, ursprüngliche Herkunft Prof. Dr. Grubb, Lund University, Department of Clinical Chemistry, Lund, Schweden

3.1.9 Software

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software inkl. Herstellerfirma.

Alpha Innotech	Alpha Innotech Cell Biosciences, San Leandro, CA, USA
CaseViewer	3D Histech, Budapest, Ungarn
Citavi 5	Swiss Academic Software, Zürich, Schweiz
Fluoview FV10-ASW	Olympus, Hamburg, Deutschland
GraphPad Prism	GraphPad, La Jolla, CA, US
Office (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Optima BMG	Labtech, Ortenberg, Deutschland
Pannoramic Scanner	3D Histech, Budapest, Ungarn
QuantCenter	3D Histech, Budapest, Ungarn
Sigma Plot	Systat Software, Erkrath, Deutschland
Soft MaxPro	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Tierhaltung & Genotypisierung

Alle Tierversuche wurden von der örtlichen Tierversuchskommission unter der Nummer LALLF 7221.3-1.1-056/19 genehmigt und entsprechend den Tierschutzrichtlinien durchgeführt. Es wurden Tiere im Alter von 8-16 Wochen und einem Körpergewicht von 25-30 g genutzt. Die Genotypisierung erfolgte durch DNA-Isolation aus einer Schwanzbiopsie mit nachfolgender PCR.

3.2.2 Induktion einer Caerulein Pankreatitis

3.2.2.1 Akute Pankreatitis

Eine akute Pankreatitis wurde durch stündliche repetitive intraperitoneale (i.p.) Injektion bis zu einem Maximum von 8 h von Caerulein [50 µg/kg Körpergewicht] in C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen induziert. Das verwendete Caerulein ist ein Analogon von dem Cholecystokin (CCK) und führt ebenfalls zu einer Induktion einer Pankreatitis. Zuvor wurden die Mäuse über Nacht gefastet mit freiem Zugang zu Wasser ad libitum. Es wurden als Zeitpunkte 0 h, 1 h, 8 h und 24 h gewählt. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Mäuse mittels einer Inhalationsnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch narkotisiert, das Blut retroorbital entnommen und durch zervikale Dislokation getötet. Das abgenommene Blut wurde 5 min bei 5000 rpm in einem Serumröhrchen zentrifugiert, wodurch das Blut mittels des enthaltenden Trenngels in Blutkuchen und Serum getrennt wird. Das gewonnene Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Des Weiteren wurden das Pankreas, die Milz, die Lunge und die Leber in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung in -80 °C gelagert. Das Pankreas, die Milz und die Lunge wurden ebenfalls für die histologische Auswertung in 4,5 % Formaldehyd-Lösung über Nacht bei 4 °C fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet, sowie direkt in Tissue Tek® cryo-eingebettet.

3.2.2.2 Chronische Pankreatitis

Eine chronische Pankreatitis wurde durch eine 6-stündliche repetitive (dreimal die Woche) intraperitoneale (i.p.) Injektion von Caerulein [50 µg/kg/Körpergewicht] in C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen über einen Zeitraum von 4 Wochen induziert. Die Mäuse hatten jeder Zeit freien Zugang zu Futter und Wasser ad libitum. Nach den 4 Wochen

wurden die Mäuse mittels einer Inhalationsnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch narkotisiert, das Blut retroorbital entnommen und durch zervikale Dislokation getötet. Das abgenommene Blut wurde 5 min bei 5000 rpm in einem Serumröhrchen zentrifugiert, wodurch das Serum gewonnen wurde. Das gewonnene Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Des Weiteren wurden die Milz, die Lunge und die Leber in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung in -80 °C gelagert. Das Pankreas, die Milz und die Lunge wurden ebenfalls für die histologische Auswertung in 4,5 % Formaldehyd-Lösung über Nacht bei 4 °C fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet, sowie direkt in Tissue Tek® cryo-eingebettet.

3.2.3 Histologische Methoden

3.2.3.1 Fixierung von Geweben

Für die Paraffineinbettung wurde das jeweilige Gewebe zügig entnommen und kurz in PBS gewaschen, um grobe Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde das Gewebe in eine Einbettkassette überführt und in 4,5 % Formaldehyd-Lösung gegeben. Das Gewebe wurde maximal über Nacht fixiert und anschließend in das Institut für Pathologie (Friedrich-Löffler-Straße 23c) gebracht, um sie in Paraffin einbetten zu lassen. Für die Cryofixierung wurde das jeweilige Gewebe ebenfalls zügig entnommen und direkt in eine Einbettkassette, in welcher schon Einbettmedium vorgelegt war, überführt. Das Gewebe wurde anschließend nochmals mit Einbettmedium überschichtet. Im Anschluss wurden die Proben langsam in Stickstoff tiefgefroren. Die Fixierung fand erst nach dem Schneiden des Gewebes statt. Hierfür wurden die fertigen Schnitte für 20 min in eiskaltem Aceton bei -20 °C fixiert.

3.2.3.2 Hämatoxylin & Eosin Färbung

Paraffinschnitte mit einer Dicke von 1-2 µm wurden mittels eines Mikrotoms angefertigt. Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte mittels Xylol, Methanol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die anschließende Dehydrierung der Präparate erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und einem Xylol-Bad. Die Schnitte wurden mit VectaMount eingedeckelt.

3.2.3.3 Masson-Goldner Färbung

Paraffinschnitte mit einer Dicke von 1-2 µm wurden mittels eines Mikrotoms angefertigt. Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte mittels Xylol, Methanol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Das Gewebe wurde mit einem Fettstift umrundet. Die weitere Färbung erfolgte in einer feuchten Kammer. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden das Weigerts Hämatoxylin Kit (Merck) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierfür wurde 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit Weigerts Hämatoxylin gefärbt und anschließend 5 min unter fließendem Wasser gespült. Zur weiteren Färbung, wie z.B. das Bindegewebe, wurde ein Masson-Goldner Färbekit (Merck) verwendet. Hierbei wurden die einzelnen Gewebe mit einer Azophloxin-Lösung (10 min), einer Phosphorwolframsäure-Orange-G-Lösung (2 min) und einer Lichtgrün SF-Lösung (4 min) gefärbt. Dabei wurde zwischen den einzelnen Färbeschritten immer 30 s mit einer 1%igen Essigsäurelösung gewaschen. Die anschließende Dehydrierung der Präparate erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und einem Xylol-Bad. Die Schnitte wurden mit VectaMount eingedeckelt. Die Auswertung der Fibrose und der Menge an Azinuszellen sowie Inseln erfolgte mittels des Programms PatternQuant des QuantCenters (3D Histech).

3.2.3.4 Azan nach Heidenhain

Paraffinschnitte mit einer Dicke von 1-2 µm wurden mittels eines Mikrotoms angefertigt. Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte mittels Xylol, Methanol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Für die Färbung wurde das Färbekit Azan nach Heidenhain (Morphisto) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Vorbehandlung der Schnitte wurden sie für 5 min in eine Anilinalkohol-Lösung gegeben. Im Anschluss wurde für 5 min mit Aqua dest. (destilliertes Wasser) gespült und für 45 min bei 60 °C mit Azokarmin gefärbt. Azokarmin dient dazu vorwiegend die Zellkerne anzufärben. Jedoch werden auch weitere Strukturen im Gewebe, wie z.B. das Cytoplasma angefärbt. Im weiteren Verlauf wurde erneut für 5 min mit Aqua dest. gespült, mit Anilinalkohol differenziert bis nur die Zellkerne rot (5 min) waren und mit 1%igen essigsauerm Alkohol (1 min) die Differenzierung gestoppt. Bevor die Schnitte für 3 h mit 5%iger Phosphorwolframsäure gebeizt wurden, wurde erneut für 1 min mit Aqua dest. gewaschen. Nach dem Beizen erfolgte eine erneute Waschung mit Aqua dest. (10 min). Zur Anfärbung kollagener und retikulärer Strukturen erfolgte für 1 h eine Gegenfärbung mit Anilinblau-Orange G1. Im Anschluss wurde ein letztes Mal für 10 min mit Aqua dest. gewaschen. Die anschließende Dehydrierung der Präparate erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und einem Xylol-Bad. Die Schnitte wurden mit VectaMount eingedeckelt.

3.2.3.5 Immunofluoreszenz Färbung

Paraffinschnitte mit einer Dicke von 1-2 µm wurden mittels eines Mikrotoms angefertigt. Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte mittels Xylol, Methanol und einer absteigenden Alkoholreihe bis PBS entparaffiniert. Eine Antigendemaskierung erfolgte durch 30 min Kochen im Dampfdrucktopf mittels 1:10 in Aqua dest. verdünnten Daco Antigenretrieval Puffer. Zur Entfernung der Hintergrundfluoreszenz wurde 20 min mit 1 % Natriumborhydritlösung geblockt und anschließend drei- bis viermal für je 10 min mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden für 1 h in 1xPBS/5 % FCS/0,3 % Triton™ X-100 in einer feuchten Kammer geblockt. Die primäre Antikörperfärbung (1:50 in 1xPBS/1 %FCS/0,3 % Triton™ X-100 gelöst) erfolgte bei 4 °C über Nacht. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 10 min entfernt. Die sekundäre Antikörperfärbung (1:200 in 1xPBS/1 %FCS/0,3 % Triton™ X-100 gelöst) fand für 1 h bei RT im Dunklen statt. Im Anschluss wurde erneut dreimalig mit PBS für je 10 min gewaschen. Die Zellkernfärbung erfolgte mittels einer DAPI-Lösung für 30 s bei RT. Überschüssiges DAPI wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 10 min entfernt und mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt. Cryo-Schnitte wurden direkt ohne Antigendemaskierung verwendet und die restliche Vorgehensweise erfolgte gleichermaßen wie oben beschrieben.

3.2.3.6 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)-Assay

Zur Bestimmung der apoptotischen Zellen wurden Paraffinschnitte verwendet, welche zuerst mittels Xylol, Methanol und einer absteigenden Alkoholreihe bis PBS entparaffiniert wurden. Im Anschluss wurden die apoptotischen Zellen mittels eines TUNEL-Assays bestimmt. Hierfür wurde das Kit ApopTag® Red *In Situ* von der Firma Merck Millipore verwendet und die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Auswertung wurden mindestens 5 randomisierte Bilder pro Schnitt gemacht und durch Zellzählung die prozentuale Apoptoserate bzw. mittels des Programms CellQuant des QuantCenters (3D Histech) bestimmt.

3.2.4 Enzymatische Methoden

3.2.4.1 Gewebepvorbereitung für die Enzymatische Aktivitätsmessung

3.2.4.1.1 Gewinnung von Pankreas- und Azinuszellhomogenaten

Das Pankreasgewebe wurde in PBS mittels eines Douncers der Weite B homogenisiert und zweimal für 10 s mit einem Ultraschallstab (100 Watt, Tastverhältnis 50 %) behandelt. Anschließend wurde die Proben für 10 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Azinuszellen wurden nach Stimulation mit supramaximaler CCK-Zugabe (0,1 µM) in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt, runterzentrifugiert (1800 rpm, 1 min, RT) und der Überstand abdekantiert. Im Anschluss wurden die Azinuszellen mit 1 mL PBS gewaschen, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und die Azinuszellen in 400 µL PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte eine zweimalige Behandlung für 10 s mit einem Ultraschallstab (100 Watt, Tastverhältnis 50 %). Die Proben wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.4.1.2 Subzelluläre Fraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung von Mäusepankreatata wurde anhand der Methode von Tartakoff und Jamieson ¹⁸¹ und von Saluja et al. ⁷⁰ durchgeführt. Dabei werden die Fraktionen ihrer Schwere und Größe nach durch drei verschiedene Zentrifugationsschritte bei 0 °C und einem durch den Homogenisationspuffer entstandenem Sucrosegradienten getrennt. Das Pankreas wurde entnommen und in 1,5 mL eisgekühlten Homogenisationspuffer in einem 50 mL Kolben in ca. 50 kleine Stücke zerschnitten. Die Suspension wurde in ein Douncer-Gefäß überführt und mit 2 Schüben des Douncers der Weite A und anschließend mit 2 Schüben des Douncers der Weite B homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Homogenat bei 150 g für 10 min zentrifugiert. Für DNA-Gehaltsbestimmungen wurden 50 µL des entstandenen Überstandes als sogenanntes „Post Nuclear Supernant“ (PNS) tiefgefroren. Der restliche Überstand wurde bei 470 g für 15 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet stellt das Zymogengranula dar. Der Überstand wurde für weitere 12 min bei 12.200 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet bildet die lysosomal/mitochondrial angereicherte Fraktion und der Überstand die cytosolische Fraktion. Die cytosolische Fraktion wurde noch einmal bei 20.800 g für 5 min scharf abzentrifugieren, um alle mitochondrialen Reste zu entfernen. Die Pellets wurden in 400 µL

PBS aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden die Fraktionen zweimal für 10 s mit einem Ultraschallstab (100 Watt, Tastverhältnis 50 %) behandelt, aliquotiert und in Stickstoff schockgefroren. Für weitere Experimente wurden die Fraktionen bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.4.2 Enzymatische Aktivitätsmessungen

Enzymatische Aktivitäten von Pankreashomogenaten oder subzellulären Fraktionen wurden wie folgt gemessen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine vorzeitige Aktivierung und Degradation der Enzyme zu verhindern. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte fluorometrisch über eine Kinetik von 60 min. Die Messung wurde in dem für das jeweilige Enzym optimalen Puffer unter Zugabe des entsprechenden Substrates (R110-Substrate: Exzitation (Ex) 485 nm, Emission (Em) 520 nm oder AMC-Substrate: Ex 340 nm, Em 460 nm) bei 37 °C durchgeführt. Hierbei wurden die Substrate in einer Endkonzentration im optimalen Puffer wie folgt eingesetzt: Cathepsin B (400 µM), Cathepsin L (30 µM), Trypsin (30 µM), Chymotrypsin (640 µM) und Elastase (35 µM). Zur Vermeidung von Redoxreaktionen wurde bei der Messung der Aktivitäten von Cathepsin B und L zusätzlich 10 mM Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben. Die Aktivitätsmessung erfolgte in einer 96-Well Platte als eine 2- oder 3-fach Bestimmung. Hierbei wurden 10 µL Probe (1:10 bzw. 1:20 in PBS verdünnt) mit 100 µL Messpuffer versetzt. Die Auswertung erfolgte in dem Messbereich des linearen Anstiegs und die Ergebnisse wurden mit dem Proteingehalt der Probe verrechnet.

3.2.4.3 Bestimmung der Amylase- und Lipase-Aktivität im Serum

Zur photometrischen Bestimmung der Amylase- und Lipase-Aktivität im Serum wurden ein Kit der Firma Roche Hitachi verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden 10 µL Probe (1:20 mit PBS verdünnt) mit 90 µL Substratlösung versetzt und eine 30-minütige Kinetik bei 37 °C und einer Wellenlänge von 405 nm (Amylase) bzw. 570 nm (Lipase) gemessen (3-fach Bestimmung). Als Standard diente eine Messung mit aufgereinigter Amylase und Lipase, die kommerziell erhältlich sind. Die Auswertung erfolgte in dem Messbereich des linearen Anstiegs.

3.2.4.4 Myeloperoxidase (MPO)-Bestimmung in Lunge

Das Pankreasgewebe wurde mittels 500 µL MPO-Homogenisierungspuffer mit einem Douncer der Weite B homogenisiert. Jeweils 100 µL des Homogenats wurden für Proteinkonzentrationsbestimmung abgenommen und zweimal für 10 s mit einem Ultraschallstab (100 Watt, Tastverhältnis 50 %) behandelt. Anschließend wurden die Homogenate bei 10.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C bis zur Proteinbestimmung weggefroren. Die restliche Probe wurde ebenfalls bei 10.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 500 µL MPO-Extraktionspuffer aufgenommen und mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze resuspendiert. Anschließend wurden die Proben in Stickstoffschockgefroren, wieder bei 37 °C in einem Heizblock aufgetaut und erneut mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze resuspendiert. Dieser Vorgang erfolgte viermalig und dabei wurde die Pipettenspitze immer etwas weniger abgeschnitten, bis sie zum Schluss nicht mehr abgeschnitten wurde. Im Anschluss wurden die Proben zweimal für 10 s mit einem Ultraschallstab (100 Watt, Tastverhältnis 50 %) behandelt und bei 10.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die MPO-Bestimmung abgenommen und bei -80 °C weggefroren. Zur photometrischen Bestimmung der Enzymkinetik wurde 10 µL des Überstandes (1:5 verdünnt mit MPO-Messpuffer) mit 90 µL MPO-Substratlösung versetzt und eine 10-minütige Kinetik bei 30 °C und einer Wellenlänge von 460 nm gemessen (3-fach Bestimmung). Als MPO-Standard diente aufgereinigte Myeloperoxidase. Die Auswertung erfolgte in dem Messbereich des linearen Anstiegs und die Ergebnisse wurden mit dem Proteingehalt der Probe verrechnet.

3.2.4.5 Präparation lebender Azini

Die Mäuse wurden über Nacht gefastet mit freiem Zugang zu Wasser ad libitum. Mittels einer Inhalationsnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch wurden diese narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Präparation erfolgte nach einer nach Grosfils et al. und Krüger et al. modifizierten Methode^{182,183}. Anschließend wurde das Pankreas entnommen und in 6 mL Isolationsmedium (37 °C, angereichert mit Sauerstoff und leicht mit HCl angesäuert), welches mit 1 mg Collagenase versetzt war, gegeben. Das Pankreas wurde in ca. 2-3 mm große Stücke zerschnitten und 15 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad (100 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abdekantiert, mit frischen 6 mL Collagenase-haltigen Isolationsmedium aufgefüllt und erneut die Pankreasfragmente zerschnitten. Es erfolgte nochmals eine Inkubation für 15 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad (100 rpm). Durch den Collagenase-Verdau werden die Azinuszellen aus dem

Pankreas gewonnen. Die Auslösung der Azinuszellen aus dem Zellverband erfolgte durch mehrmaliges Resuspendieren mittels Pipettenspitzen mit abnehmenden Durchmessern. Die Zellsuspension wurde durch eine zweilagige Mullbinde filtriert und bei 1800 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in frischem Collagenase-freiem Isolationsmedium gewaschen und erneut bei 1800 rpm für 1 min zentrifugiert. Nach nochmaligem Dekantieren und Resuspendieren in Collagenase-freiem Medium wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C und 40-50 rpm äquilibriert.

3.2.4.6 Messung intrazellulärer Proteaseaktivität in lebenden Azini

Für die Messung wurde eine 96-Well Platte mit einem Flachboden verwendet. Die Azinuszellen wurden pro Maus auf zwei Kolben mit je 5 mL Isolationsmedium aufgeteilt. Die Stimulation der Zellen erfolgte mittels supramaximaler CCK-Zugabe (0,1 µM). Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Es wurden je 1 mL Zellsuspension abgenommen, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 s bei 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen in Messmedium (versetzt mit R110-/AMC-Substrat und 5 µg/mL Propidiumiodid) resuspendiert. Hierbei wurden die Substrate in einer Endkonzentration wie folgt eingesetzt: Cathepsin B (133 µM), Cathepsin L (90 µM), Trypsin (10 µM) und Elastase (12 µM). Anschließend wurde erneut für 30 s bei 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde als Leerwert verwendet. Im Anschluss wurde mit Messmedium aufgefüllt, die Zellen resuspendiert und auf die 96-Well Platte transferiert. Die Proteaseaktivierung und die Startnekrose wurde mittels einer Enzymkinetik über einen Zeitraum von 60 min bei 37 °C (R110-Substrate: Ex 485 nm, Em 520 nm; AMC-Substrate: Ex 340 nm, Em 460 nm; Propidiumiodid: Ex 350 nm, Em 630 nm; 3-fach Bestimmung) gemessen. Die Bestimmung der Endnekrose erfolgte über eine Endpunktmessung (Propidiumiodid: Ex 350 nm, Em 630 nm). Hierfür wurden die Zellen mit 90 µL 10%igen Triton X-100 lysiert, für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend gemessen. Die Auswertung der Enzymaktivität fand in Relation zur Nekroserate statt. Die Nekroserate wurde als prozentuale Relation zur Gesamtzellkernzahl dargestellt. Zusätzlich zu den *ex vivo* Versuchen in lebenden Azinuszellen wurden die Azinuszellen nach supramaximaler CCK-Stimulation in PBS homogenisiert und in den Homogenaten die Enzymaktivitäten (s. 3.2.4.1.1 und 3.2.4.2) gemessen.

3.2.5 Proteinchemische Methoden

3.2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das Bradford-Kit von der Firma BioRad verwendet und die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Hierfür wurde 10 µL Probe (1:100 in PBS verdünnt) mit 190 µL Bradford Reagenz (1:5 in Aqua dest. verdünnt) versetzt (3-fach Bestimmung) und 5 min im Dunklen bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte gegen einen Bovinen Serumalbumin (BSA)-Standard bei einer Wellenlänge von 595 nm.

3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Kit

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit von der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet und die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Hierfür wurde 10 µL Probe (1:100 in PBS verdünnt) mit 200 µL BCA Working Reagent versetzt (3-fach Bestimmung) und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte gegen einen BSA-Standard bei einer Wellenlänge von 595 nm.

3.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Diese wurde erstmals von Laemmli beschrieben ¹⁸⁴.

Hierfür wurde zuerst das Pankreasgewebe homogenisiert und für 10 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden sie zweimal für 10 s mit einem Ultraschallstab (100 Watt, Tastverhältnis 50 %) behandelt. Des Weiteren wurden die Proben mittels subzellulärer Fraktionierung gewonnen (s. 3.2.4.1.2). Im Anschluss wurden die Proben in einem Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Puffer versetzt, 5 min auf 95 °C erhitzt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Vorab erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels der Bradford-Methode bzw. eines BCA-Kits. Anschließend wurde ein Trenngel gegossen, welches mit Isopropanol überschichtet wurde, bis es vollständig auspolymerisiert war. Nach dem Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel gegossen.

Tabelle 11: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Trenngele.

	8 %	10 %	12 %	15 %
Aqua dest.	4,6 mL	4,0 mL	3,3 mL	2,3 mL
Polyacrylamid (30 %)	2,7 mL	3,3 mL	4,0 mL	5,0 mL
Tris pH 8,8 (1,5 M)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
SDS (10 %)	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
APS (10 %)	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	6,0 µL	4,0 µL	4,0 µL	4,0 µL
Endvolumen	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL

Tabelle 12: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Sammelgel.

	5 %
Aqua dest.	6,8 mL
Polyacrylamid (30 %)	1,7 mL
Tris pH 6,8 (1 M)	1,25 mL
SDS (10 %)	0,1 mL
APS (10 %)	0,1 mL
TEMED	10,0 µL
Endvolumen	10,0 mL

Das Gel wurde mit 50 µg Protein beladen und lief ca. 2,5 h bei konstanten 80 V im Tris-SDS-Glycin-Puffer. Als Proteinmarker diente 5 µL des PageRule Prestained Protein Ladders von Thermo Fisher Scientific.

3.2.5.4 Proteintransfer mittels Immunoblotting (Western Blot)

Im Anschluss erfolgte der Transfer (30 min bei 25 V und 0,6 mA) mittels eines Semi-Dry Transfer Systems auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm). Hierfür wurden vier Filterpapiere (getränkt in Towbin Transfer Puffer), die Membran, das SDS-Gel und erneut vier Filterpapiere (getränkt in Towbin Transfer Puffer) in eine Art Sandwich in die Blotkammer gelegt. Nach dem Blotten wurde der Transfer mittels einer reversiblen Färbung mit einer Ponceau S Lösung überprüft. Anschließend wurde für 1 h in NET-Gelantine Block Puffer auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Nach dem Blocken erfolgte eine

Inkubation im primären Antikörper (1:1000 in NET-Gelatine Block Puffer) auf einem Schüttler bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran 6-8-mal mit NET Waschpuffer für je 5 min gewaschen. Im Anschluss wurde 1 h bei RT schüttelnd im sekundäre Antikörper (ca. 1:16000 in NET-Gelatine Block Puffer) inkubiert, gefolgt von einer Entfernung von überschüssigen Antikörper mittels erneuter Waschung (6-8-mal mit NET Waschpuffer für je 5 min). Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenzreaktion (Pierce ECL-Kits, Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers in einem Photoimager (Fusion Fx Vibler Lourmat).

3.2.5.5 Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wurde über Nacht in Coomassie Färbepuffer inkubiert. Im Anschluss wurde die Färbelösung entfernt und ca. 60 min in Entfärberlösung inkubiert. Hierbei wurde mehrfach die Entfärberlösung ausgetauscht. Das gefärbte SDS-Gel wurde visuell betrachtet und mittels eines Photoimagers dokumentiert.

3.2.6 In vitro Experimente

3.2.6.1 Degradation von Cystatin C durch Trypsin

Rekombinantes Cystatin C (25 µg/mL in VE-Wasser [murine] bzw. in 20 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2 [humane]) wurde mit reinem bovines Trypsin (0,1 µg/mL in Trypsin-Messpuffer) für unterschiedliche Zeitpunkte (0 min, 0,5 min, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min, 30 min und 60 min) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Des Weiteren wurde auch nur Cystatin C sowie Trypsin zusammen mit Cystatin C und dem Trypsin-Inhibitor Nafamostat (2 mM in VE-Wasser) für 60 min im Wasserbad inkubiert. Jede Probe wurde zu dem jeweiligen Zeitpunkt aus dem Wasserbad genommen, mit 1:1 Laemmli-Puffer versetzt und in Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden die Proben 5 min auf 95 °C erhitzt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Analyse wurden die Proben per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit einem Peroxidase-Streptavidinkonjugierten Antikörper detektiert (s. 3.2.5.3 und 3.2.5.4) oder mittels einer Coomassie-Färbung (s. 3.2.5.5) dargestellt.

3.2.6.2 Enzymatische Aktivitätsmessung von CTSB und CTSL mit Trypsin und degradierten Cystatin C

Rekombinantes Cystatin C (25 µg/mL in VE-Wasser Wasser [murine] bzw. in 20 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2 [humane]) wurde mit reinem bovines Trypsin (0,1 µg/mL in Trypsin-Messpuffer) für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Weiterhin wurde auch Trypsin und Cystatin C allein für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurde 10 µL rekombinantes Cathepsin B (1 µg/mL in Natriumacetat-Puffer pH 5,0 [murine] bzw. PBS (pH 7,4), 10% Glycerol [humane]) oder 10 µL rekombinantes Cathepsin L (1 µg/mL in Natriumacetat-Puffer pH 5,0) mit 10 µL Cystatin C, Trypsin oder prozessierten Cystatin C versetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte fluorometrisch über eine Kinetik von 60 min. Die Messung wurde in dem für das jeweilige Enzym optimalen Puffer bei pH 3-8 (CTSB) bzw. pH 2-6 (CTSL) unter Zugabe des entsprechenden Substrates (R110-Substrate: Exzitation (Ex) 485 nm, Emission (Em) 520 nm oder AMC-Substrate: Ex 340 nm, Em 460 nm) bei 37 °C durchgeführt. Hierbei wurden die Substrate in einer Endkonzentration im optimalen Puffer wie folgt eingesetzt: Cathepsin B (400 µM) und Cathepsin L (30 µM). Zur Vermeidung von Redoxreaktionen wurde bei der Messung zusätzlich 10 mM Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben. Die Aktivitätsmessung erfolgte in einer 96-Well Platte als eine 2-fach Bestimmung. Hierbei wurden 20 µL Probe mit 100 µL Messpuffer versetzt. Die Auswertung erfolgte in dem Messbereich des linearen Anstiegs.

3.2.7 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde das Computerprogramm GraphPad Prism 5.04 verwendet. Die statistische Unterschiede in den Mittelwerten zwischen zwei Gruppe wurde mittels des ungepaarten student's t-Test bestimmt. Bei keiner Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U Test angewendet. Wenn der p-Wert unter dem Wert 0,05 lag, war die Differenz zwischen beiden Gruppen statistisch signifikant und wurden mit einem Sternchen (*) markiert. Alle Daten in den Ergebnissen sind als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM) dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Lokalisierung von Cystatin C und aktivem CTSB im sekretorischen Kompartiment

Die lysosomale Protease Cathepsin B (CTSB) spielt eine entscheidende Rolle in der Pankreatitis, da sie die Aktivierung von inaktivem Trypsinogen zu aktivem Trypsin prozessiert. Folglich kann Trypsin die restliche Proteasekaskade induzieren, was schlussendlich im Selbstverdau des Pankreas durch seine eigenen Proteasen resultiert. Cystatin C gehört zu den endogenen Inhibitoren der lysosomalen Cysteinproteasen. Dadurch hat es eine wichtige Funktion als Regulator der Aktivität dieser Proteasen. Es gibt auch weitere endogene Inhibitoren, wie z.B. Cystatin B. Cystatine agieren intra- und extrazellulär und bilden enge reversible Komplexe mit ihren Zielenzymen. Aus diesem Grund haben wir untersucht in welchen subzellulären Kompartiment Cystatin C und aktives Cathepsin B unter physiologischen Bedingungen sowie während der Pankreatitis lokalisiert sind. Hierfür wurde in C57BL6/J Wildtyp Mäusen eine Pankreatitis mittels einer supra-maximalen Injektion von Caerulein in einer Konzentration von 50 µg/kg Körpergewicht induziert. Caerulein ist ein Analogon des Cholecystokinins (CCK). Durch Gabe von Caerulein oder CCK kommt es sowohl in isolierten Azinuszellen als auch im Tiermodell zu einer Sekretionsblockade. Dies führt zu einer intrazellulären Proteaseaktivierung und somit zur Induktion einer Pankreatitis. 1 h nach Caerulein-Stimulation wurden die Pankreata entnommen und eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt, unbehandelte Tiere dienten als Kontrollen. Dabei werden die unterschiedlichen subzellulären Kompartimente mittels einer Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch spezifische Marker überprüft. Synollin diente als Marker der Zymogengranula und wurde ausschließlich in der schweren Fraktion detektiert. Der lysosomale Marker LIMP-2 (Lysosomal-integral membrane protein 2) wurde hauptsächlich in der Lysosomen enthaltenden Fraktion (Lys) gefunden. Als Marker für die cytosolische Fraktion diente GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), welche ausschließlich in der cytosolischen Fraktion detektiert werden konnte. Auf Proteinebene zeigte die Western Blot-Analyse der subzellulären Fraktionen eine deutliche Umverteilung der aktiven, 33 kDa großen Form von Cathepsin B in die Zymogengranula-Fraktion (ZG). Der Inhibitor Cystatin C war lediglich in den Zymogengranula vorhanden, während Cystatin B nur im Cytosol (Cyt) nachgewiesen wurde (Abb. 8A). Auch mittels Immunofluoreszenzfärbungen konnten wir zeigen, dass Cystatin C in den Zymogengranula von Azinuszellen lokalisiert ist. Hierbei diente Amylase als Marker der Zymogengranula-haltigen Fraktion (Abb. 8B).

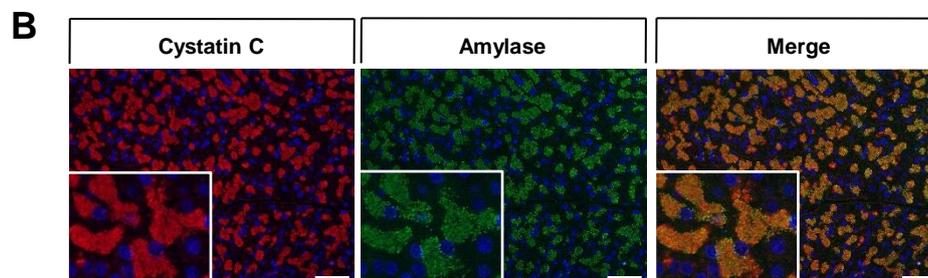
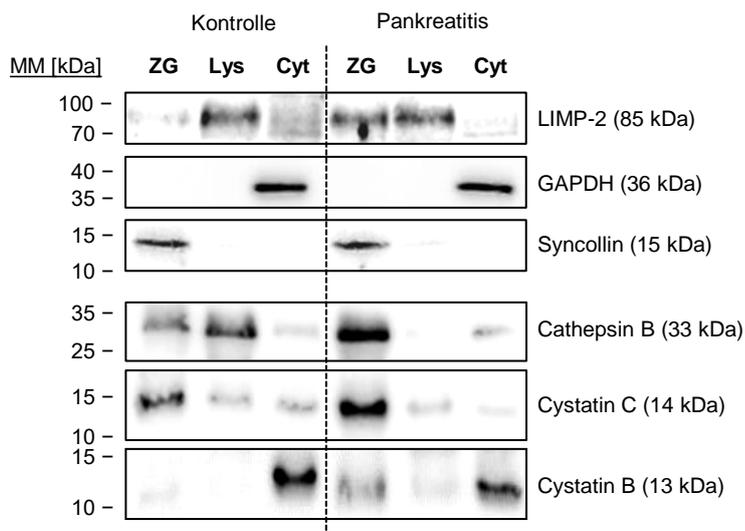
A *Mausmodell der Pankreatitis:*

Abb. 8: Lokalisierung von Cystatin C und aktivem CTSB im sekretorischen Kompartiment im Mausmodell der akuten Pankreatitis. Die subzellulären Fraktionierungsexperimente zeigen eine deutliche Expression von Cystatin C als auch aktivem Cathepsin B in der schweren Zymogengranula-haltigen Fraktion (ZG) von murinen Azinuszellen. Der Inhibitor Cystatin C war ausschließlich in ZG vorhanden, während Cystatin B nur im Cytosol (Cyt) nachgewiesen wurde. Dabei dienten Syncollin (ZG), GAPDH (Cyt) und LIMP-2 (Lys) als Marker der Reinheit der Fraktionen (A). Immunfluoreszenzfärbungen von isolierten Azinuszellen bestätigten unsere Ergebnisse, dass Cystatin C in Zymogengranula vorhanden ist (B). Die Proteingrößen sind in absoluter Molekülmasse (MM) angegeben. Die Maßstableiste entspricht 50 µm.

Um zu überprüfen, ob unsere Beobachtungen auch eine klinische Bedeutung haben könnten, haben wir mit Hilfe von Pankreassekret und Gewebeschnitten von Patienten mit einer chronischen Pankreatitis die Expression von Cystatin C untersucht. Hierfür haben wir Western Blot-Analysen des Pankreassekrets durchgeführt, um dies auf Proteinebene zu analysieren. Das Pankreassekret ist eine Flüssigkeit, welche vom Pankreas abgesondert wird. Diese enthält eine Vielzahl von sekretorischen Enzymen, wie z.B. Amylase oder auch Lipasen und Pro-Enzyme (Chymotrypsinogen, Trypsinogen, Pro-Elastase und Pro-Carboxypeptidase). Außerdem haben wir Pankreasschnitte der Patienten mit chronischer Pankreatitis immunofluorometrisch gefärbt. Die Western Blot-Analysen vom Pankreas-

sekret von Patienten mit chronischer Pankreatitis zeigten deutlich, dass bereits aktives Cathepsin B, sowie Cystatin C sekretiert werden und somit im sekretorischen Kompartiment vorhanden sein müssen. Amylase diente als Marker für die Proteine des sekretorischen Kompartiments. Die Probe des Patienten 1611 zeigte keine Amylase, was dafürspricht, dass die Enzyme in dieser Probe bereits degradiert waren. Weiterhin konnte kein Cystatin B in dem humanen Pankreassekret nachgewiesen werden (Abb. 9A). Zusätzlich konnten wir in humanen Pankreasschnitten eine starke Expression von Cystatin C in den Zymogengranula nachweisen (Abb. 9B).

A Humane Proben:

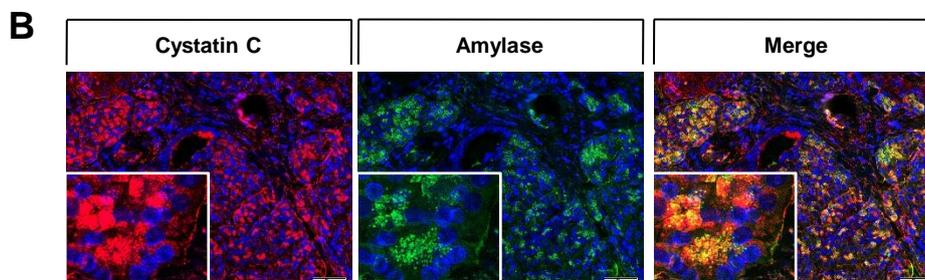
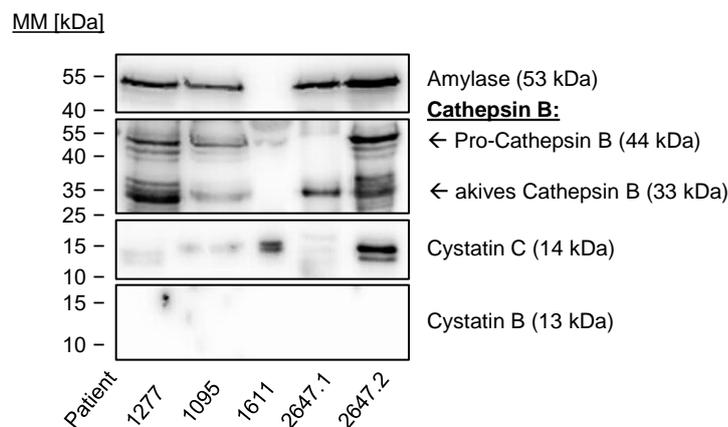


Abb. 9: Lokalisierung von Cystatin C und aktivem CTSB im sekretorischen Kompartiment im humanen Modell. Western Blot-Analysen von dem Pankreassekret von chronischen Pankreatitis Patienten (A) und Immunfluoreszenzfärbungen (B) von humanen Proben chronischer Pankreatitis Patienten zeigten eine klare Lokalisierung von Cystatin C und aktivem CTSB im sekretorischen Kompartiment des Menschen. Dabei diente Amylase als Marker des sekretorischen Kompartiments. Die Proteingrößen sind in absoluter Molekülmasse (MM) angegeben. Die Maßstabsleiste entspricht 50 μ m.

4.2 Subzelluläre Umverteilung pankreatischer Proteasen

Die akute Pankreatitis ist gekennzeichnet durch eine vorzeitige Aktivierung der pankreatischen Verdauungsenzyme noch innerhalb des Pankreas, wodurch es zu einem enzymatischen Verdau der Azinuszellen kommt. Die intrazelluläre Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin durch die lysosomale Protease Cathepsin B (CTSB) findet innerhalb des gleichen Kompartiments statt. Ein Gegenspieler von CTSB ist die lysosomale Protease Cathepsin L (CTSL). CTSL ist in der Lage aktives Trypsin zu degradieren. Ein pathophysiologischer Stimulus führt zu einer Sekretionsblockade, wodurch Trypsinogen und CTSB co-lokalisieren können. Das aktive Trypsin kann schließlich weitere Proteasen, wie z.B. Chymotrypsinogen zu Chymotrypsin, aktivieren. Durch Gabe einer supra-maximalen Konzentration (50 µg/kg Körpergewicht) von Caerulein in C57BL6/J Wildtyp Mäusen erfolgte eine Induktion einer experimentellen Pankreatitis. Die Pankreata wurden von unbehandelten Mäusen, sowie 1 h und 8 h nach der ersten Caerulein-Injektion entnommen und mittels einer Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in ihre einzelnen Kompartimente aufgetrennt. Die Proteaseaktivität von Cathepsin B (pH 5,5), Cathepsin L (pH 4), Trypsin (pH 8) und Chymotrypsin (pH 8) wurde unter Verwendung fluorogener Substrate bei ihrem optimalen pH-Wert bestimmt.

Sowohl Cathepsin B als auch Cathepsin L zeigten unter physiologischen Bedingungen eine überwiegende Aktivität in Lysosomen. Jedoch konnte auch schon unter physiologischen Bedingungen eine kritische Menge an aktiven CTSB und CTSL in den Zymogengranula beobachtet werden. Während der akuten Pankreatitis beobachteten wir einen dramatischen Verlust der CTSB- und CTSL-Aktivität in der lysosomalen Fraktion. Weiterhin stieg die CTSB-Aktivität nach 1 h in der Zymogengranula-enthaltenden Fraktion leicht, während die CTSL-Aktivität keinen signifikanten Unterschied zeigte. Im Vergleich zu einer 1 h Caerulein-Injektion konnten wir nach 8 h wieder einen leichten Anstieg der Aktivitäten von CTSB und CTSL in der Lysosomen-haltigen Fraktion und einen leichten Abfall bzw. eine gleichbleibende Aktivität in der Zymogengranula-haltigen Fraktion beobachten. Im Cytosol ließen sich keine bedeutenden Änderungen in der Aktivität von CTSB und CTSL feststellen. Im Gegensatz zur Aktivität der lysosomalen Enzyme befand sich die Aktivität von Trypsin und Chymotrypsin ausschließlich in den Zymogengranula und stieg nach Beginn (1 h) der Erkrankung signifikant an. Nach 8 h blieb die Trypsinaktivität hoch, jedoch hatte sie sich überwiegend in die lysosomale Fraktion verschoben (Abb. 10).

Subzelluläre Umverteilung der Pankreasenzym-Aktivitäten:

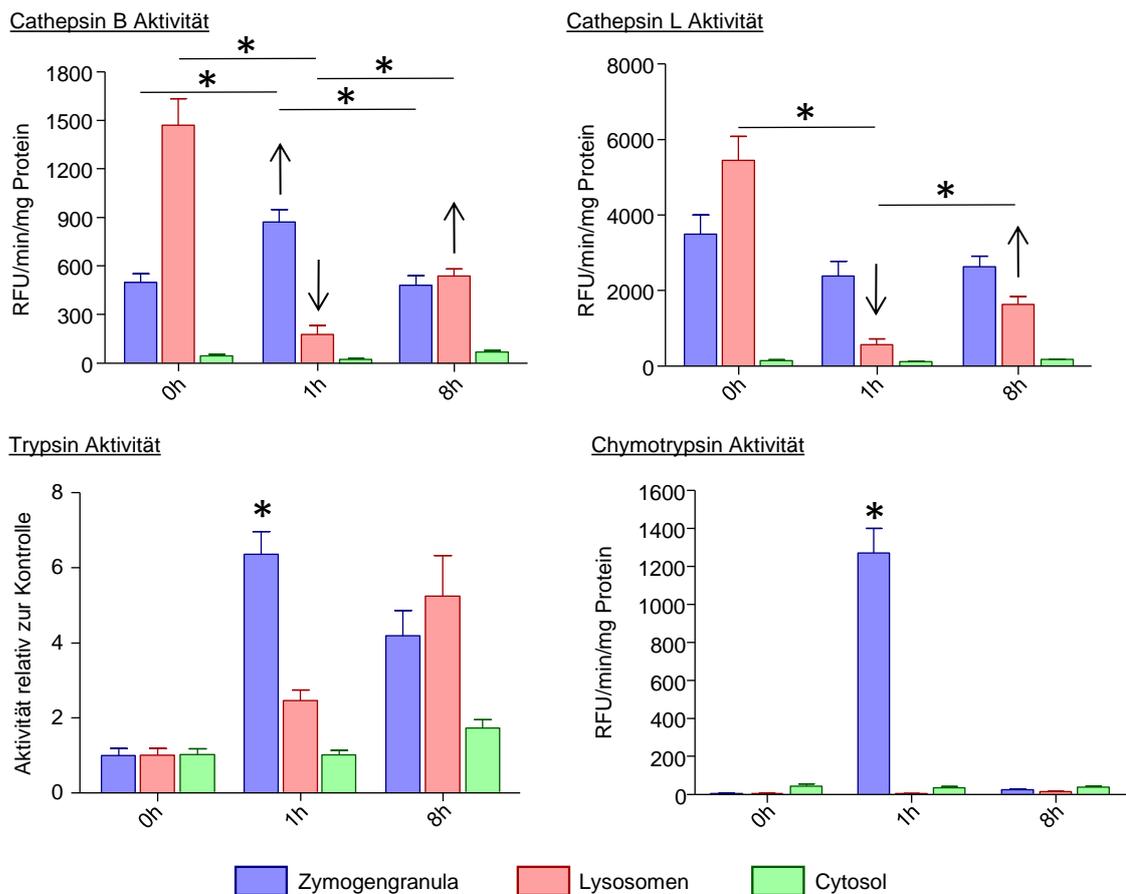


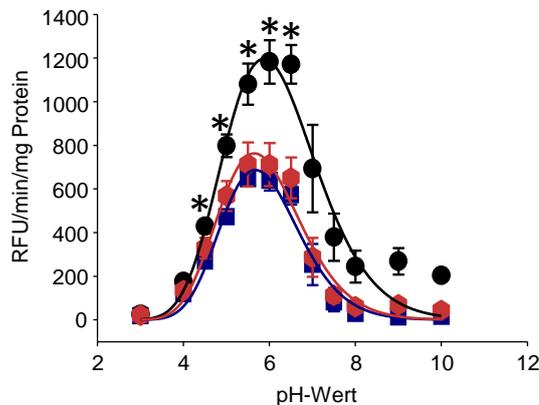
Abb. 10: Subzelluläre Umverteilung der Pankreasenzym-Aktivitäten in C57BL6/J Wildtyp Mäusen während Caerulein-induzierter Pankreatitis (0 h, 1 h, 8 h). Es wurden mittels enzymatischer Messung die Aktivitäten von CTSB (AMC-Arg-Arg), CTSL (R110-Phe-Arg), Chymotrypsin (AMC-Phe-Pro-Ala-Ala-Suc) und Trypsin (AMC-Arg-Ala-Gln-Boc) bestimmt. Physiologisch überwiegte die Cathepsin B- und Cathepsin L-Aktivität in der lysosomalen Fraktion. Die CTSB-Aktivität stieg nach 1 h Caerulein-Stimulation in der zymogenhaltigen sekretorischen Fraktion an. Im Gegensatz dazu stiegen die Chymotrypsin-Aktivität sowie die Trypsin-Aktivität ausschließlich in der Zymogengranula-Fraktion nach 1 h Caerulein-Stimulation an. Nach 8 h überwiegte die Trypsin-Aktivität in der lysosomalen Fraktion. Alle Daten in den Ergebnissen wurden als Duplikate gemessen und gezeigt sind die biologischen Replikate (n= 4) als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM). Hierbei sind die signifikanten Veränderungen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Die Messungen der Cathepsin B-Aktivität innerhalb der mit Zymogengranula-angereicherten Fraktion zeigten die pH-Abhängigkeit des Enzyms, mit einem klaren Optimum bei einem sauren pH-Wert von 5 bis 6. Nach 1 h stieg die Aktivität von CTSB an und zeigte auch eine höhere Aktivität bei einem neutralem pH-Wert. Nach 8 h zeigte das Aktivierungsmuster von CTSB in den Zymogengranula das gleiche Verhalten wie unter

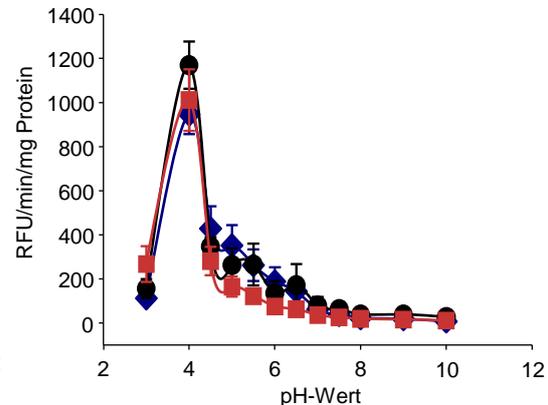
physiologischen Bedingungen. Die Cathepsin L-Aktivität zeigte keinen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Trypsin-Aktivität zeigte ebenfalls eine pH-Abhängigkeit bei neutralem pH-Wert. Nach 1 h und 8 h stieg die Aktivität von Trypsin signifikant an, wobei sie die höchste Aktivität nach 1 h zeigte (Abb. 11A). In einem zweiten Experiment wollten wir nachweisen, ob die cytosolische Fraktion, welche Cystatin B enthält, in der Lage ist, die CTSB-Aktivität zu reduzieren. Hier konnten wir eindeutig zeigen, dass die cytosolische Fraktion die CTSB-Aktivität unter neutralem pH-Wert hemmt, nicht aber unter sauren Bedingungen. Nach 8 h zeigte das Aktivierungsmuster von CTSB wieder das gleiche Verhalten wie unter physiologischen Bedingungen (Abb. 11B).

A pH-abhängige Aktivität in Zymogengranula:

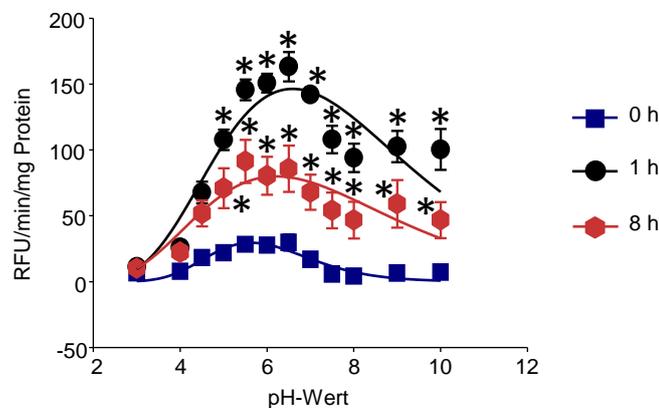
Cathepsin B Aktivität in Zymogengranula



Cathepsin L Aktivität in Zymogengranula



Trypsin Aktivität in Zymogengranula



B pH-abhängige Aktivität in Zymogengranula mit cytosolischer Fraktion:

Cathepsin B Aktivität in Zymogengranula + Cytosol

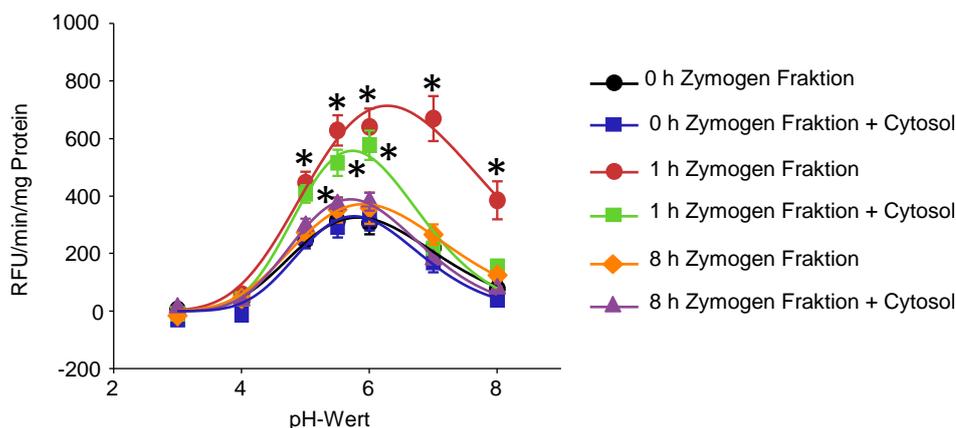


Abb. 11: Die Cathepsin B-Aktivität in Zymogengranula ist pH-abhängig. Es wurden mittels enzymatischer Messungen die Aktivitäten von CTSB (AMC-Arg-Arg), CTSL (R110-Phe-Arg), und Trypsin (AMC-Arg-Ala-Gln-Boc) in einem pH-Bereich von pH 3-10 (A) bzw. pH 3-8 (B) bestimmt. Die Cathepsin B-Aktivität innerhalb der mit Zymogengranula-angereicherten Fraktion stieg nach 1 h signifikant an und zeigte eine hohe Aktivität zwischen pH 5-7. Nach 8 h ließ sich eine ähnliche CTSB-Aktivität wie unter physiologischen Bedingungen beobachten. Die Cathepsin L-Aktivität zeigte keinen

Unterschied zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Trypsin-Aktivität zeigte ein ähnliches Verhalten wie die CTSB-Aktivität, wobei die Trypsin-Aktivität auch nach 8 h signifikant höher war als unter physiologischen Bedingungen (A). In einem zweiten Experiment konnten wir eindeutig zeigen, dass die cytosolische Fraktion die CTSB-Aktivität unter neutralem pH-Wert hemmt, nicht aber unter sauren Bedingungen. Nach 8 h zeigte sich kein Unterschied in der CTSB-Aktivität im Vergleich zu den physiologischen Bedingungen (B). Die biologischen Replikate (n= 4) sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) gezeigt. Hierbei sind die signifikanten Veränderungen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet

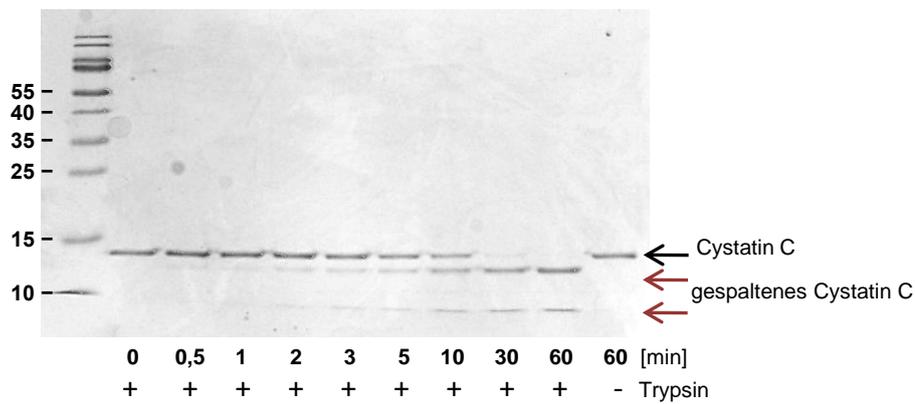
4.3 Degradation von Cystatin C durch Trypsin stabilisiert die Cathepsin B-Aktivität

Cystatin C ist ein potenter Inhibitor von Cathepsin B (CTSB) mit der Funktion die CTSB-Aktivität intrazellulär zu regulieren. Trypsin gehört zu den vom Pankreas sekretierten Verdauungsenzymen und ist in der Lage andere Protease zu aktivieren. Jedoch wird hierfür eine vorherige Aktivierung des Trypsinogens zu Trypsin durch CTSB benötigt. Dies stellt den pathophysiologischen Beginn der Pankreatitis dar. Wir wollten untersuchen, ob Trypsin in der Lage ist, Cystatin C zu degradieren. Hierfür haben wir rekombinante bzw. reine Enzyme *in vitro* verwendet, um somit unerwünschte Mechanismen ausschließen zu können. Dabei wurde murines oder humanes Cystatin C mit bovinem Trypsin unter optimalen Bedingungen für Trypsin (100 mM Tris, 5 mM CaCl₂, pH 8) über eine Zeit von 0-60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

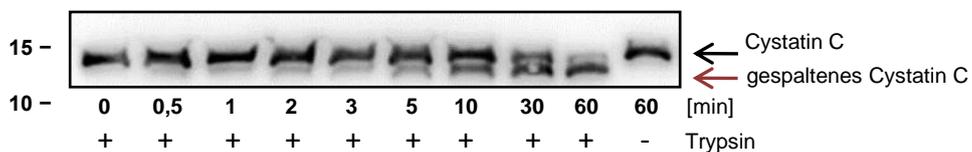
Hier konnten wir eindeutig beobachten, dass murines sowie humanes rekombinantes Cystatin C durch aktives Trypsin zeitabhängig prozessiert wird. Die Coomassie-Färbung des murinen Cystatin C zeigte zwei unterschiedliche Spaltprodukte, wobei nach 60 min fast kein ungespaltenes Cystatin C mehr zu detektieren war. Weiterhin konnten wir zeigen, dass nach 60 min bei 37 °C das Cystatin C nicht selbst degradiert, wenn es nicht mit Trypsin inkubiert wird. In der Western Blot-Analyse konnten wir nur das größere Spaltprodukt beobachten (Abb. 12A). Beim humanen Cystatin C konnten wir einen ähnlichen Verlauf erkennen. Jedoch konnten wir sowohl in der Coomassie-Färbung als auch in der Western Blot-Analyse, nur das größere Spaltprodukt nachweisen. Des Weiteren war die Degradation von humanen Cystatin C durch Trypsin weniger eindeutig als bei dem murinen Cystatin C. Dennoch konnten wir mit dem synthetisch hergestellten Trypsin-Inhibitoren Nafamostat zeigen, dass Trypsin gehemmt wird und wir wieder das nicht degradierte Cystatin C detektieren können (Abb. 12B).

A Murines Cystatin C:

Coomassie Färbung

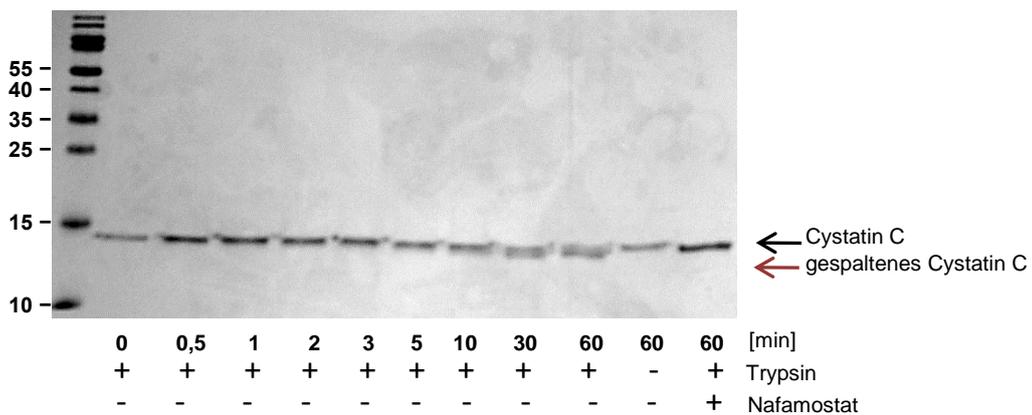


Western Blot Anti-Cystatin C



B Humanes Cystatin C:

Coomassie Färbung



Western Blot Anti-Cystatin C

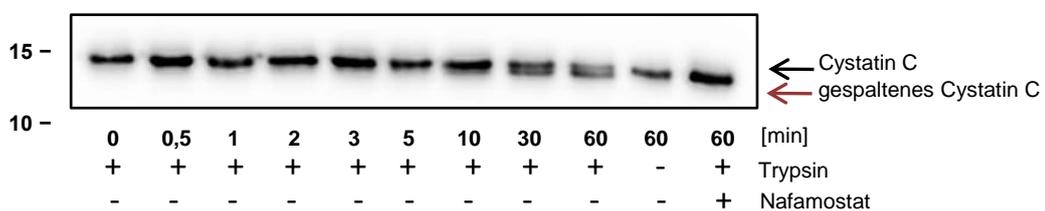


Abb. 12: Rekombinantes Cystatin C wird durch aktives Trypsin zeitabhängig prozessiert. Die Coomassie-Färbungen sowie Western Blot-Analysen zeigten, dass murines (A) und humanes (B) Cystatin C über eine Zeit von 0-60 min von aktiven Trypsin degradiert wird. Dabei konnten zwei spezifische Fragmente in der Coomassie-Färbung von murinen Cystatin C beobachtet werden. Die Western Blot-Analyse zeigte nur ein Spaltprodukt (A). Gleiches konnten wir für humanes Cystatin C beobachten. Jedoch konnten wir in der Coomassie-Färbung, sowie in der Western Blot-Analyse nur

das größere spezifische Fragment nachweisen. Eine zusätzliche Inkubation mit dem synthetischen Serinproteaseinhibitor Nafamostat führte zu einer Hemmung des Trypsins und somit ließ sich ungespaltenes Cystatin C detektieren (B). Für das murine Cystatin C (A) und das humane Cystatin C (B) konnten wir zeigen, dass nach 60 min bei 37 °C ohne Trypsin-Inkubation keine Degradation von Cystatin C stattfindet.

Trypsin hat eine spezifische Schnittstelle an Lysin und Arginin. Die Spaltung wird unterdrückt, wenn diese beiden Aminosäuren neben einem Prolin liegen. Posttranslationale Modifikationen sind in den Sequenzen grün hinterlegt. Cystein und Methionin sind durch ihre thiolhaltige Seitenkette besonders anfällig für Oxidationsprozesse (Abb. 13A und B). Jedoch sind für das Cystatin C Protein keine posttranslationalen Modifikationen beschrieben. Die gelb unterlegten Sequenzen zeigen die übereinstimmenden Bereiche mit der bekannten Sequenz von murinen Cystatin C. Die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Elke Hammer (Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Universitätsmedizin Greifswald) hat für uns MS/MS-Analysen des großen Schnittfragments von murinen Cystatin C und den unbehandelten murinen Cystatin C durchgeführt. Dabei war die Bande des prozessierten Cystatin C etwas intensiver, daher wurden mehr Spektren bei insgesamt höherer Intensität gemessen. Es wurden zwei verschiedene Messungen bei variierender Gradientenlänge durchgeführt. Anhand der Messungen ergab sich eine theoretische Masse von 6039,15 Da für das Fragment des murinen Cystatin C. Die gelb unterlegten Sequenzen zeigen die Sequenzen, die im unbehandelten (Abb.13 A) und im prozessierten (Abb. 13 B) Cystatin C per MS/MS-Analyse ermittelt werden konnten. Die Spaltungsregion liegt zwischen den Aminosäuren (AS) 66-74 und zwar am Arginin (R). Hierbei kommen zwei Arginine in Frage und sind jeweils mit einer Schere markiert (Abb. 13B). Die Intensität für die N-terminale Sequenz (AS 29-65) war höher in dem prozessierten Cystatin C (60 min) im Vergleich zu dem unbehandelten Cystatin C (0 min). Im Gegensatz dazu zeigte sich im unbehandelten Cystatin C eine höhere Intensität für den C-Terminus (AS 72-129) (Abb. 13C). Bei den einzelnen Aminosäure-Sequenzen, die in dem MS/MS-Spektrum festgestellt werden konnten, ließen sich unterschiedlich starke Intensitäten für die einzelnen Aminosäureabschnitte registrieren. Dabei waren die AS-Sequenzen 29-45 und 46-65 in dem prozessierten Cystatin C am stärksten vertreten. Weiterhin konnte die AS 45-65 nicht in dem unbehandelten Cystatin C gefunden werden. Für das unbehandelten Cystatin C zeigte sich die stärkste Intensität für die Region der AS 46-56 im MS/MS-Spektrum. Darüber hinaus konnten auch hohe Intensitäten für AS 29-45 und 57-65 beobachtet werden (Abb. 13D).

MS/MS-Analyse:

A Verdau nach 0 min

CYTC_MOUSE (100%), 15,530.9 Da
 Cystatin-C OS=Mus musculus GN=Cst3 PE=1 SV=2
 9 exclusive unique peptides, 12 exclusive unique spectra, 104 total spectra, 85/140 amino acids (61% coverage)

```

M A S P L R S L L F   L L A V L A V A W A   A T P K Q G P R M L   G A P E E A D A N E
E G V R R A L D F A   V S E Y N K G S N D   A Y H S R A I Q V V   R A R K Q L V A G V
N Y F L D V E M G R   T T C T K S Q T N L   T D C P F H D Q P H   L M R K A L C S F Q
I Y S V P W K G T H   S L T K F S C K N A
    
```

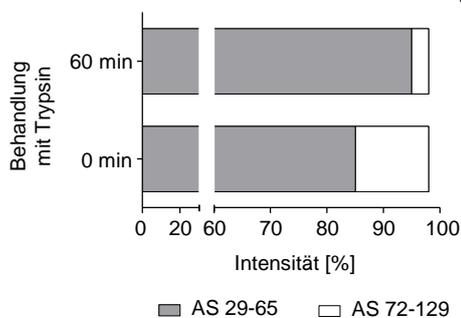
B Verdau nach 60 min

CYTC_MOUSE (100%), 15,530.9 Da
 Cystatin-C OS=Mus musculus GN=Cst3 PE=1 SV=2
 12 exclusive unique peptides, 21 exclusive unique spectra, 240 total spectra, 99/140 amino acids (71% coverage)

```

M A S P L R S L L F   L L A V L A V A W A   A T P K Q G P R M L   G A P E E A D A N E
E G V R R A L D F A   V S E Y N K G S N D   A Y H S R A I Q V V   R A R K Q L V A G V
N Y F L D V E M G R   T T C T K S Q T N L   T D C P F H D Q P H   L M R K A L C S F Q
I Y S V P W K G T H   S L T K F S C K N A
    
```

C N- und C-terminale Sequenzen



D Verschiedene Aminosäure-Sequenzen

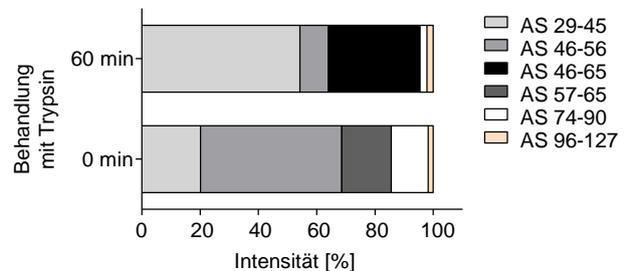


Abb. 13: MS/MS-Analysen des Spaltproduktes vom prozessierten murinen Cystatin C, sowie des nicht gespaltenen murinen Cystatin C. Das Sequenzalignment des unbehandelten und des prozessierten Cystatin C zeigt in Gelb die übereinstimmenden Sequenzen. Die grün unterlegten Aminosäuren stellen die potentiellen posttranslationalen Modifikationen dar (A, B). In dem unbehandelten Cystatin C war die Intensität des C-Terminus im Vergleich zum prozessierten Cystatin C höher. Jedoch konnte für das prozessierte Cystatin C eine höhere Intensität für das N-terminale Ende beobachtet werden (C). In der MS/MS-Analyse konnten unterschiedliche Aminosäure-Sequenzen für die beiden Cystatin C festgestellt werden. Dabei zeigte sich die höchste Intensität für AS 29-45 und AS 46-65 für das das prozessierte Cystatin C und das unbehandelte Cystatin C hatte die höchste Intensität für AS 46-56 (D).

Zu Anfang wurden Konzentrationsmessungen für die Cathepsin B- und die Cathepsin L-Aktivität durchgeführt, um die optimale Konzentration, bei der noch eine Aktivität messbar ist, festzustellen. Anschließend wurde gleiches für die Cystatin C-Inhibition untersucht. Hierfür haben wir rekombinante bzw. reine Enzyme *in vitro* verwendet, um somit unerwünschte Mechanismen ausschließen zu können. Dabei wurde murines Cystatin C mit bovinen Trypsin unter optimalen Bedingungen für Trypsin (100 mM Tris, 5 mM CaCl₂, pH 8) über eine Zeit von 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgte die

Messung der CTSB- und CTSL-Aktivität bei pH 3-8 bzw. pH 2-6 (Messpuffer: 100 mM Natriumacetat, 5 mM CaCl₂, 10 mM DTT) in Gegenwart von Trypsin, Cystatin C und prozessierten Cystatin C. Hierbei handelte es sich um humanes CTSB und CTSL sowie bovines Trypsin und murines Cystatin C. Bei der Messung der CTSB-Aktivität in Gegenwart von Cystatin C konnten wir eine signifikante Reduktion der CTSB-Aktivität beobachten. Aber es war noch eine minimale Aktivität im sauren pH-Bereich zu erkennen. Trypsin zeigte keinen Effekt auf die CTSB-Aktivität. Es ließ sich eine ähnliche CTSB-Aktivität beobachten, wie bei der Messung der reinen CTSB-Aktivität. Jedoch konnten wir bei der Messung der CTSB-Aktivität in Gegenwart von prozessierten Cystatin C eine signifikante Erhöhung und Stabilisierung der Aktivität, sogar bei neutralen pH-Wert, registrieren. Bei der Messung der CTSL-Aktivität in Gegenwart von Cystatin C und prozessierten Cystatin C konnten wir keine Aktivitätserhöhung feststellen. Nur das reine CTSL zeigte eine deutliche Aktivität (Abb. 14). Die CTSL-Aktivität in Gegenwart von Trypsin wurde auch gemessen und es konnte kein relevanter Effekt auf die CTSL-Aktivität festgestellt werden. Diese Daten werden im Folgenden nicht dargestellt.

Erste Ergebnisse: Humanes Cathepsin B/L mit murinem Cystatin C:

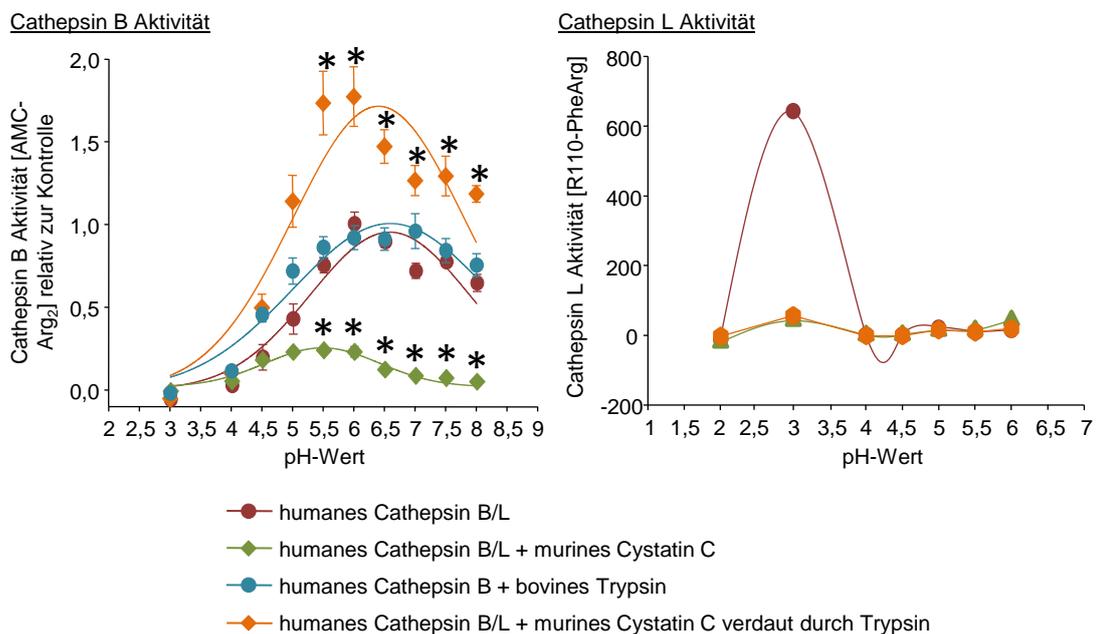


Abb. 14: Humane Cathepsin B/L-Aktivität in Gegenwart von Trypsin, Cystatin C und prozessierten Cystatin C. Es wurden rekombinante Proteine bzw. reine Enzyme verwendet. Dabei handelte es sich um humanes CTSB/L, bovines Trypsin und murines Cystatin C. Bei den *in vitro* Messungen der CTSB-Aktivität zeigte sich in Gegenwart von prozessiertem Cystatin C eine signifikante Erhöhung und Stabilisierung der CTSB-Aktivität, sogar bei neutralem pH-Wert. In Gegenwart von Trypsin war keine Veränderung in der CTSB-Aktivität zu erkennen. Cystatin C führte zu einer signifikanten Reduktion der CTSB-Aktivität. Jedoch konnte eine minimale CTSB-Aktivität

bei sauren pH-Wert registriert werden. Bei der Messung der CTSL-Aktivität konnte in Gegenwart von Cystatin C und prozessierten Cystatin C keine Aktivitätserhöhung beobachtet werden. Nur das reine CTSL zeigte eine Aktivität. Die biologischen Replikate für die CTSL-Aktivität ($n \geq 5$) sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) gezeigt. Hierbei sind die signifikanten Veränderungen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Für die CTSL-Aktivität wurde nur eine Messung ($n = 1$) durchgeführt.

Aufgrund unserer Beobachtungen in den vorherigen Versuchen (Abb. 14) wollten wir uns anschauen, ob sich die Cathepsin B-Aktivität gleichermaßen verhält, wenn wir murines CTSB mit murinem Cystatin C, sowie humanes CTSB mit humanem Cystatin C, behandeln. Bovines Trypsin haben wir für beide Versuche wieder verwendet, da sich humanes, murines oder auch bovines Trypsin sehr ähnlich sind. Es wurden erneut rekombinante Proteine bzw. reine Enzyme verwendet und in einem pH-Bereich von 3-10 die CTSB-Aktivität in Gegenwart von Trypsin, Cystatin C und prozessierten Cystatin C, sowie die reine CTSB-Aktivität gemessen. Wir konnten wieder eine signifikant höhere CTSB-Aktivität in Gegenwart von prozessierten murinen Cystatin C im sauren pH-Bereich für das murine CTSB beobachten. Weiterhin zeigte sich wieder eine schwache Aktivität in Gegenwart von Cystatin C unter saurem pH-Wert, jedoch nicht unter basischem pH-Wert. Die Gegenwart von Trypsin zeigte im sauren bis neutralen pH-Bereich keinen Unterschied zur reinen CTSB-Aktivität, erst im basischen Bereich ließ sich eine verringerte CTSB-Aktivität messen (Abb. 15A). Ähnliches ließ sich für die humane CTSB-Aktivität beobachten. Jedoch zeigte sich keine signifikant höhere CTSB-Aktivität in Gegenwart von humanen prozessierten Cystatin C. Weiterhin konnte eine geringere CTSB-Aktivität in Gegenwart von Trypsin festgestellt werden (Abb. 15B).

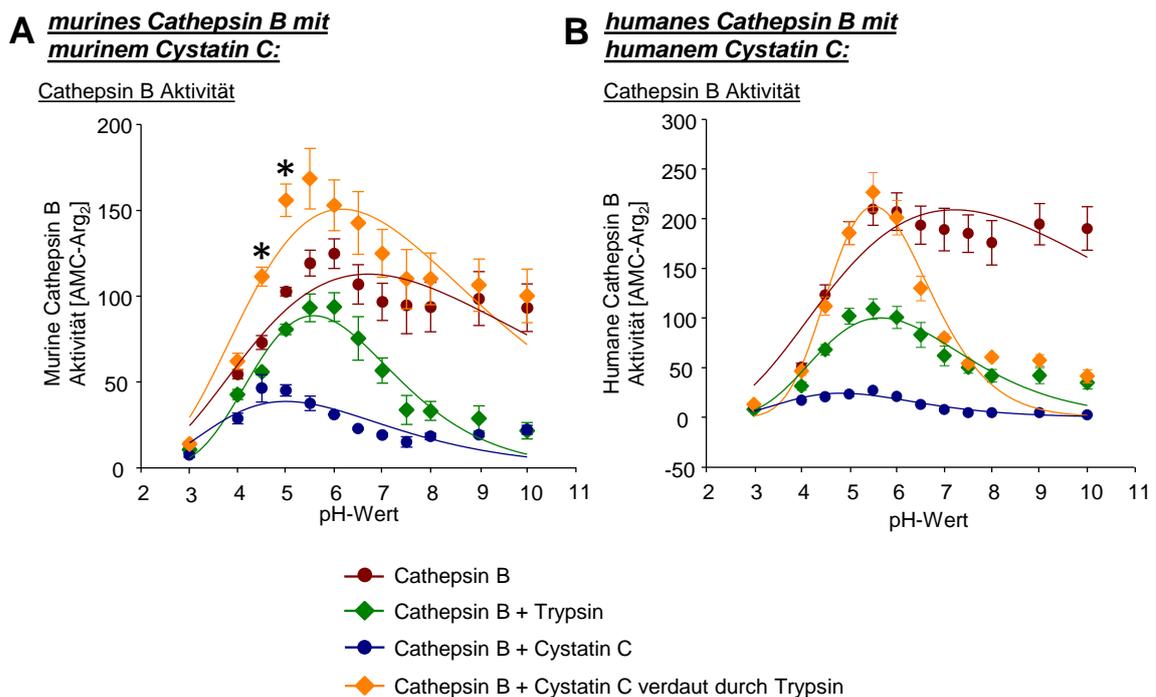


Abb. 15: Murine/Humane Cathepsin B-Aktivität in Gegenwart von Trypsin, Cystatin C und prozessiertem Cystatin C. Die murine CTSB-Aktivität zeigte in Gegenwart von murinem prozessiertem Cystatin C eine signifikant höhere Aktivität unter saurem pH-Wert. In Gegenwart von Cystatin C ließ sich eine geringe CTSB-Aktivität beobachten. Die Behandlung mit Trypsin führte zu keinem Unterschied im sauren pH-Bereich, erst im basischen pH-Bereich konnte eine verringerte CTSB-Aktivität festgestellt werden (A). Die humane CTSB-Aktivität zeigte einen ähnlichen Verlauf. Allerdings ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Aktivität in Gegenwart von humanem prozessiertem Cystatin C registrieren. In Gegenwart von Cystatin C war wieder nur eine geringe CTSB-Aktivität im sauren pH-Bereich zu beobachten, aber nicht im basischen. Die Behandlung von Trypsin führte zu einer geringeren CTSB-Aktivität (B). Die biologischen Replikate ($n \geq 3$) sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) gezeigt. Hierbei sind die signifikanten Veränderungen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

4.4 Expression von Cystatin C im Pankreashomogenat

Um nachzuweisen, dass es sich bei unseren Cystatin C-defizienten Mäusen auch wirklich um einen kompletten Knockout des Cystatin C-Gens handelt, haben wir auf Proteinebene mittels Western Blot-Analysen Pankreashomogenate untersucht. Dabei zeigte sich deutlich, dass sowohl unter physiologischen Bedingungen (0 h) als auch während der Pankreatitis (8 h) kein Cystatin C in den Cystatin C-defizienten Mäusen ($CysC^{-/-}$) im Vergleich zu den C576BL6/J Wildtyp Mäusen zu detektieren war. Als Kontrolle für die Menge an Protein, die auf das SDS-Polyacrylamid-Gel gegeben wurde, diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Abb. 16).

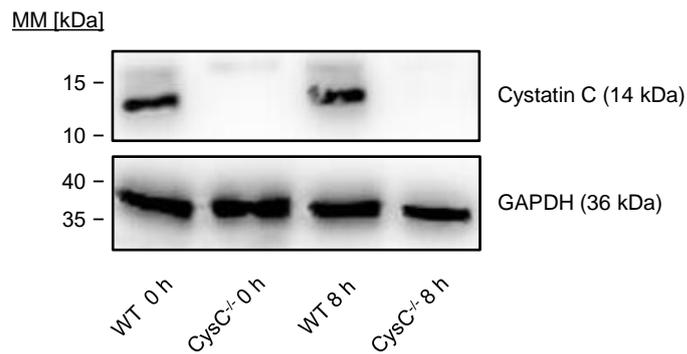
Pankreashomogenat:

Abb. 16: Detektion von Cystatin C im Pankreashomogenat. Die Western Blot Analyse erbrachte auf Proteinebene den Nachweis, dass Cystatin C im Pankreas von Cystatin C-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (C57BL6/J Wildtyp Mäuse) fehlt. Dies konnten wir für physiologische Bedingungen (0 h), sowie während der Pankreatitis (8 h) zeigen. Als Kontrolle diente GAPDH. Die Proteingrößen sind in absoluter Molekülmasse (MM) angegeben.

Mit Hilfe von Aktivitätsmessungen von Cathepsin B, Cathepsin L, Chymotrypsin und Trypsin wurde die Proteaseaktivität während der Frühphase (1 h), sowie Spätphase (8 h und 24 h), der Pankreatitis zwischen C57BL6/J Wildtyp Mäusen und Cystatin C-defizienten Mäusen untersucht. Die Pankreatitis wurde durch stündliche Injektionen von Caerulein (50 µg/kg Körpergewicht), bis zu einem Maximum von 8 Injektionen, in C57BL6/J Wildtyp Mäusen und Cystatin C-defizienten Mäusen induziert. Die Pankreata wurden von unbehandelten Mäusen, sowie 1 h, 8 h und 24 h nach der ersten Caerulein-Injektion entnommen. Anschließend wurden die Pankreata homogenisiert und die Aktivitäten bei dem jeweiligen optimalen pH-Wert fluorometrisch gemessen.

Die Cathepsin B-Aktivität war sowohl unter physiologischen Bedingungen (0 h) als auch nach 8 h Caerulein-Injektion in Cystatin C-defizienten Mäusen im Vergleich zu den C57BL6/J Wildtyp Mäusen signifikant höher. Weiterhin konnte eine leichte Erhöhung der CTSB-Aktivität nach 1 h Caerulein-Injektion in C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen beobachtet werden. Auch nach 8 h zeigte sich in den Cystatin C-defizienten Mäusen ein Anstieg der CTSB-Aktivität im Vergleich zu den physiologischen Bedingungen. Nach 24 h war ein deutlicher Anstieg der CTSB-Aktivität zu erkennen. Gleiches konnte für die Cathepsin L-Aktivität gezeigt werden. Die höchste Aktivität von Chymotrypsin konnte sowohl für die C57BL6/J Wildtyp und die Cystatin-defizienten Mäuse in der Frühphase (1 h) der Pankreatitis registriert werden, wobei die Cystatin C-defizienten Mäuse eine signifikante höhere Chymotrypsin-Aktivität als die C57BL6/J Wildtyp Mäuse aufwiesen. Auch nach 8 h und 24 h Caerulein-Injektion zeigte sich eine signifikant höhere Chymotrypsin-Aktivität in den Cystatin C-defizienten Mäusen. In C57BL6/J Wildtyp Mäusen stieg die Trypsin-Aktivität

nach 1 h, 8 h und 24 h Caerulein-Injektion im Vergleich zu den physiologischen Bedingungen leicht an. Jedoch zeigte sich für die Cystatin C-defizienten Mäusen für alle drei Zeitpunkte eine signifikant höhere Trypsin-Aktivität. Dabei konnte nach 8 h Caerulein-Injektion die höchste Trypsin-Aktivität registriert werden. Nach 1 h und 24 h war eine ähnlich hohe Aktivität von Trypsin zu beobachten (Abb. 17).

Pankreasenzym-Aktivitäten im Homogenat:

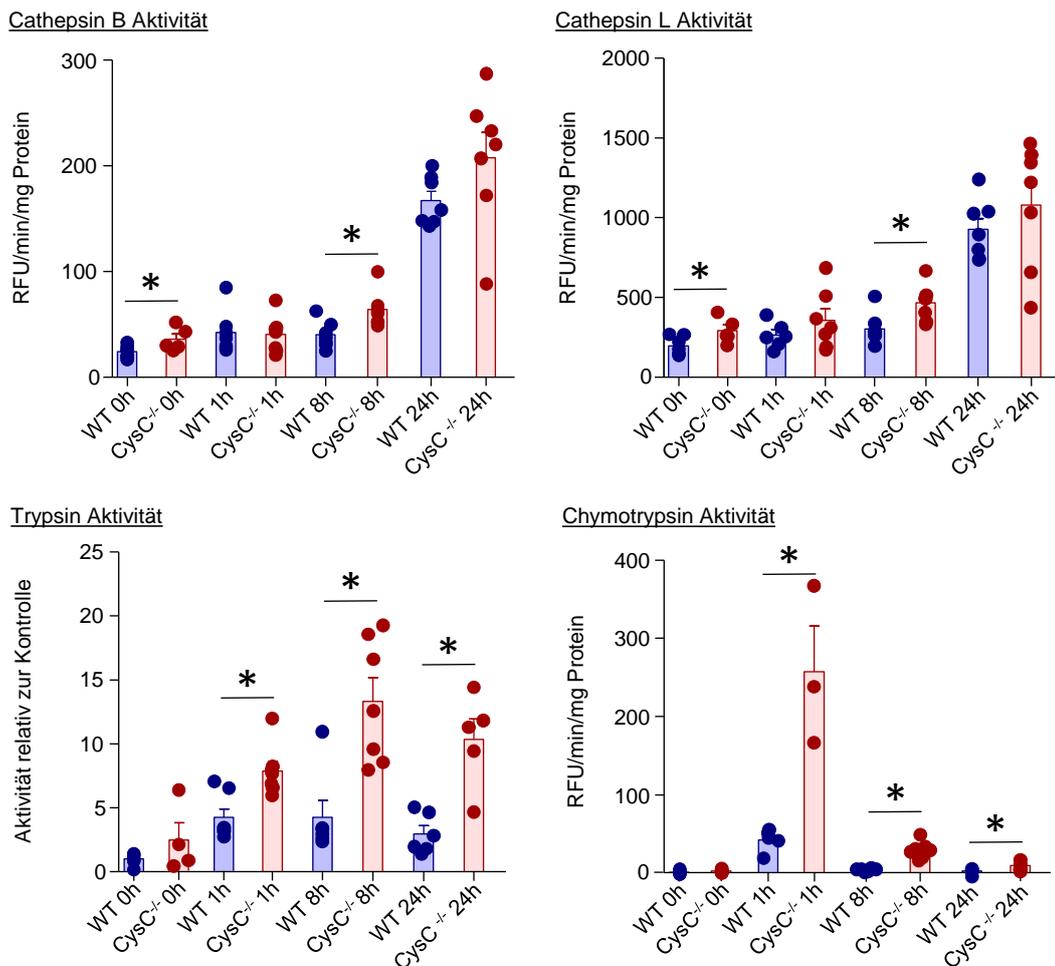


Abb. 17: Aktivitätsverteilung von Cathepsin B, Cathepsin L, Chymotrypsin und Trypsin während der Pankreatitis. Es wurden mittels enzymatischer Messung die Aktivitäten von CTSB (AMC-Arg-Arg), CTSL (AFC-Phe-Arg), Chymotrypsin (AMC-Phe-Pro-Ala-Ala-Suc) und Trypsin (AMC-Arg-Ala-Gln-Boc) bestimmt. Für Cathepsin B und L konnte ein ähnlicher Verlauf der Aktivitäten beobachtet werden. Dabei war bereits unter physiologischen Bedingungen (0 h) eine signifikant höhere CTSB/L-Aktivität für die Cystatin C-defizienten Mäuse zu erkennen. Nach 24 h waren die Aktivität von CTSB und L am höchsten. Die Chymotrypsin-Aktivität war in den C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen nach 1 h am höchsten. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Aktivität von Chymotrypsin für die Cystatin C-defizienten Mäuse. Gleiches konnte nach 8 h und 24 h Caerulein-Injektion beobachtet werden. Die höchste Trypsin-Aktivität in den Cystatin C-defizienten Mäusen zeigte sich nach 8 h Caerulein-Injektion. Diese war auch signifikant höher als in den

C57BL6/J Wildtyp Mäusen. Nach 1 h und 24 h konnte eine ähnlich hohe Trypsin-Aktivität in den Cystatin C-defizienten Mäusen festgestellt werden. Jedoch war sie auch höher als unter physiologischen Bedingungen. In den C57BL6/J Wildtyp Mäusen konnte auch ein Anstieg der Trypsin-Aktivität nach 1 h, 8 h und 24 h registriert werden. Aber diese war unter allen Zeitpunkten ähnlich hoch. Die biologischen Replikate ($n \geq 3$) sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) gezeigt. Hierbei sind die signifikanten Veränderungen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

4.5 Subzelluläre Umverteilung in Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen in der akuten Pankreatitis

Die subzelluläre Umverteilung von Trypsinogen und CTSB in das gleiche Zellkompartiment, welche bereits in der Frühphase der Pankreatitis erfolgt, ist ein wichtiges Ereignis, wodurch es zur vorzeitigen Proteasen-Aktivierung kommt.

Aufgrund unserer vorausgegangenen Experimente in C57BL6/J Wildtyp Mäusen wollten wir untersuchen, welchen Einfluss die Deletion von Cystatin C auf die subzelluläre Umverteilung in der Früh- (1 h) und Spätphase (8 h) der Pankreatitis hat. Durch Gabe einer supramaximalen Konzentration (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht) von Caerulein in C57BL6/J Wildtyp Mäusen und Cystatin C-defizienten Mäusen erfolgte eine Induktion einer Pankreatitis. Die Pankreata wurden von unbehandelten Mäusen, nach 1 h und nach 8 h Caerulein-Injektion entnommen und mittels einer Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in ihre einzelnen Kompartimente aufgetrennt. Die Proteaseaktivität von Cathepsin B (pH 5,5), Cathepsin L (pH 4), Trypsin (pH 8) und Chymotrypsin (pH 8) wurde unter Verwendung fluorogener Substrate bestimmt.

Cathepsin B und Cathepsin L zeigten unter physiologischen Bedingungen eine überwiegende Aktivität in den Lysosomen. Jedoch konnte auch schon unter physiologischen Bedingungen eine nicht unerhebliche Menge an aktiven CTSB und CTSL in der Zymogengranula-enthaltenden Fraktion beobachtet werden. Dabei konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen C57BL6/J Wildtyp Mäusen und den Cystatin C-defizienten Mäusen feststellen. Während der Frühphase (1 h) der akuten Pankreatitis beobachteten wir einen dramatischen Verlust der Aktivität von CTSB und CTSL in der lysosomalen Fraktion. Im Gegensatz dazu stieg die CTSB-Aktivität nach 1 h in der Zymogengranula-enthaltenden Fraktion leicht an, wobei diese in den Cystatin C-defizienten Mäusen signifikant höher war im Vergleich zu den C57BL6/J Wildtyp Mäusen. Die CTSL-Aktivität zeigte in der Frühphase der akuten Pankreatitis keinen Unterschied in den C57BL6/J Wildtyp Mäusen und einen signifikanten Anstieg in den Cystatin C-defizienten Mäusen. 8 h nach Induktion der Pankreatitis konnten wir wieder einen leichten Anstieg der Aktivitäten von CTSB und CTSL in der Lysosomen-haltigen Fraktion und einen leichten

Abfall in der Zymogengranula-haltigen Fraktion im Vergleich zu einer 1 h Caerulein-Injektion beobachten. Im Cytosol ließen sich keine bedeutenden Änderungen in der Aktivität von CTSB und CTSL registrieren (Abb. 18).

Subzelluläre Fraktionierung in C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen:

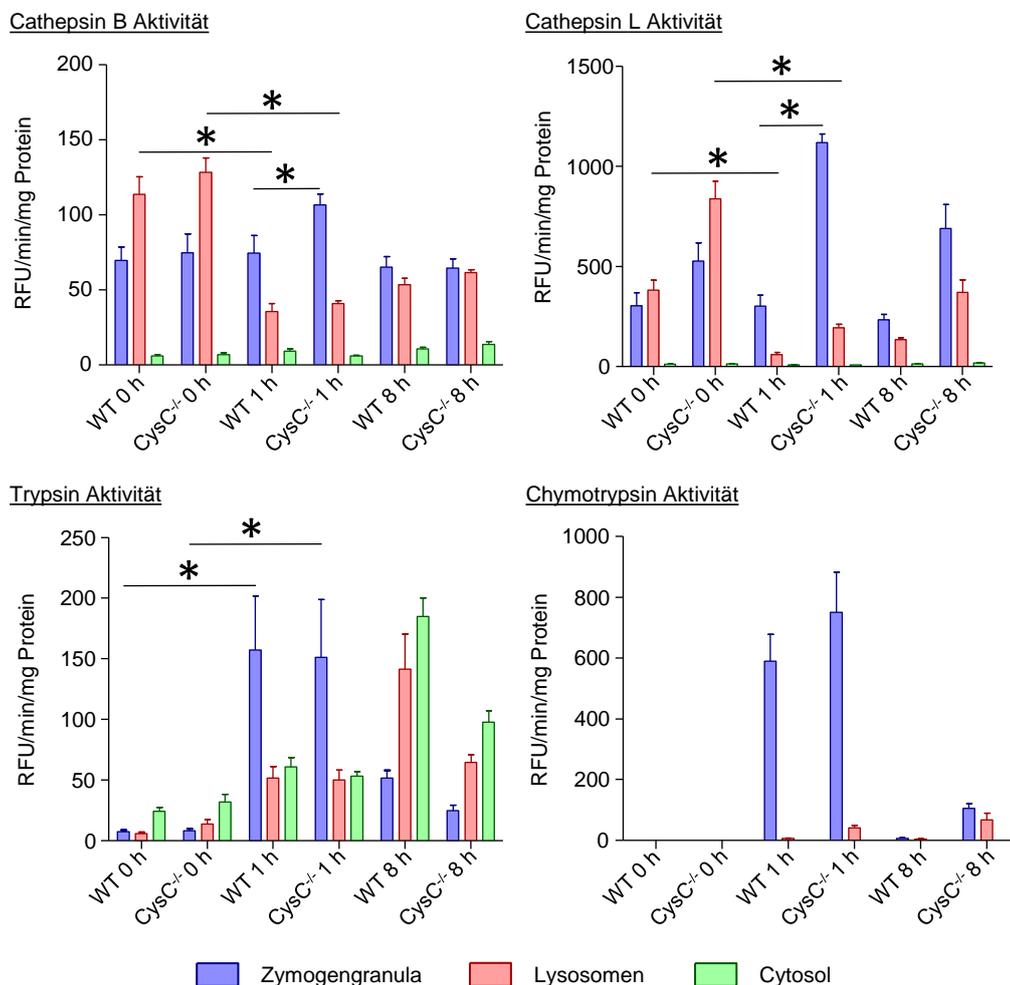


Abb. 18: Subzelluläre Umverteilung der Pankreasenzym-Aktivitäten in C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen während Caerulein-induzierter Pankreatitis (0 h, 1 h, 8 h). Es wurden mittels enzymatischer Messung die Aktivitäten von CTSB (AMC-Arg-Arg), CTSL (R110-Phe-Arg), Chymotrypsin (AMC-Phe-Pro-Ala-Ala-Suc) und Trypsin (AMC-Arg-Ala-Gln-Boc) bestimmt. Physiologisch überwiegte die Cathepsin B- und die Cathepsin L-Aktivität in der lysosomalen Fraktion und stieg nach 1 h Caerulein-Injektion in der zymogenhaltigen sekretorischen Fraktion an. Dabei waren die Aktivitäten von CTSB und CTSL in den Cystatin C-defizienten Mäusen signifikant höher als in den C57BL6/J Wildtyp Mäusen. In der Spätphase (8 h) der akuten Pankreatitis zeigte sich wieder ein leichter Anstieg der CTSB- und CTSL-Aktivität in der lysosomalen Fraktion und ein leichter Abfall im zymogenhaltigen Fraktion. Im Gegensatz dazu stiegen die Chymotrypsin-Aktivität sowie die Trypsin-Aktivität in der Zymogengranula-Fraktion signifikant nach 1 h Caerulein-Stimulation an. Nach 8 h überwiegte die Trypsin-Aktivität in der lysosomalen Fraktion. Alle Daten in den Ergebnissen

wurden als Duplikate gemessen und gezeigt sind die biologischen Replikate ($n \geq 5$) als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM). Hierbei sind die signifikanten Veränderungen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Im Gegensatz zur Aktivität der lysosomalen Enzyme befand sich die Aktivität von Trypsin und Chymotrypsin in den Zymogengranula und stieg in der Frühphase der akuten Pankreatitis signifikant an. Hierbei zeigte sich eine höhere Chymotrypsinaktivität in den Cystatin C-defizienten Mäusen, jedoch war diese nicht signifikant. In der Spätphase (8 h) der akuten Pankreatitis war nur noch eine geringe Chymotrypsinaktivität in den Zymogengranula und Lysosomen zu erkennen. Die Trypsinaktivität zeigte in beiden Mausstämmen in der Frühphase in den Zymogengranula keinen Unterschied. Es ließ sich auch ein minimaler Anstieg der Trypsinaktivität in der lysosomalen und cytosolischen Fraktion beobachten, aber dieser war deutlich geringer als die Trypsinaktivität in der Zymogengranula-enthaltenden Fraktion. Nach 8 h blieb die Trypsinaktivität hoch, jedoch hatte sie sich überwiegend in die lysosomale Fraktion verschoben. Auch konnten hohe Aktivitäten von Trypsin im Cytosol nach 8 h Caerulein-Injektion gemessen werden. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass es wahrscheinlich zu einer Beschädigung von sekretorischen oder anderen Vesikeln in der Spätphase der Pankreatitis kam (Abb. 18).

4.6 Cystatin C in isolierten Azinuszellen

Die Azinuszellen sind die sekretorischen Zellen des exokrinen Pankreas, welche die Verdauungsenzyme speichern und sekretieren. Sie lagern sich zu Komplexen zusammen, den Azini. Sie bestehen aus einem basolateralen Abschnitt, einem apikalen Pol und einem zentral liegenden Zellkern. Der basolaterale Abschnitt beinhaltet vor allem das raue endoplasmatische Retikulum (RER), welches für die Enzymproduktion zuständig ist. Die apikale Region ist durch den Golgi-Apparat und die Zymogengranula, welche inaktive Enzymvorläufer enthalten, gekennzeichnet. Cholecystokinin (CCK) stimuliert durch Bindung an den CCK-Rezeptoren die Sekretion von Enzymen aus dem Pankreas. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt diese Sekretion aufgrund eines von CCK ausgelösten oszillierenden Calciumsignals, wodurch es zu einer Sekretion der Zymogene am apikalen Pol der Azinuszelle kommt. Schließlich kann der Nahrungsaufschluss im Duodenum erfolgen. Eine pathologische Calciumfreisetzung führt zu einem langanhaltenden, intrazellulären Calciumsignal. Hierdurch werden die intrazellulären Calcium-Speicher des ERs überfordert. Die Calcium-Kanäle der Zellmembran öffnen sich und die Calcium-Ionen aus dem Extrazellularraum können in die Zelle strömen. Demzufolge erfolgt keine geregelte

Sekretion der Zymogene, sondern es kommt zu einer Sekretionsblockade und schließlich zu einer akuten Pankreatitis durch die Co-Lokalisierung von Trypsinogen und Cathepsin B. Zur Bestimmung des Einflusses von CCK auf die Azinuszellen von C57BL6/J Wildtyp Mäusen und Cystatin C-defizienten Mäuse haben wir aus den jeweiligen Tieren Azinuszellen isoliert, mit einer supramaximalen Konzentration an CCK für 30 min stimuliert und die Zellen anschließend homogenisiert. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Azinuszellen. Im Anschluss haben wir die Enzymaktivitäten von CTSB (pH 5,5 und 7), CTSL (pH 4) und Chymotrypsin (pH 8) mittels fluorogener Substrate bestimmt.

Azinuzellhomogenat:

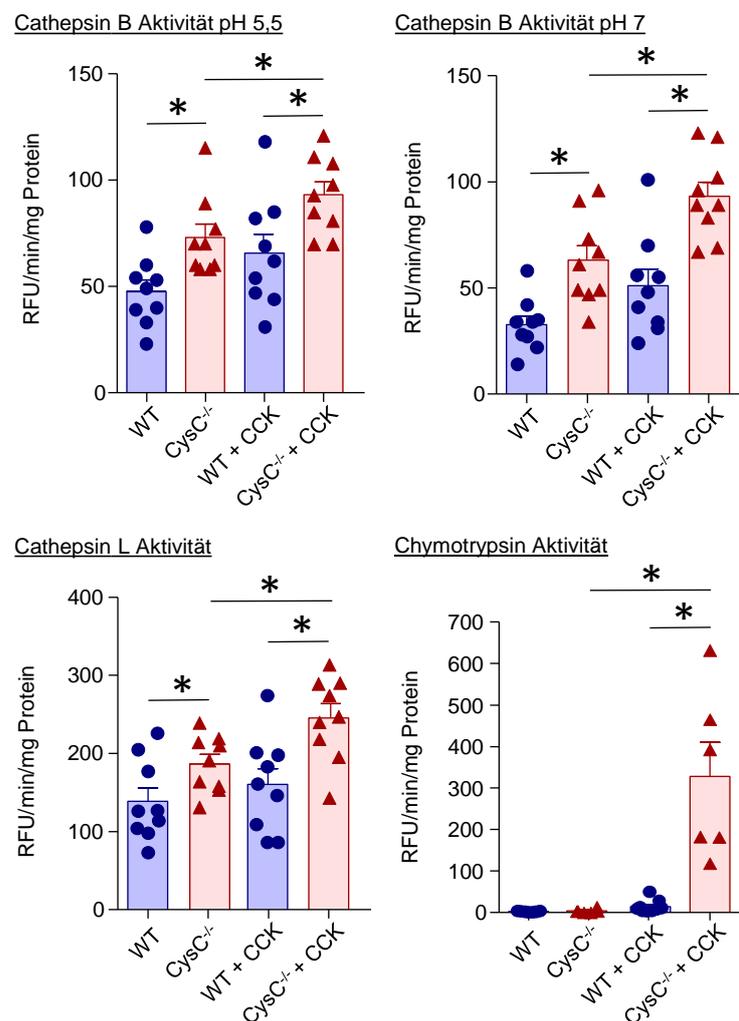


Abb. 19: Aktivitäten von CTSB, CTSL und Chymotrypsin in Azinuzellhomogenaten von C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen. Es wurden mittels enzymatischer Messung die Aktivitäten von CTSB (AMC-Arg-Arg), CTSL (AMC-Phe-Arg) und Chymotrypsin (AMC-Phe-Pro-Ala-Ala-Suc) bestimmt. Sowohl für die Aktivität von CTSB unter seinem pH-Optimum von 5,5 und neutralen pH-Wert von 7 als auch für die Aktivität von CTSL konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Cystatin C einen großen Einfluss hat. Dabei war eine signifikant höhere CTSB- und

CTSL-Aktivität für die mit CCK-stimulierten Cystatin C Azinuszellen im Vergleich zu den unstimulierten Cystatin C Azinuszellen, sowie den stimulierten Wildtyp Azinuszellen, beobachtbar. Auch zeigte sich bereits eine signifikant höhere Aktivität von CTSB und CTSL in den Azinuszellen der Cystatin C-defizienten Mäuse unter physiologischen Bedingungen. Ähnliches konnte für die Aktivität von Chymotrypsin festgestellt werden. Alle Daten in den Ergebnissen wurden als Duplikate oder Triplikate gemessen und gezeigt sind die biologischen Replikate ($n \geq 6$) als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM). Hierbei sind die signifikanten Veränderungen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Anhand der enzymatischen Messungen konnte verdeutlicht werden, dass das Fehlen von Cystatin C einen großen Einfluss auf die Aktivitäten der verschiedenen Proteasen hat. Für CTSB konnte sowohl unter seinem pH-Optimum von 5,5 und neutralen pH-Wert von 7 eine signifikant höhere CTSB-Aktivität für die mit CCK-stimulierten Azinuszellen im Vergleich zu den unstimulierten Azinuszellen der Cystatin C-defizienten Mäuse, sowie den stimulierten Wildtyp Azinuszellen, beobachtet werden. Auch zeigte sich bereits eine signifikant höhere Aktivität von CTSB in den Azinuszellen der Cystatin C-defizienten Mäuse unter physiologischen Bedingungen. Gleiches konnte ebenfalls für die CTSL-Aktivität registriert werden. Darüber hinaus ließ sich ähnliches für die Aktivität von Chymotrypsin feststellen. Hier zeigte sich ein dramatischer Anstieg der Chymotrypsin-Aktivität in den Azinuszellen der Cystatin C-defizienten Mäuse und im Vergleich nur ein geringer Anstieg in den Azinuszellen der C57BL6/J Wildtyp Mäuse (Abb. 19).

Zusätzlich haben wir auch die Enzymaktivitäten in *ex vivo* Versuche in lebenden Azinuszellen durchgeführt. Hierbei wurden die Azinuszellen wieder mit einer supramaximalen Konzentration von CCK stimuliert und unstimulierte Azinuszellen von C57BL6/J Wildtyp, sowie Cystatin C-defizienten Mäusen dienten wieder als Kontrolle. Die Enzymaktivitäten von CTSB, CTSL, Trypsin und Elastase wurden mittels zellpermeabler fluorogener Substrate bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine höhere CTSB-, CTSL-, Trypsin- und Elastase-Aktivität in den stimulierten, lebenden Azinuszellen von Cystatin C-defizienten Mäusen messbar war. Dabei konnte für die Aktivitäten von Trypsin und Elastase eine signifikant höhere Aktivität nach 20 min und 40 min Stimulation beobachtet werden. CTSB zeigte nach 20 min eine signifikant höhere Aktivität. Für die CTSL-Aktivität konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied nach 20 min zwischen der stimulierten Azinuszellen von C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen festgestellt werden. Weiterhin zeigte sich nach 40 min ein gleich starker Anstieg. Es wurde kein Unterschied in der Nekrose beobachtet (Abb. 20).

Test mit lebenden Azinuszellen:

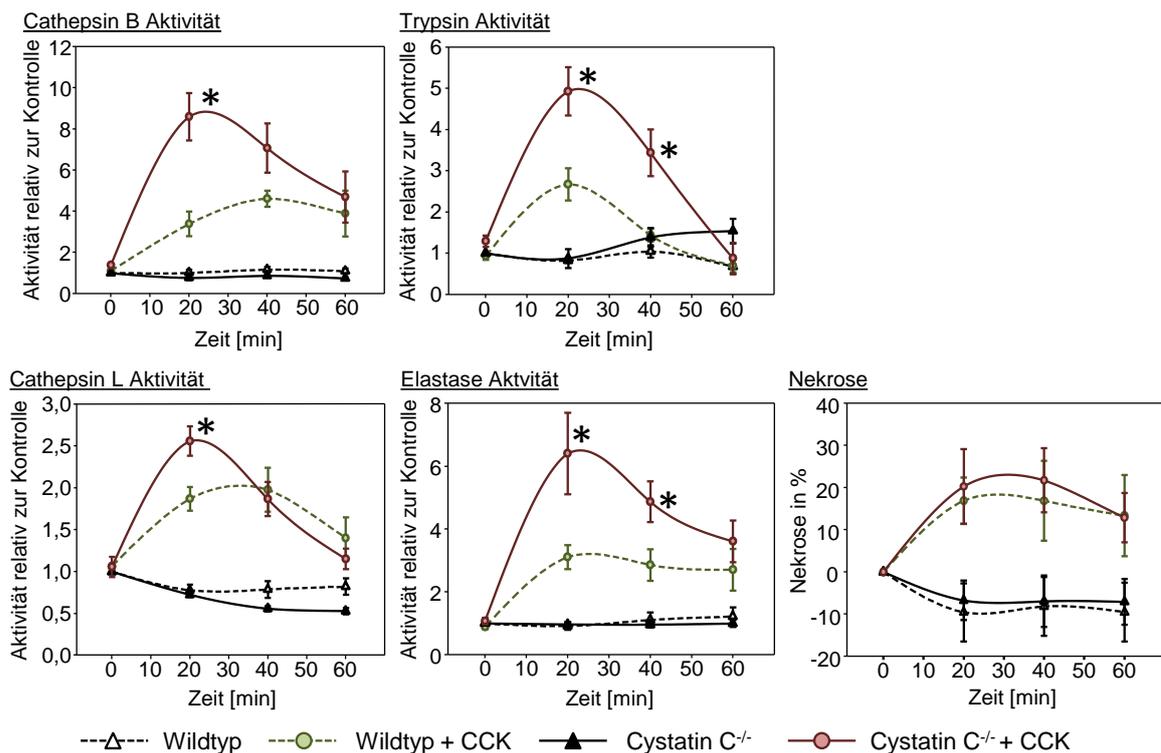


Abb. 20: Aktivitäten von CTSB, CTSL, Trypsin und Elastase in lebenden Azinuszellen von C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen. Es wurden mittels enzymatischer Messung die Aktivitäten von CTSB (AMC-Arg-Arg), CTSL (AMC-Phe-Arg), Trypsin (R110-Ile-Pro-Arg) und Elastase (R110-Ala-Ala-Ala-Ala) bestimmt. Für die Trypsin- und Elastase-Aktivität zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Azinuszellen von Cystatin C-defizienten Mäusen nach 20 min und 40 min supramaximaler Stimulation mit CCK. Die CTSB- und CTSL-Aktivität zeigte nach 20 min einen signifikanten Unterschied. Jedoch konnte für die CTSL-Aktivität ein gleich starker Anstieg nach 40 min beobachtet werden. Die Nekrose von stimulierten Azinuszellen von C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen zeigte keinen Unterschied. Alle Daten in den Ergebnissen wurden als Triplikate gemessen und gezeigt sind die biologischen Replikate ($n \geq 4$) als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM). Hierbei sind die signifikanten Veränderungen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

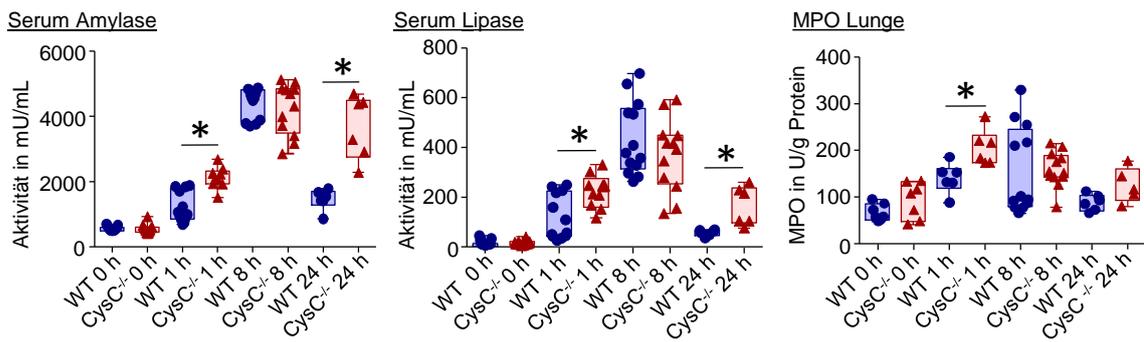
4.7 Einfluss von Cystatin C auf den Schweregrad der akuten und chronischen Pankreatitis

Aufgrund des bisher beobachteten Einflusses des Fehlens von Cystatin C auf die Proteaseaktivierung wollten wir schließlich klären, inwieweit eine selektive Deletion von Cystatin C im exokrinen Pankreas den Schweregrad der akuten und chronischen Pankreatitis bestimmt. Durch Gabe einer supramaximalen Konzentration (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körper-

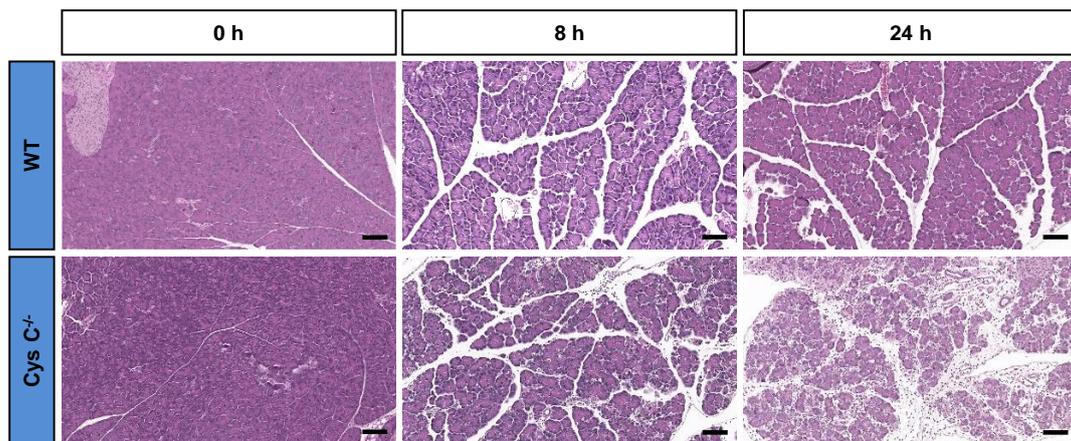
gewicht) von Caerulein in C57BL6/J Wildtyp Mäusen und Cystatin C-defizienten Mäusen erfolgte eine Induktion einer Pankreatitis. Die Pankreata wurden von unbehandelten Mäusen, sowie 1 h, 8 h und 24 h nach der ersten Caerulein-Applikation entnommen. Anschließend wurden verschiedene Schweregradmarker wie die Serum Amylase, Serum Lipase und die Myeloperoxidase (MPO) in der Lunge gemessen. Im Falle der Pankreatitis wird die Amylase und die Lipase in größeren Mengen im Pankreas durch nekrotisierenden Azinuszellen freigesetzt. Hierdurch steigt auch im Serum die Amylase- bzw. Lipase-Konzentration an. Infolgedessen kann der Serum Amylase/Lipase-Spiegel auch als Schadensmarker für den Schweregrad der Pankreatitis genutzt werden. Die MPO ist ein systemischer Entzündungsmarker und ist ein Parameter für das Ausmaß der Leukozyteninfiltration. Es ist ein Enzym, welches nur in neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert ist und zeigt daher die Transmigration dieser Zellen in das jeweilige Organ an. Die Höhe der gemessenen Aktivität kann dem Ausmaß der Leukozyteninfiltration gleichgesetzt werden. Des Weiteren wurde die Histologie des Pankreasschadens und die Apoptose im Pankreas untersucht.

Wir konnten sowohl eine signifikant höhere Aktivität an Serum Amylase als auch an Serum Lipase 1 h und 24 h nach Beginn der Caerulein-Injektionen in den Cystatin C-defizienten Mäusen beobachten. Nach 8 h war zwar der Schaden am höchsten, jedoch war kein Unterschied zwischen den C57BL6/J Wildtyp und den Cystatin C-defizienten Mäusen zu erkennen. Ähnliches konnten wir für die Aktivität der MPO in der Lunge zeigen. Jedoch war hier nur eine signifikant höhere Aktivität nach 1 h festzustellen (Abb. 21A). Diese Beobachtungen haben wir auch mit der histologischen Befundung des Pankreasschadens bestätigen können. Hier ist deutlich zu sehen, dass nach 24 h ein höherer Schaden in den Cystatin C-defizienten Mäusen zu erkennen ist, während nach 8 h kein Unterschied festzustellen ist (Abb. 21B). Mittels eines TUNEL-Assays untersuchten wir die Apoptose im Pankreas. Dabei sind die TUNEL positiven Zellkerne rot angefärbt. Es zeigte sich in den Cystatin C-defizienten Mäusen bereits nach 8 h eine signifikant höhere Apoptoserate im Vergleich zu den C57BL6/J Wildtyp Mäusen. Auch nach 24 h konnten wir eine signifikant höhere Apoptoserate in den Cystatin C-defizienten Mäusen beobachten, jedoch war die Apoptose insgesamt zum 8 h Zeitpunkt am höchsten (Abb. 21C).

A Krankheitsschweregradmarker:



B Histologie des Pankreasschadens:



C Apoptose im Pankreas:

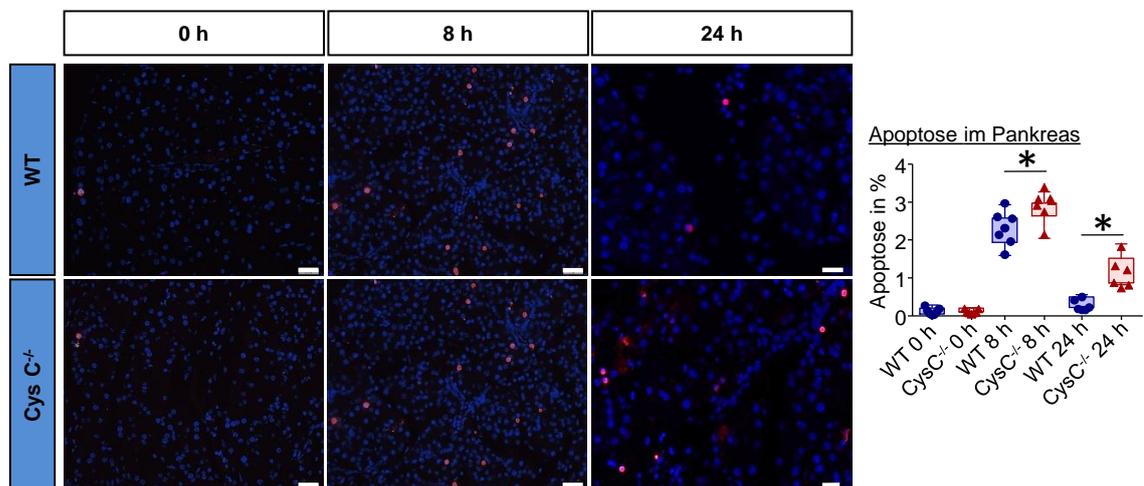


Abb. 21: Einfluss von Cystatin C auf den Schweregrad der akuten Pankreatitis. Durch die Bestimmung der Aktivitäten der Krankheitsschweregradmarker wie die Serum Amylase, Serum Lipase und der MPO in Lunge konnten wir zeigen, dass bereits nach 1 h Caerulein-Injektion diese signifikant höher in den Cystatin C-defizienten Mäusen sind im Vergleich zu den C57BL6/J Wildtyp Mäusen. Auch nach 24 h ließ sich eine höhere Serum Amylase und Lipase in den Cystatin C-defizienten Mäusen beobachten. Nach 8 h war kein Unterschied zu erkennen (A). Unsere Beobachtungen konnten wir mittels histologischer Färbungen des Pankreas bestätigen (B). Die

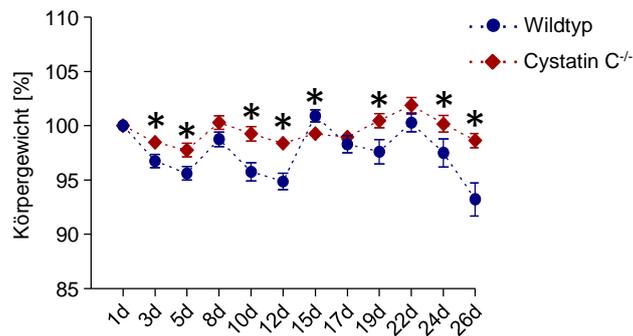
Maßstableiste entspricht 100 µm. Auch die Apoptoserate im Pankreas war in den Cystatin C-defizienten Mäusen höher als in den C57BL6/J Wildtyp Mäusen. Dabei zeigte sich sowohl nach 8 h als auch nach 24 h eine höhere Rate an TUNEL positiven Zellen (rot markiert) in den Cystatin C-defizienten Mäusen (C). Die Maßstableiste entspricht 20 µm. Alle Daten in den Ergebnissen wurden als Triplikate gemessen und gezeigt sind die biologischen Replikate ($n \geq 5$) als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM). Hierbei sind die signifikanten Veränderungen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Durch Gabe einer supramaximalen Konzentration (50 µg/kg Körpergewicht) von Caerulein in C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen stündlich über einen Zeitraum von 6 h, dreimal wöchentlich über 4 Wochen erfolgte eine Induktion einer chronischen Pankreatitis. Die Pankreata wurden 3 Tage nach der letzten Injektion entnommen.

Über den Zeitraum von 4 Wochen haben wir das Körpergewicht der Mäuse beobachtet. Dabei zeigte sich bereits nach den ersten Tagen eine signifikante Reduktion des Körpergewichts der Cystatin C-defizienten Mäuse. Nach 4 Wochen war ein deutlicher Unterschied zwischen den Körpergewichten der C57BL6/J Wildtyp und den Cystatin C-defizienten Mäuse zu erkennen. Die C57BL6/J Wildtyp Mäuse zeigten nach den 4 Wochen eine Gewichtsreduktion von ca. 1-2 %. Bei den Cystatin C-defizienten Mäuse ließ sich jedoch ein Gewichtsverlust von ca. 7 % registrieren (Abb. 22A). Auch eine höhere Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) in der Lunge konnte festgestellt werden (Abb. 22B). In histologischen Färbungen des Pankreas konnten wir den bereits beobachteten höheren Schaden in den Cystatin C-defizienten Mäusen ebenfalls nachweisen (Abb. 22C), was sich durch den Verlust an Azini und Inseln, sowie der höheren Fibrose, bestätigen ließ (Abb. 22D).

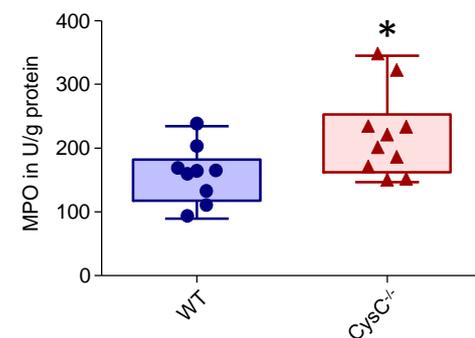
A Körpergewichtsverlust:

Körpergewicht-Zeitverlauf

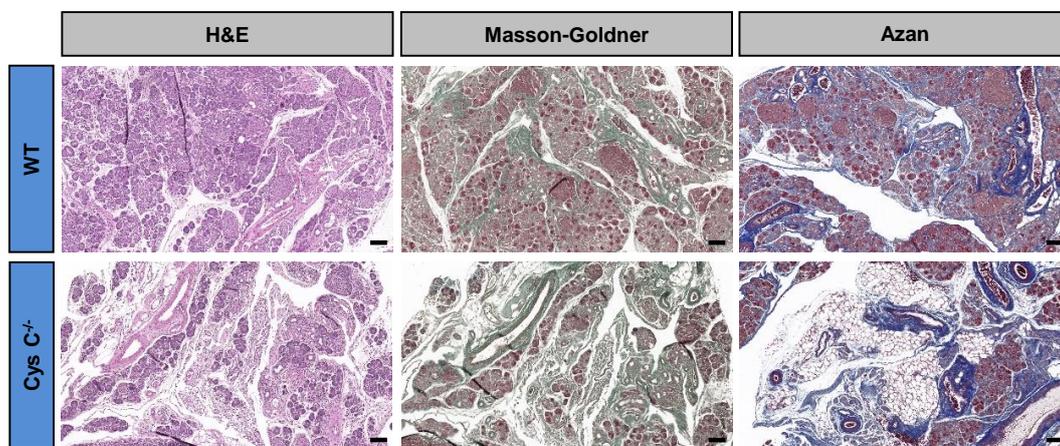


B Systemische Schäden:

MPO Lunge

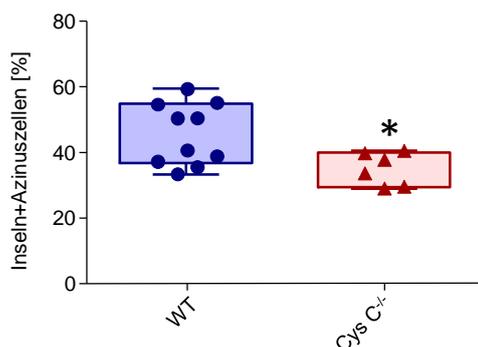


C Histologie des Pankreasschadens:



D Verlust von pankreatischen Azinuszellen und Zunahme der Fibrose:

Inseln + Azini



Fibrose

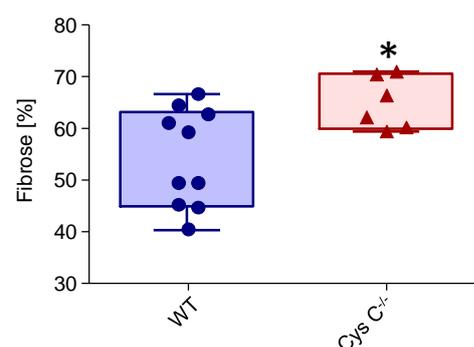


Abb. 22: Einfluss von Cystatin C auf den Schweregrad der chronischen Pankreatitis. Die Cystatin C-defizienten Mäuse zeigten nach 4 Wochen eine höhere Reduktion des Körpergewichts (ca. 7 %) als die C57BL6/J Wildtyp Mäuse (ca. 1-2 %) (A). Weiterhin ließ sich eine höhere MPO in der Lunge (B), ein höherer Pankreasschaden histologisch (C) und ein höherer Verlust an Azini und Inseln sowie eine höhere Fibrose (D) beobachten. Die Maßstableiste entspricht 100 µm. Alle Daten in den Ergebnissen wurden als Triplikate gemessen und gezeigt sind die biologischen Replikate (n ≥ 9) als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM). Hierbei sind die signifikanten Veränderungen p < 0,05 mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass es durch die Deletion von Cystatin C zu höheren Enzymaktivitäten und somit zu einem höheren Pankreasschaden kommt. Darüber hinaus konnten wir *in vitro* nachweisen, dass Trypsin Cystatin C über Zeit degradiert, wodurch es zu einer höheren und stabilisierten Cathepsin B-Aktivität kommt.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle von Cystatin C auf die lysosomale

Hydrolase CTSB

Das Pankreas ist eine sekretorische Drüse bestehend aus einem endokrinen und einem exokrinen Teil. Das endokrine Pankreas ist für die Regulation der Glucose-Homöostase durch Sezernierung von verschiedenen Hormonen zuständig. Die physiologische Funktion des exokrinen Pankreas, bzw. der dort enthaltenen Azinuszellen, besteht in der Synthese und Sekretion von Verdauungsenzymen in das Duodenum, um die Hydrolyse von Nahrungsbestandteilen zu katalysieren. Die produzierten Verdauungsenzyme sind hoch wirksam. Aus diesem Grund haben die Azinuszellen auch einige spezialisierte intrazelluläre Mechanismen, um sich vor diesen Verdauungsenzymen zu schützen. Unter anderem liegen eine Vielzahl von Trypsin-Inhibitoren (z.B. SPINK-1)^{53,62} sowie Proteasen, die Trypsin degradieren können (CTSL und Chymotrypsin C)^{42,64–66}, in der Azinuszelle vor. Ebenfalls herrscht ein saurer pH-Wert in den Zymogengranula, in welchen die Verdauungsenzyme, wie z.B. Trypsin, nicht aktiv sind⁶³. Ein weiterer Schutzmechanismus besteht darin, dass die Verdauungsenzyme als inaktive Vorstufen (Zymogene) in der Azinuszelle gespeichert werden. Trypsinogen aktivierende Proteasen werden entweder gar nicht erst im Pankreas exprimiert (wie z.B. die Enterokinase) oder in ein anderes subzelluläres Kompartiment sortiert (wie z.B. Cathepsin B). Die Cathepsine werden mittels des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors in Lysosomen und inaktive Pro-Enzyme wie Trypsinogen, Pro-Elastase und Pro-Chymotrypsinogen in Zymogengranula (kondensierte Vakuolen) sortiert^{70,71,185}. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt eine proteolytische Aktivierung der Verdauungsenzyme erst durch die Enterokinase im Duodenum. Im Falle einer akuten Pankreatitis werden diese intrazellulären Schutzmechanismen jedoch überwunden und die Proteasen werden noch in der Azinuszelle aktiviert. Demzufolge liegt der Ursprung der Pankreatitis in der Azinuszelle und den von ihr produzierten Proteasen^{149,186–188}. Da die Enterokinase nicht im Pankreas exprimiert wird, muss folglich eine andere Protease in Azinuszellen die Aktivierung von Trypsinogen katalysieren. Hier spielt die lysosomale Hydrolase Cathepsin B (CTSB) eine entscheidende Rolle, indem sie die Serinprotease Trypsinogen zu aktivem Trypsin prozessiert. Dies zeigte Greenbaum et al. bereits in den 1950er Jahren¹⁴⁶. Tierexperimentelle Daten verschiedener Gruppen bestätigten diese Theorie^{147–149}. Jedoch wurde der endgültige Beweis erst in CTSB-defizienten Mäusen erbracht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine genetische Deletion von CTSB zu einer deutlich verminderten Trypsinaktivität im Verlauf der Pankreatitis führt⁵⁹. Die Reduktion der Trypsin-

aktivität resultiert in einen reduzierten Azinuszellschaden und somit auch in einem milderem Krankheitsverlauf. Trypsinogen 7-Gen defiziente Mäuse, welche aufgrund der Ähnlichkeiten dieses Maus-Trypsinogen-Isotyps mit dem menschlichen kationischen Trypsinogen (PRSS1) ausgewählt wurden, unterstreichen diese Hypothese¹⁸⁹. Der verminderte Schweregrad der Erkrankung im Tiermodell sowie die genetische Variationen im PRSS1 Gen, welche mit der hereditären chronischen Pankreatitis assoziiert sind, lassen vermuten, dass die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin eine zentrale Rolle in der Entstehung der Krankheit spielen^{59,150,189}. Krüger et al. haben gezeigt, dass ein überschießendes intrazelluläres Calciumsignal der Co-Lokalisierung vorausgeht und dies auch für die Induktion der intrazellulären Proteaseaktivierung notwendig ist⁷⁷. Unter physiologischen Bedingungen wird die Sekretion der Verdauungsenzyme über ein oszillierendes Calciumsignal mittels Cholecystokinin (CCK)^{78,79} und/oder Acetylcholin (Ach)⁸⁰ gesteuert. Hierbei kommt es zu einer fluktuierenden Freisetzung von Calcium-Ionen aus den intrazellulären Speichern, was zur Sekretion der Zymogene am apikalen Pol der Azinuszelle führt^{81,82}. Unter pathologischen Bedingungen, ausgelöst durch eine supramaximale Stimulation des CCK- bzw. Ach-Rezeptors, erfolgt ein langanhaltendes, intrazelluläres Calciumsignal, wodurch es zu einer Überforderung der intrazellulären Calcium-Speicher des Endoplasmatischen Retikulums (ER) kommen kann. Die Calcium-Kanäle der Zellmembran öffnen sich und Calcium-Ionen aus dem Extrazellularraum können in die Zelle strömen. Hierdurch erfolgt keine geregelte Sekretion der Zymogene, sondern es kommt zu einer Sekretionsblockade^{77,82}. Die Sekretionsblockade führt schließlich zu einer Co-Lokalisierung von Trypsinogen und CTSS, wodurch die intrazelluläre Proteasekaskade aktiviert wird⁷⁷. Auch in humanen Azinuszellen konnte der CCK-Rezeptor nachgewiesen werden¹⁹⁰. Im Tiermodell wird das CCK-Analogon Caerulein zur Induktion einer Pankreatitis verwendet, da es kostengünstiger ist. Dabei wird immer eine supramaximale Konzentration verwendet, da geringe Konzentrationen von Caerulein nicht zu einer Pankreatitis führen, sondern zu einer Sekretion der Zymogene⁷⁰.

Für die Aktivierung von Trypsinogen durch CTSS ist eine Co-Lokalisierung beider Enzyme im selben subzellulären Kompartiment erforderlich. Es wurde gezeigt, dass sich CTSS und aktives Trypsin bereits in einer sehr frühen Erkrankungsphase im gleichen subzellulären Kompartiment befinden⁷². Für diese Co-Lokalisierung sind verschiedene Hypothesen bekannt. Die bekanntesten Hypothesen sind zum einen eine Fehlsortierung der lysosomalen Enzyme in das sekretorische Kompartiment im Golgi-Apparat⁷⁵ und zum anderen eine direkte Fusion von Lysosomen und Zymogengranula, einer sogenannten Crinophagie⁷⁴. Jedoch existiert noch eine weitere Hypothese. Diese besagt, dass CTSS bereits unter physiologischen Bedingungen im sekretorischen Kompartiment vorhanden ist und dort nur während einer Pankreatitis aktiviert bzw. aktiver wird⁶⁰. Weitere

Erklärungsansätze für die subzelluläre Umverteilung von lysosomalen Enzymen in das sekretorische Kompartimente und der damit nachfolgenden Co-Lokalisierung von Verdauungsenzymen sind: eine Co-Lokalisierung durch Endozytose von der luminalen¹⁹¹ oder basolateralen¹⁹² Zelloberfläche oder durch einen Defekt des Abbaus von Autophagolysosomen^{193–195}. Die Co-Lokalisierung beider Enzyme ist ein essentieller, pathophysiologischer Mechanismus für die Entstehung einer Pankreatitis⁷³.

Cystatin C wird ubiquitär exprimiert und gehört zu den Inhibitoren der Cysteinproteasen (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X und W). Es ist ein potenter Inhibitor für Papain, Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L und Cathepsin S^{95,159}. Durch die ubiquitäre Expression von Cystatin C wird ein Einfluss in einigen Krankheiten mit einer Überexpression oder auch Deletion assoziiert. In der Nephrologie ist Cystatin C schon lange als Marker für die glomeruläre Filtrationsrate bzw. der Nierenfunktion bekannt¹⁸⁰. Einen sehr starken Einfluss zeigt sich bei der neurodegenerativen hereditären Cystatin C-Amyloid-Angiopathie (HCCAA), wo die Patienten aufgrund von sukzessiven Hirnblutungen an Lähmungen und Demenz leiden, sowie früh versterben¹⁷¹. Jedoch ist bisher der Einfluss von Cystatin C in der Pankreatitis nicht näher untersucht worden. Aus diesem Grund haben wir das Zusammenspiel von CTSB und Cystatin C näher betrachten.

5.2 Cystatin B – cytosolische Inhibition von Cathepsin B

Zu jeder der Co-Lokalisierungshypothesen gibt es verschiedene Arbeiten, die diese stützen sollen. Meister et al. zeigte mit Mannose-6-Phosphat Rezeptor (MPR)-defizienten Mäuse, dass es zu einer Fehlsortierung von CTSB in das sekretorische Kompartiment kommt. Jedoch konnten sie auch beobachten, dass die Co-Lokalisierung von lysosomalen Enzymen mit Zymogenen nicht allein zu einer intrazellulären Trypsinogenaktivierung oder Pankreatitis führte. Auch nach einer supramaximalen Stimulation mit Caerulein konnte in den MPR-defizienten Tieren kein erhöhter Azinuszellschaden oder schwererer Krankheitsverlauf beobachtet werden¹⁹⁶. Der Nachweis von cytoplasmatischen Vakuolen wiederum bestärkt die Hypothese der Fusion von Lysosomen mit Zymogengranula^{70,75,197}. Jedoch konnte auch in mehreren Studien gezeigt werden, dass bereits unter physiologischen Bedingungen eine nicht unbedeutende Menge an CTSB in der Zymogengranula-Fraktion vorhanden ist^{60,150,151} und CTSB wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Regulation der Sekretion einnimmt¹⁹⁸. Subzelluläre Fraktionierungsversuche haben gezeigt, dass es im Verlauf der Pankreatitis zu einer schnellen Aktivitätsumverteilung von CTSB aus der lysosomalen Fraktion in die Zymogengranula-Fraktion kommt⁷⁰. Durch den Anstieg der CTSB-Aktivität in der zymogenhaltigen sekretorische Fraktion bereits in der frühen Phase

der Pankreatitis wird vermutet, dass dies zur Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin führt. Wir konnten ebenfalls in C57BL6/J Wildtyp Mäusen zeigen, dass es zu einer subzellulären Umverteilung von CTSB nach Induktion einer Pankreatitis kommt. Dabei überwog physiologisch die CTSB-Aktivität in der lysosomalen Fraktion und stieg nach 1 h Caerulein-Stimulation in der zymogenhaltigen sekretorischen Fraktion an. Aber auch unter physiologischen Bedingungen konnten wir bereits aktives CTSB in der sekretorischen Fraktion nachweisen, ohne dass es zu einer Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin kommt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass sich bereits unter physiologischen Bedingungen aktives CTSB in den sekretorischen Vesikeln befindet. Die CTSL-Aktivität zeigte ein ähnliches Aktivierungsmuster. Die Trypsin- und Chymotrypsin-Aktivität stieg ebenfalls nach 1 h Caerulein-Stimulation in der zymogenhaltigen Fraktion an, während nach 8 h die Trypsin-Aktivität in der lysosomalen Fraktion dominierte. Um unsere Vermutungen zu bestätigen, wollten wir uns nochmals genauer die Lokalisation von aktiven CTSB sowie der Inhibitoren Cystatin C und B anschauen. Sowohl Cystatin C als auch Cystatin B sind potente endogene Cysteineprotease-Inhibitoren, die in der Lage sind, CTSB oder CTSL zu hemmen^{95,159}. Die Lokalisierung der Proteasen und ihrer Inhibitoren ist entscheidend für den zellulären Schaden im Verlauf der Pankreatitis. Um Trypsinogen zu Trypsin zu aktivieren, muss aktives Cathepsin B zusammen mit Trypsinogen im selben Kompartiment lokalisiert sein. Um jedoch die Azinuszelle zu schädigen, darf Trypsin nicht in einem subzellulären Kompartiment eingeschlossen sein, sondern muss folglich ungehemmt im Cytosol aktiv sein. Tierexperimentelle Studien zeigen deutlich, dass es im Verlauf der Pankreatitis zu einer Freisetzung von Trypsin/Trypsinogen in das Cytoplasma kommt¹⁴⁹. Eine neuere Studie von Talukdar et. al. stellte die Hypothese auf, dass nicht aktives cytosolisches Trypsin die Azinuszelle schädigt, sondern aktives cytosolisches CTSB¹⁹⁹. Aktives Trypsin ist jedoch essentiell, um die Vesikelmembran zu schädigen und die Freisetzung von Cathepsin B in das Cytosol zu induzieren. Ein Schwachpunkt all dieser Hypothesen ist jedoch die cytosolische Lokalisation verschiedener Proteaseinhibitoren. Zum einen wird zusammen mit Trypsin auch der endogene Serinprotease Inhibitor Kazal Typ 1 (SPINK-1) ins Cytosol freigesetzt, zum anderen befinden sich im Cytosol ebenfalls Inhibitoren wie z.B. der Cathepsin-Inhibitor Cystatin B⁶⁰. Auch unsere Daten zeigen deutlich anhand von Western Blot Analysen, dass der CTSB-Inhibitor Cystatin B in der cytosolischen Fraktion vorhanden ist und auch jegliche CTSB-Aktivität unterbindet. Wir konnten nachweisen, dass die cytosolische Fraktion, die Cystatin B enthält, in der Lage ist, die CTSB-Aktivität zu reduzieren. Diese Ergebnisse lassen auf eine pH-abhängige inhibitorische Kapazität von Cystatin B schließen.

5.3 Cystatin C – Inhibition von Cathepsin B im sekretorischen Kompartiment

Ein weiterer Inhibitor der Cathepsine ist Cystatin C (Cst3). Dieser befand sich jedoch nicht im Cytosol, sondern im sekretorischen Kompartiment der Azinuszellen. Western Blot-Analysen unserer subzellulären Fraktionierungsexperimente zeigen eine deutliche Umverteilung der aktiven 33 kDa-Form von CTSB in der Zymogengranula-Fraktion von murinen Azinuszellen. In der Frühphase der Pankreatitis (1 h) verschob sich die aktive Form von CTSB vollständig in die zymogenhaltige sekretorische Fraktion, wo wir auch Cystatin C nachweisen konnten. Immunfluoreszenzfärbungen von isolierten Azinuszellen bestätigen unsere Ergebnisse, dass Cystatin C in den Zymogengranula vorhanden ist. Zusammen mit den Aktivitätsmessungen werfen diese Ergebnisse die Frage auf, wie CTSB in Anwesenheit eines endogenen Inhibitors aktiv sein kann. Bereits Kukor et al. zeigten bei der Untersuchung von reinem Pankreassaft von Patienten mit sporadischer oder hereditärer chronischer Pankreatitis (verursacht durch R122H-Mutation), dass sowohl Trypsin als auch Cathepsin B in signifikanten Mengen als aktive Enzyme sezerniert werden¹⁵⁰. Andere Studien wiesen ebenfalls aktives Cathepsin B sowie Cathepsin L und S in Pankreassaft von Patienten mit chronischer Pankreatitis nach²⁰⁰. Dies lässt vermuten, dass sich aktives Cathepsin B, auch unter physiologischen Bedingungen, im sekretorischen Kompartiment befinden muss. In unseren Western-Blot-Analysen von humanen Proben konnten wir eine klare Lokalisation von Cystatin C als auch von aktivem CTSB im Pankreassaft von chronischen Pankreatitis Patienten zeigen. Dies ist eine mögliche Erklärung, warum aktives Cathepsin B im sekretorischen Kompartiment vorliegt, es jedoch nicht unter physiologischen Bedingungen zu einer Aktivierung von Trypsinogen kommt, da die CTSB-Aktivität durch Cystatin C inhibiert wird. Immunfluoreszenzfärbungen von Cystatin C und Amylase gaben ebenfalls Hinweise darauf, dass Cystatin C in den sekretorischen Vesikeln des Menschen vorhanden ist und möglicherweise eine protektive Funktion besitzt.

Die Messungen der CTSB-Aktivität innerhalb der mit Zymogengranula-angereicherten Fraktion zeigten die pH-Abhängigkeit des Enzyms, mit einem klaren Optimum bei saurem pH-Wert von 5 bis 6. In der frühen Phase der Erkrankung (1 h) stieg die Aktivität von CTSB an und zeigte auch eine Aktivität bei neutralem pH-Wert. Diese Beobachtungen waren zeitabhängig. Nach 8 h Caerulein-Injektion zeigte das Aktivierungsmuster von CTSB in den Zymogengranula das gleiche Verhalten wie unter physiologischen Bedingungen. Aufgereinigtes Cathepsin B zeigte jedoch nicht eine derart starke pH-Abhängigkeit. Dies lässt vermuten, dass die Inhibition von Cathepsin B durch Cystatin C pH-abhängig ist und im Zuge der Pankreatitis gestört ist. Für Cystatin C ist gezeigt worden, dass seine

Dimerisierung bei sauren pH-Wert in einem Funktionsverlust resultiert ²⁰¹. Weiterhin ist bekannt, dass im Zuge der Pankreatitis eine Ansäuerung des Kompartiments, in welchem die Cathepsin B vermittelte Trypsinogenaktivierung stattfindet, zu beobachten ist. Eine Inhibition dieser Ansäuerung verhindert auch eine pathologische Trypsinogenaktivierung. Zum einem ist Chloroquin bekannt dafür, dass es den intrazellulären pH-Gradienten über vesikuläre Membranen aufhebt und zum anderen kann Bafilomycin A1 die V-Typ ATPase, über welche die intrazellulären Vesikel ihren sauren pH-Wert aufrechterhalten, inhibieren. Chloroquin und die Inhibition der V-Typ ATPase mittels Bafilomycin A1 haben eine pH-Neutralisierung zur Folge. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der Enzymaktivitäten von Trypsin, Chymotrypsin und CTSB kommt ^{60,202,203}. Eine Absenkung des pH-Wertes in den co-lokalisierten Organellen fördert die Trypsinogen-Aktivierung durch Cathepsin B ²⁰⁴. Diese Beobachtungen zeigen die Relevanz des intrazellulären pH-Wertes bei der Aktivierung der Verdauungsenzyme. Zusammen mit unseren Beobachtungen lässt sich diese Theorie erweitern. Durch die Ansäuerung des sekretorischen Kompartiments wird die Inhibition des dort schon aktiv vorliegenden Cathepsin B durch eine Dimerisierung von Cystatin C unterbrochen und ungehemmtes Cathepsin B kann Trypsinogen zu Trypsin aktivieren. Auch extrazellulär könnte dieser Mechanismus eine Rolle spielen, da bei physiologischer Sekretion eine leichte Ansäuerung des Azinusaluminalraumes beobachtet wurde. Die Protonen im azinären Lumenraum scheinen als negatives Feedback zu fungieren, die die azinäre Sekretion reguliert ⁶³. Während der supramaximalen Stimulation mit Caerulein wurden eine hohe, anhaltende Ansäuerung des Azinusalumens beobachtet. Diese Ansäuerung des Lumens wird durch die gehemmte Bikarbonatsekretion der Gangzellen als Reaktion auf Pankreatitis-induzierende Stimuli weiter verstärkt ²⁰⁵. Somit könnte die durch Ansäuerung verhinderte Hemmung von Cathepsin B auch bei hereditären Pankreatitiden, verursacht durch Mutationen im CFTR, eine Rolle spielen.

Damit stellt sich aber jetzt die Frage, warum die CTSB-Aktivität in der zymogenhaltigen Fraktion zunimmt, jedoch nicht die Aktivität von CTSL. Beide Cathepsine werden von Cystatin C in gleichem Maße inhibiert. Anhand rekombinanter Enzyme und Proteine wollten wir diese Situation *in vitro* nachempfinden. Hier stellte sich recht deutlich heraus, dass aktives Trypsin Cystatin C über die Zeit degradiert. Die Coomassie-Färbung zeigte zwei unterschiedliche Spaltprodukte, wobei dies nur für das murine Modell beobachtet werden konnte. In der Western-Blot-Analyse konnten wir nur das schwere Fragment nachweisen. Diese Ergebnisse erklären den Verlust der inhibitorischen Kapazität von Cystatin C, den wir in früheren Experimenten beobachtet haben. Weiterhin haben wir die CTSB-Aktivität sowohl in Gegenwart von Cystatin C als auch in Gegenwart von prozessiertem Cystatin C gemessen. Während Cystatin C die CTSB-Aktivität unter neutralem pH-Wert vollständig

inhibierte, ändert sich die Situation gänzlich, wenn Cystatin C durch Trypsin gespalten wurde. Überraschenderweise konnten wir eine signifikante Erhöhung der CTSB-Aktivität, sowie eine Stabilisierung der Aktivität auch unter neutralen pH-Bedingungen feststellen, wenn Cystatin C durch Trypsin prozessiert wurde. Trypsin allein schien aber keinen Effekt auf die CTSB-Aktivität zu haben. Auch hier war das im reinen murine Modell im Vergleich zum reinen humanen Modell wieder deutlicher zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass aktives Trypsin die CTSB-Aktivität stabilisiert, indem es seinen Inhibitor Cystatin C degradiert. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass sowohl Cystatin C als auch prozessiertes Cystatin C Cathepsin L hemmt und somit keinen Einfluss auf die Cathepsin L-Aktivität hat. Dies erklärt, warum *in vivo* die CTSB-Aktivität ansteigt, jedoch die Aktivität von CTSL weiter gehemmt wird und daher unbeeinflusst von der Prozessierung des Cystatin C ist.

Es ist bekannt, dass Trypsin spezifisch am Lysin und Arginin hydrolysiert. Die Spaltung wird unterdrückt, wenn diese beiden Aminosäuren neben einem Prolin liegen. Die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Elke Hammer (Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Universitätsmedizin Greifswald) hat für uns mittels MS/MS-Analysen das spezifische schwere Fragment vom murinen Cystatin C und das unbehandelte murine Cystatin C untersucht. Hierbei konnte eine theoretische Masse von 6039,15 Da für das Fragment des murinen Cystatin C nachgewiesen werden, sowie dass die Spaltungsregion zwischen der Aminosäure 66-74 an einem der Arginine liegt. Herr Dr. Mark Dörr aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Uwe Bornscheuer (Institut für Biochemie, Universität Greifswald) ist dabei, für uns die Interaktion zwischen dem schweren Fragment des Cystatin C und dem Cathepsin B *in silico* zu modellieren. Die Daten sind jedoch nicht in der Arbeit gezeigt, da die Modellierungen noch andauern werden. In der nachfolgenden Abbildung sind unsere Hypothesen, in welcher Form Cathepsin B in der Azinuszelle vorliegt, dargestellt (Abb. 23).

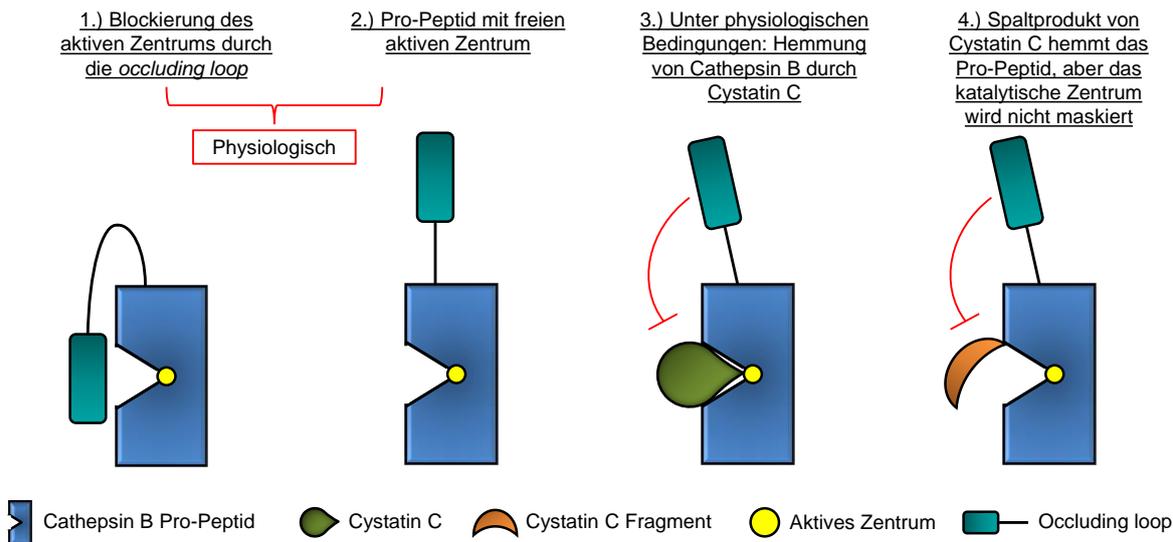


Abb. 23: Hypothesen zum Vorliegen von CTSB in der Azinuszelle. Physiologisch liegt das Pro-Peptid von CTSB als geschlossene und offene Form vor, sodass entweder das aktive Zentrum durch die *occluding loop* blockiert wird (1) oder frei zugänglich ist (2). Wenn das aktive Zentrum frei zugänglich ist, kann CTSB durch Cystatin C inhibiert werden. Die *occluding loop* ist nicht mehr fähig das aktive Zentrum zu blockieren (3). Unsere Hypothese ist, dass das Spaltprodukt des Cystatin C am CTSB bindet, aber nicht das katalytische Zentrum maskiert, sodass CTSB weiterhin aktiv bzw. aktiver sein kann. Hierdurch kommt es vermutlich durch die signifikant höhere Aktivität von CTSB durch Behandlung mit prozessierten Cystatin C, die wir *in vitro* mit rekombinanten Proteinen messen konnten.

Aufgrund unserer Beobachtungen, dass das prozessierte Cystatin C einen starken Einfluss auf die Aktivität von CTSB hat, wollten wir dies näher *in vivo* in Cystatin C-defizienten Mäusen untersuchen. Hierbei haben wir C57BL6/J Wildtyp Mäuse als Kontrolle verwendet.

5.4 Die Deletion von Cystatin C im Mausmodell der akuten und chronischen Pankreatitis

Im Tiermodell einer Caerulein-induzierten Pankreatitis lässt sich ein biphasischer Verlauf für die Proteaseaktivierung, im Speziellen für die Trypsinogenaktivierung, beobachten. Für die tierexperimentellen Schadensmarker Serum Amylase und Lipase kann ebenfalls der biphasische Krankheitsverlauf beobachtet werden. Dabei zeigt sich ein erster Peak 1 h nach Induktion der Pankreatitis, gefolgt von einem Abfall und ein zweiter Peak nach 8 h. Nach 24 h fallen die Werte wieder zurück auf das Level wie unter physiologischen Bedingungen⁵⁹. Vermutlich lässt sich der erste Anstieg auf die supramaximale Stimulation mit Caerulein und der nachfolgenden Co-Lokalisierung der Lysosomen mit den Zymogen-

granula zurückführen. Der zweite stärkere Anstieg der Proteaseaktivierung 8 h nach Pankreatitis-Induktion erfolgt zusammen mit einer Infiltration von Leukozyten in das Pankreasgewebe und könnte daher auch eine andere Ursache haben, welche noch unklar ist ²⁰⁶. Anhand dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass mehrere Mechanismen an der Proteaseaktivierung beteiligt sind. Unsere Daten zeigen auch ein biphasischen Verlauf, wobei in Cystatin C-defizienten Mäusen auch 24 h nach Induktion der Pankreatitis die Trypsinaktivität sowie die Serum Amylase und Lipase nicht wieder auf das Grundlevel zurückfiel. Es zeigte sich ein deutlich höherer Gewebeschaden, was auch histologisch zu erkennen war. Zuvor wurde in subzellulären Fraktionierungsversuchen gezeigt, dass es im Verlauf der Pankreatitis zu einer schnellen Aktivitätsumverteilung von CTSB aus der lysosomalen Fraktion in die Zymogengranula-Fraktion kommt ⁷⁰. Unsere Ergebnisse zeigen dies ebenfalls für die C57BL6/J Wildtyp Mäuse und die Cystatin C-defizienten Mäuse, wobei die Aktivitäten für CTSB und CTSL in den Cystatin C-defizienten Mäusen signifikant höher waren. Die meisten lysosomalen Hydrolasen haben ein pH-Optimum bei ca. 5,0. Jedoch scheint der Ort der Co-Lokalisierung während frühen Stadien der Pankreatitis einen neutralen pH-Wert zu haben. Studien zur Charakterisierung des pH-Optimums für CTSB zeigten, dass eine beträchtliche Aktivität auch bei pH 7,0 vorhanden ist ^{73,202}. Inhibition von CTSB mit dem zelldurchlässigen und hoch spezifischen CTSB-Inhibitor CA-074me zeigte sowohl in dem Caerulein-induzierten als auch in dem Taurocholat-induzierten Pankreatitis-Modell eine Hemmung von CTSB und somit auch eine Hemmung der Trypsinogenaktivierung. Dabei wurde auch der Schweregrad reduziert ²⁰⁷. Gleiches wurde auch mit CTSB-defizienten Mäusen nachgewiesen ⁵⁹. Diese Beobachtungen unterstützen die Theorie, dass CTSB eine entscheidende Rolle bei der Trypsinogenaktivierung während der Pankreatitis spielt und dass gleichzeitig damit ein höherer Schweregrad der Erkrankung verbunden ist. In dem Caerulein- und dem Taurocholat-induzierten Pankreatitis-Modellen ist die Co-Lokalisierung der Zymogengranula mit Lysosomen abhängig von der Aktivität der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Die Co-Lokalisierung kann in diesen Modellen durch Verabreichung der PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY49002 verhindert werden. Hierbei wurde gezeigt, dass die Verabreichung der PI3K-Inhibitoren zu einer Reduktion der Trypsinogenaktivierung führt. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Verhinderung der Co-Lokalisierung durch Inhibition der PI3K zu einer Reduktion der Zymogenaktivierung in diesen Pankreatitis-Modellen führen kann ²⁰⁸. In einer weiteren Studie mit dem potenten CTSB-Inhibitor CA-074me zeigten van Acker et al., dass trotz Inhibition der Trypsinogenaktivierung durch Hemmung von CTSB noch eine Co-Lokalisierung von Zymogengranula mit Lysosomen stattfand. Sie schlussfolgerten daraus, dass die Zymogenaktivierung von dem Phänomen der Co-Lokalisierung abhängt, aber ebenfalls widersprüchlich zu der Theorie ist, dass die Zymogenaktivierung zu der Co-Lokalisierung führt ^{73,209}. T7K24R ist

eine humane hereditäre mit Pankreatitis-assoziierte Mutation im nativen kationischen Mastrypsinogen (Isoform T7). Diese T7K24R-Mutation sowie die Deletion von protektiven Chymotrypsinogen B1 führten zu einer erhöhten intrapancreatischen Trypsinogenaktivierung und einer schwerer verlaufenden Pankreatitis^{65,210}. Durch die Präparation lebender Azinuszellen kann zum einen die intraazinären Prozesse, welche ursächlich für die akute Pankreatitis sind, näher betrachtet werden¹⁸⁶. Durch die Aktivierung von Trypsinogen durch CTSB⁵⁹ steigt sowohl die Trypsinaktivität an als auch die Aktivitäten der weiteren Verdauungsenzyme, wie z.B. Elastase. Der Verlauf der akuten Pankreatitis kann durch Schweregradmarker wie die Serum Amylase und Lipase sowie die Myeloperoxidase (MPO) in der Lunge, welche ein Marker für systemische Schäden ist, bestimmt werden. Im Falle der chronischen Pankreatitis wurde neben der MPO, auch die Fibrose untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen in beiden Fällen einen deutlichen Anstieg des Schweregrades in den Cystatin C-defizienten Mäusen. Diese Ergebnisse verdeutlichen welche Bedeutung die Cathepsin B vermittelte Aktivierung von Trypsin im Verlauf der Pankreatitis hat, und unterstreichen die wichtige Rolle endogener Inhibitoren für diesen Prozess.

Zuvor wurde gezeigt, dass Cathepsin B der Aktivator von Trypsinogen ist^{59,148,207} und Cathepsin L degradiert sowohl Trypsinogen als auch Trypsin⁶⁴. Darüber hinaus ist Trypsin in der Lage Cystatin C zu degradieren. Dieses prozessierte Cystatin C kann wiederum immer noch Cathepsin L inhibieren, jedoch nicht Cathepsin B. Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass während der Pankreatitis ein Ungleichgewicht zwischen Cathepsin B und Cathepsin L herrscht. Anhand unserer Ergebnisse lässt sich vermuten, dass das Gleichgewicht aufseiten des Cathepsin B liegt. Das heißt, es steht eine erhöhte Trypsinogen-Aktivierung gegenüber eines verminderten Trypsin-Abbaus. Demzufolge kommt es zur Aktivierung der Proteasekaskade (Abb. 24).

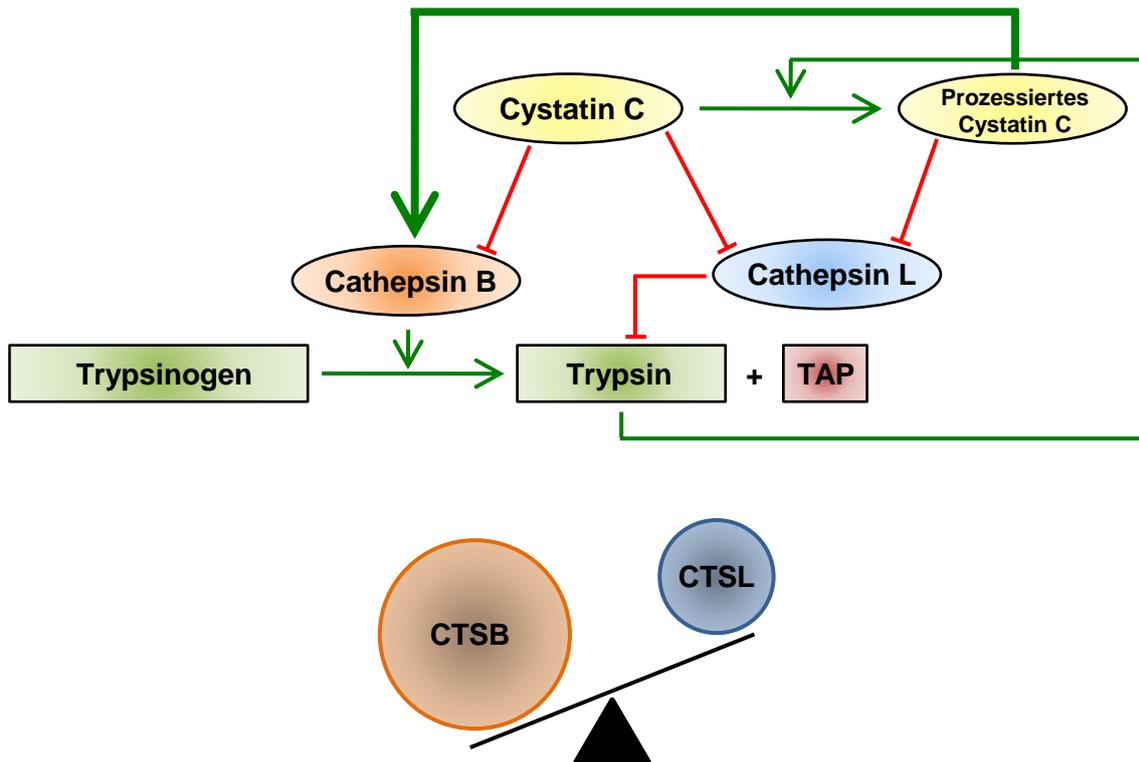


Abb. 24: Pathologisches Ungleichgewicht von Cathepsin B und L. Cathepsin B aktiviert Trypsinogen zu Trypsin. Cathepsin L degradiert Trypsinogen und aktives Trypsin. Cystatin C kann sowohl Cathepsin B als auch Cathepsin L inhibieren. Trypsin degradiert wiederum Cystatin C. Das prozessierte Cystatin C ist in der Lage Cathepsin L zu inhibieren. Jedoch kann das prozessierte Cystatin C nicht Cathepsin B inhibieren, sondern führt zu einer noch höheren Cathepsin B-Aktivität. Vermutlich herrscht während der Pankreatitis ein Ungleichgewicht zwischen Cathepsin B und Cathepsin L. Wir denken, dass das Gleichgewicht aufseiten des Cathepsin B liegt. Erhöhte Trypsinogen-Aktivierung steht einen verminderten Trypsin-Abbau gegenüber. Folglich führt dies zur Aktivierung der Proteasekaskade.

5.5 Ausblick und Relevanz

Das Pankreas ist ein wichtiges retroperitoneales Organ, da es die Produktion von Hormonen und Verdauungsenzymen reguliert. Das heißt ein Leben ohne Pankreas ist für den Menschen nicht möglich. Die Pathogenese der akuten Pankreatitis ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es gibt bis zum heutigen Tage noch keine kausale Therapie, die Behandlung erfolgt meist symptomatisch. Patienten, die an einer akuten Pankreatitis leiden, haben oft eine verkürzte Lebenserwartung und kommen meist in einem Zustand zum Arzt, in dem die ersten Krankheitsstadien bereits vorüber sind. Hierdurch sind klinische Daten eher rar und viele aktuelle Erkenntnisse über die Entstehung der akuten Pankreatitis stammen aus Untersuchungen an Tiermodellen der experimentellen Pankreatitis oder aus Studien an isolierten Zellen. Insbesondere die vorzeitige Proteaseaktivierung wurde in Tiermodellen der akuten Pankreatitis ausführlich untersucht. Durch Standardisierung und die Möglichkeit einer hohen Reproduzierbarkeit erlauben sie die Untersuchung verschiedener Schweregrade der Erkrankung und zellulärer Mechanismen. Obwohl keines dieser Tiermodelle die komplexe Situation beim Menschen vollständig widerspiegelt, ermöglichen sie wesentliche zelluläre und molekulare Mechanismen während der Pankreatitis zu untersuchen. Demzufolge ist die Untersuchung neuer Therapieansätze für die Pankreatitis von bedeutender Wichtigkeit. Die Proteasen Cathepsin B (CTSB) und Trypsin spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Pankreatitis. Aus diesem Grund haben wir die Regulation der Cathepsin B-Aktivität durch den Inhibitor Cystatin C während der akuten und chronischen Pankreatitis näher untersucht.

Wir konnten zeigen, dass prozessiertes (aktives) Cathepsin B bereits im sekretorischen Kompartiment der Azinuszellen vorhanden ist, auch unter physiologischen Bedingungen. Die CTSB-Aktivität wird durch Cystatin C gehemmt und eine vorzeitige Trypsinogenaktivierung verhindert. Eine Ansäuerung der sekretorischen Vesikel, wie sie bei der Pankreatitis auftritt, reduziert die inhibitorische Kapazität von Cystatin C und ermöglicht die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin durch CTSB. Infolgedessen wird Cystatin C durch Trypsin abgebaut, was die CTSB-Aktivität zusätzlich stabilisiert (Abb. 25).

Dies ermöglicht eine ausgedehnte und pH-unempfindliche Proteaseaktivierung über CTSB in der initiierenden Phase der Pankreatitis. Demzufolge kann die Cystatin C-Inhibition von CTSB als ein entscheidender Schutzmechanismus des Pankreas gegen eine vorzeitige verdauungsbedingte Proteaseaktivierung identifiziert werden.

Dies stellt einen neuen pathophysiologischen Mechanismus dar. Neben Cystatin C und B existieren noch verschiedene weitere Inhibitoren von Cathepsinen als auch von pankreatischen Proteasen. Die Untersuchung dieses Protease/Inhibitor-Gleichgewichts

birgt neue therapeutische Ansätze und ermöglicht auch ein tieferes Verständnis für die pathophysiologischen und zellulären Ursachen der akuten Pankreatitis.

Cathepsin B/Cystatin C Interaktion in Zymogengranula

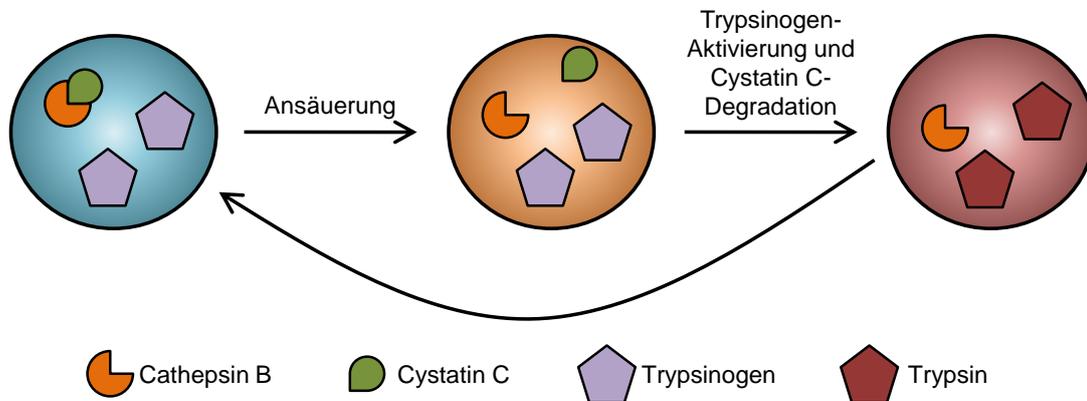


Abb. 25: Cathepsin B/Cystatin C Interaktion in Zymogengranula. (1) Cathepsin B ist physiologisch in sekretorischen Vesikeln vorhanden - und zwar unabhängig von der Pankreatitis. (2) Unter physiologischen Bedingungen wird Cathepsin B durch seine endogenen Inhibitoren gehemmt. (3) Die Induktion einer Pankreatitis verändert die biophysikalischen Eigenschaften in sekretorischen Vesikeln (Ansäuerung). (4) Diese Ansäuerung verändert die Hemmung von Cathepsin B durch seine endogenen Inhibitoren, erhöht seine Aktivität und die Transaktivierung von Trypsin durch Cathepsin B. Folglich läuft vermutlich eine Art Kreislauf ab.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
α	Alpha
β	Beta
δ	Delta
ε	Epsilon
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
AMC	4-Amino-methylcoumarin
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Carboxy
CA	Kalifornien
ca.	circa
CA-074me	Cathepsin B Inhibitor
Ca ²⁺	Calcium-Ion
Caer.	Caerulein
CCK	Cholecystokinin
CEL	Carboxylesterlipase
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cm	Zentimeter
CO	Colorado
CPA1	Carboxypeptidase A1
CTSB	Cathepsin B
CTSC	Cathepsin C
CTSD	Cathepsin D
CTSL	Cathepsin L

Abkürzungsverzeichnis

Cys	Cystein
CysC ^{-/-}	Cystatin C-defiziente Maus
Cyt	Cytosol
CTRC	Chymotrypsin C
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiolthreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCP	endoskopischen retrograden Cholangiopankreatikographie
et al.	“und andere”
etc.	et cetera
Ex	Exzitation
FCS	Fetal calf serum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gln	Glutamin
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HCCAA	Cystatin C-Amyloid-Angiopathie
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
i.p.	intraperitoneal
Ile	Isoleucin
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter

Leu	Leucin
LIMP-2	Lysosomal integral membrane protein 2
Lys	Lysosomen/lysosomale Fraktion
m	Meter
m	Milli
M	Molar
MA	Massachusetts
Man-6-P	Mannose-6-Phosphat
MD	Maryland
min	Minute
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mL	Milliliter
MM	Absolute Molekülmasse
MN	Minnesota
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MPO	Myeloperoxidase
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n	biologische Replikate/Gruppengröße
N	Amino
Na	Natrium
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (Transkriptionsfaktor)
nm	Nanometer
NY	New York
OH	Hydroxy
ORAI	Calcium release-activated calcium channel protein 1
p	Signifikanzniveau
p.a.	pro analysi ("zur Analyse")
PBS	Phosphat buffered saline
pH/pH-Wert	abgeleitet von pondus hydrogenii
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PNS	Postnuclear Supernatant
PP	Pankreatisches Polypeptid

Abkürzungsverzeichnis

Pro	Prolin
PRSS1	kationisches Trypsinogen
R110	Rhodamin 110
RER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RFU	Relative fluorescence units
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
Ser	Serin
SPINK-1	Serinprotease Inhibitor Kazal Typ 1
STIM1	Stromal interaction molecule 1
Suc	Succinyl
TAP	Trypsin-Aktivierungs-Peptid
TCA	Trichloressigsäure
TN	Tennessee
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPV4	Transient receptor potential channel subfamily V member 4
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TX	Texas
U	Units
UK	United Kingdom
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
w/v	Verhältnis Masse/Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZG	Zymogengranula/zymogenhaltige Fraktion

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antikörper inkl. der Herstellerfirma.....	22
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Enzyme und Inhibitoren inkl. der Herstellerfirma. .	23
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Substrate inkl. der Herstellerfirma.....	23
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien inkl. der Herstellerfirma.	24
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kits inkl. der Herstellerfirma.	26
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten allgemeinen Puffer, Medien und Lösungen mit ihrer Zusammensetzung.....	27
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Geräte inkl. der Herstellerfirma.	29
Tabelle 8: Auflistung sonstiger verwendeter Arbeitsmaterialien inkl. der Herstellerfirma. .	31
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Tierstämme inkl. ihrer Herkunft.	32
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software inkl. Herstellerfirma.	32
Tabelle 11: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Trenngele.....	42
Tabelle 12: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Sammelgel.	42

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Pankreas und seine Lage im menschlichen Körper.	3
Abb. 2: Physiologische Aktivierung der Proteasekaskade im Duodenum.....	8
Abb. 3: Pathophysiologische Aktivierung der Proteasekaskade in der Azinuszelle.	9
Abb. 4: Die Co-Lokalisierung von Cathepsin B und Trypsinogen ist entscheidend für die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin.....	10
Abb. 5: Proteolytische Aktivierung der Cathepsin-Kaskade.....	13
Abb. 6: Interaktion in der <i>occluding loop</i> im humanen Cathepsin B.....	16
Abb. 7: Konformationen der <i>occluding loop</i> im Cathepsin B (a) und Pro-Cathepsin B (b).17	
Abb. 8: Lokalisierung von Cystatin C und aktivem CTSB im sekretorischen Kompartiment im Mausmodell der akuten Pankreatitis.....	46
Abb. 9: Lokalisierung von Cystatin C und aktivem CTSB im sekretorischen Kompartiment im humanen Modell.....	47
Abb. 10: Subzelluläre Umverteilung der Pankreasenzym-Aktivitäten in C57BL6/J Wildtyp Mäusen während Caerulein-induzierter Pankreatitis (0 h, 1 h, 8 h).	49
Abb. 11: Die Cathepsin B-Aktivität in Zymogengranula ist pH-abhängig.	51
Abb. 12: Rekombinantes Cystatin C wird durch aktives Trypsin zeitabhängig prozessiert.	53
Abb. 13: MS/MS-Analysen des Spaltproduktes vom prozessierten murinen Cystatin C sowie des nicht gespaltenen murinen Cystatin C.	55
Abb. 14: Humane Cathepsin B/L-Aktivität in Gegenwart von Trypsin, Cystatin C und prozessierten Cystatin C..	56
Abb. 15: Murine/Humane Cathepsin B-Aktivität in Gegenwart von Trypsin, Cystatin C und prozessierten Cystatin C.	58
Abb. 16: Detektion von Cystatin C im Pankreashomogenat.	59
Abb. 17: Aktivitätsverteilung von Cathepsin B, Cathepsin L, Chymotrypsin und Trypsin während der Pankreatitis.....	60
Abb. 18: Subzelluläre Umverteilung der Pankreasenzym-Aktivitäten in C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen während Caerulein-induzierter Pankreatitis (0 h, 1 h, 8 h).....	62
Abb. 19: Aktivitäten von CTSB, CTSL und Chymotrypsin in Azinuszellhomogenaten von C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen.....	64
Abb. 20: Aktivitäten von CTSB, CTSL, Trypsin und Elastase in lebenden Azinuszellen von C57BL6/J Wildtyp und Cystatin C-defizienten Mäusen.....	66
Abb. 21: Einfluss von Cystatin C auf den Schweregrad der akuten Pankreatitis..	68

Abbildungsverzeichnis

Abb. 22: Einfluss von Cystatin C auf den Schweregrad der chronischen Pankreatitis.	70
Abb. 23: Hypothesen zum Vorliegen von CTSB in der Azinuszelle.	79
Abb. 24: Pathologisches Ungleichgewicht von Cathepsin B und L.	82
Abb. 25: Cathepsin B/Cystatin C Interaktion in Zymogengranula.	84

9 Literaturverzeichnis

1. Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J. & Kirsch, J. Bauchspeicheldrüse (Pankreas). *Duale Reihe Anatomie*. 748–756 (Thieme, 2020).
2. Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. Bauchspeicheldrüse (Pankreas). *Taschenlehrbuch Histologie*. 499–505 (Thieme, 2019).
3. Boron, W. F. & Boulpaep, E. L. Pancreatic and salivary glands. *Medical physiology: A cellular and molecular approach*. 912–932 (Saunders Elsevier, 2012).
4. Treuting, P. M., Dintzis, S. M., Liggitt, D. & Frevert, C. W. Pancreas. *Comparative anatomy and histology: A mouse and human atlas*. 203–209 (Academic Press, 2012).
5. Yadav, D. & Lowenfels, A. B. The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **144**, 1252–1261 (2013).
6. van Dijk, S. M. *et al.* Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials. *Gut* **66**, 2024–2032 (2017).
7. Chiari, Hans. Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde*. 69–96 (1896).
8. Xiao, A. Y. *et al.* Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 45–55 (2016).
9. Roberts, S. E. *et al.* The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **17**, 155–165 (2017).
10. Hernández, C. A. & Lerch, M. M. Sphincter stenosis and gallstone migration through the biliary tract. *Lancet Lond. Engl.* **341**, 1371–1373 (1993).
11. Maléth, J. *et al.* Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis. *Gastroenterology* **148**, 427–439.e16 (2015).
12. Sadr-Azodi, O., Andrén-Sandberg, Å., Orsini, N. & Wolk, A. Cigarette smoking, smoking cessation and acute pancreatitis: a prospective population-based study. *Gut* **61**, 262–267 (2012).
13. Frossard, J.-L., Steer, M. L. & Pastor, C. M. Acute pancreatitis. *Lancet Lond. Engl.* **371**, 143–152 (2008).
14. Nitsche, C. *et al.* Drug-induced pancreatitis. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **14**, 131–138 (2012).
15. Ljung, R., Lagergren, J., Bexelius, T. S., Mattsson, F. & Lindblad, M. Increased risk of acute pancreatitis among tetracycline users in a Swedish population-based case-control study. *Gut* **61**, 873–876 (2012).

16. Sadr-Azodi, O. *et al.* Association of oral glucocorticoid use with an increased risk of acute pancreatitis: a population-based nested case-control study. *JAMA Intern. Med.* **173**, 444–449 (2013).
17. Eland, I. A. *et al.* Antihypertensive medication and the risk of acute pancreatitis: the European case-control study on drug-induced acute pancreatitis (EDIP). *Scand. J. Gastroenterol.* **41**, 1484–1490 (2006).
18. Lerch, M. M., Stier, A., Wahnschaffe, U. & Mayerle, J. Pancreatic pseudocysts: observation, endoscopic drainage, or resection? *Dtsch. Arzteblatt Int.* **106**, 614–621 (2009).
19. Lowenfels, A. B. *et al.* Racial factors and the risk of chronic pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **94**, 790–794 (1999).
20. Lévy, P. *et al.* Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications. *Gastroentérologie Clin. Biol.* **30**, 838–844 (2006).
21. Yadav, D., Timmons, L., Benson, J. T., Dierkhising, R. A. & Chari, S. T. Incidence, prevalence, and survival of chronic pancreatitis: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 2192–2199 (2011).
22. Majumder, S. & Chari, S. T. Chronic pancreatitis. *Lancet Lond. Engl.* **387**, 1957–1966 (2016).
23. Hirota, M. *et al.* The seventh nationwide epidemiological survey for chronic pancreatitis in Japan: clinical significance of smoking habit in Japanese patients. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **14**, 490–496 (2014).
24. Lévy, P., Domínguez-Muñoz, E., Imrie, C., Löhr, M. & Maisonneuve, P. Epidemiology of chronic pancreatitis: burden of the disease and consequences. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2**, 345–354 (2014).
25. Wilcox, C. M. *et al.* Racial Differences in the Clinical Profile, Causes, and Outcome of Chronic Pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **111**, 1488–1496 (2016).
26. Romagnuolo, J. *et al.* Clinical Profile, Etiology, and Treatment of Chronic Pancreatitis in North American Women: Analysis of a Large Multicenter Cohort. *Pancreas* **45**, 934–940 (2016).
27. Yadav, D., Muddana, V. & O’Connell, M. Hospitalizations for chronic pancreatitis in Allegheny County, Pennsylvania, USA. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **11**, 546–552 (2011).
28. Schwarzenberg, S. J. *et al.* Pediatric chronic pancreatitis is associated with genetic risk factors and substantial disease burden. *J. Pediatr.* **166**, 890-896.e1 (2015).
29. Giefer, M. J. *et al.* Early-Onset Acute Recurrent and Chronic Pancreatitis Is Associated with PRSS1 or CTRC Gene Mutations. *J. Pediatr.* **186**, 95–100 (2017).

30. Coté, G. A. *et al.* Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **9**, 266–273; quiz e27 (2011).
31. Sendler, M., Mayerle, J. & Lerch, M. M. Molecular Basis of Diseases of the Exocrine Pancreas. *Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease*. 457–476 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-802761-5.00021-3.
32. Larsen, S. *et al.* Insulin-dependent diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis is not associated with HLA or the occurrence of islet-cell antibodies. *Eur. J. Immunogenet.* **17**, 189–193 (1990).
33. Witt, H., Apte, M. V., Keim, V. & Wilson, J. S. Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis, and Therapy. *Gastroenterology* **132**, 1557–1573 (2007).
34. Hall, T. C. *et al.* The socio-economic impact of chronic pancreatitis: a systematic review: The cost of chronic pancreatitis. *J. Eval. Clin. Pract.* **20**, 203–207 (2014).
35. Lugea, A. *et al.* The Combination of Alcohol and Cigarette Smoke Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology* **153**, 1674–1686 (2017).
36. Lugea, A. *et al.* Adaptive Unfolded Protein Response Attenuates Alcohol-Induced Pancreatic Damage. *Gastroenterology* **140**, 987-997.e8 (2011).
37. Hegyi, P. *et al.* International Consensus Guidelines for Risk Factors in Chronic Pancreatitis. Recommendations from the working group for the international consensus guidelines for chronic pancreatitis in collaboration with the International Association of Pancreatology, the American Pancreatic Association, the Japan Pancreas Society, and European Pancreatic Club. *Pancreatology* **20**, 579–585 (2020).
38. Kleeff, J. *et al.* Chronic pancreatitis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **3**, 17060 (2017).
39. Etemad, B. & Whitcomb, D. C. Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* **120**, 682–707 (2001).
40. Whitcomb, D. C. *et al.* Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat. Genet.* **14**, 141–145 (1996).
41. Witt, H. *et al.* Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat. Genet.* **25**, 213–216 (2000).
42. Rosendahl, J. *et al.* Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat. Genet.* **40**, 78–82 (2008).
43. Witt, H. *et al.* Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat. Genet.* **45**, 1216–1220 (2013).
44. Moore, P. C. *et al.* Elastase 3B mutation links to familial pancreatitis with diabetes and pancreatic adenocarcinoma. *J. Clin. Invest.* **129**, 4676–4681 (2019).

45. Whitcomb, D. C. Genetic risk factors for pancreatic disorders. *Gastroenterology* **144**, 1292–1302 (2013).
46. Keim, V. *et al.* Clinical characterization of patients with hereditary pancreatitis and mutations in the cationic trypsinogen gene. *Am. J. Med.* **111**, 622–626 (2001).
47. Németh, B. C. & Sahin-Tóth, M. Human cationic trypsinogen (PRSS1) variants and chronic pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **306**, G466-473 (2014).
48. Aoun, E. *et al.* Pathways to injury in chronic pancreatitis: decoding the role of the high-risk SPINK1 N34S haplotype using meta-analysis. *PloS One* **3**, e2003 (2008).
49. Ravnik-Glavač, M., Glavač, D., di Sant' Agnese, P., Chernick, M. & Dean, M. Cystic fibrosis gene mutations detected in hereditary pancreatitis. *Pflüg. Arch.* **431**, R191–R192 (1996).
50. Hegyi, P. *et al.* CFTR: A New Horizon in the Pathomechanism and Treatment of Pancreatitis. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **170**, 37–66 (2016).
51. Lukas, J. *et al.* Role of endoplasmic reticulum stress and protein misfolding in disorders of the liver and pancreas. *Adv. Med. Sci.* **64**, 315–323 (2019).
52. Sahin-Tóth, M. Genetic risk in chronic pancreatitis: the misfolding-dependent pathway. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **33**, 390–395 (2017).
53. Mayerle, J. *et al.* Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis. *Gastroenterology* **156**, 1951-1968.e1 (2019).
54. Fjeld, K. *et al.* A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nat. Genet.* **47**, 518–522 (2015).
55. Hegyi, E. & Sahin-Tóth, M. Human CPA1 mutation causes digestive enzyme misfolding and chronic pancreatitis in mice. *Gut* **68**, 301–312 (2019).
56. Németh, B. C. *et al.* Novel p.K374E variant of CPA1 causes misfolding-induced hereditary pancreatitis with autosomal dominant inheritance. *Gut* **69**, 790–792 (2020).
57. Maroux, S., Baratti, J. & Desnuelle, P. Purification and specificity of porcine enterokinase. *J. Biol. Chem.* **246**, 5031–5039 (1971).
58. Rinderknecht, H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig. Dis. Sci.* **31**, 314–321 (1986).
59. Halangk, W. *et al.* Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* **106**, 773–781 (2000).
60. Sendler, M. *et al.* Cathepsin B Activity Initiates Apoptosis via Digestive Protease Activation in Pancreatic Acinar Cells and Experimental Pancreatitis. *J. Biol. Chem.* **291**, 14717–14731 (2016).
61. Geisz, A. & Sahin-Tóth, M. A preclinical model of chronic pancreatitis driven by trypsinogen autoactivation. *Nat. Commun.* **9**, 5033 (2018).

62. Weiss, F. U. *et al.* SPINK1 mutations and phenotypic expression in patients with pancreatitis associated with trypsinogen mutations. *J. Med. Genet.* **40**, e40 (2003).
63. Behrendorff, N., Floetenmeyer, M., Schwiening, C. & Thorn, P. Protons released during pancreatic acinar cell secretion acidify the lumen and contribute to pancreatitis in mice. *Gastroenterology* **139**, 1711–1720, 1720.e1–5 (2010).
64. Wartmann, T. *et al.* Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice. *Gastroenterology* **138**, 726–737 (2010).
65. Jancsó, Z., Hegyi, E. & Sahin-Tóth, M. Chymotrypsin Reduces the Severity of Secretagogue-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* **155**, 1017–1021 (2018).
66. Toldi, V., Szabó, A. & Sahin-Tóth, M. Inactivation of mesotrypsin by chymotrypsin C prevents trypsin inhibitor degradation. *J. Biol. Chem.* **295**, 3447–3455 (2020).
67. Szmola, R., Kukor, Z. & Sahin-Tóth, M. Human mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors. *J. Biol. Chem.* **278**, 48580–48589 (2003).
68. Sahin-Tóth, M. Human mesotrypsin defies natural trypsin inhibitors: from passive resistance to active destruction. *Protein Pept. Lett.* **12**, 457–464 (2005).
69. Salameh, M. A., Soares, A. S., Hockla, A. & Radisky, E. S. Structural basis for accelerated cleavage of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) by human mesotrypsin. *J. Biol. Chem.* **283**, 4115–4123 (2008).
70. Saluja, A. *et al.* Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol.* **253**, G508-516 (1987).
71. Brown, W. J. & Farquhar, M. G. Accumulation of coated vesicles bearing mannose 6-phosphate receptors for lysosomal enzymes in the Golgi region of I-cell fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 5135–5139 (1984).
72. Niederau, C. & Grendell, J. H. Intracellular vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment. *J. Clin. Invest.* **81**, 229–236 (1988).
73. van Acker, G. J. D., Perides, G. & Steer, M. L. Co-localization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **12**, 1985–1990 (2006).
74. Koike, H., Steer, M. L. & Meldolesi, J. Pancreatic effects of ethionine: blockade of exocytosis and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis. *Am. J. Physiol.* **242**, G297-307 (1982).
75. Watanabe, O., Baccino, F. M., Steer, M. L. & Meldolesi, J. Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am. J. Physiol.* **246**, G457-467 (1984).

76. Malla, S. R. *et al.* Early trypsin activation develops independently of autophagy in caerulein-induced pancreatitis in mice. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **77**, 1811–1825 (2020).
77. Krüger, B., Albrecht, E. & Lerch, M. M. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am. J. Pathol.* **157**, 43–50 (2000).
78. Saluja, A. K., Dawra, R. K., Lerch, M. M. & Steer, M. L. CCK-JMV-180, an analog of cholecystokinin, releases intracellular calcium from an inositol trisphosphate-independent pool in rat pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* **267**, 11202–11207 (1992).
79. Yamasaki, M. *et al.* Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca²⁺ spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr. Biol. CB* **15**, 874–878 (2005).
80. Ashby, M. C. & Tepikin, A. V. Polarized calcium and calmodulin signaling in secretory epithelia. *Physiol. Rev.* **82**, 701–734 (2002).
81. Petersen, O. H. Ca²⁺ signalling and Ca²⁺-activated ion channels in exocrine acinar cells. *Cell Calcium* **38**, 171–200 (2005).
82. Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V. & Petersen, O. H. The role of Ca²⁺ in the pathophysiology of pancreatitis. *J. Physiol.* **592**, 269–280 (2014).
83. Wen, L. *et al.* Inhibitors of ORA11 Prevent Cytosolic Calcium-Associated Injury of Human Pancreatic Acinar Cells and Acute Pancreatitis in 3 Mouse Models. *Gastroenterology* **149**, 481-492.e7 (2015).
84. Kim, M.-H., Seo, J. B., Burnett, L. A., Hille, B. & Koh, D.-S. Characterization of store-operated Ca²⁺ channels in pancreatic duct epithelia. *Cell Calcium* **54**, 266–275 (2013).
85. Romac, J. M.-J., Shahid, R. A., Swain, S. M., Vigna, S. R. & Liddle, R. A. Piezo1 is a mechanically activated ion channel and mediates pressure induced pancreatitis. *Nat. Commun.* **9**, 1715 (2018).
86. Mukherjee, R. *et al.* Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. *Gut* **65**, 1333–1346 (2016).
87. Kubisch, C. H. & Logsdon, C. D. Endoplasmic reticulum stress and the pancreatic acinar cell. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 249–260 (2008).
88. Gukovsky, I., Gukovskaya, A. S., Blinman, T. A., Zaninovic, V. & Pandol, S. J. Early NF- κ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **275**, G1402–G1414 (1998).
89. Chen, X. *et al.* NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* **122**, 448–57 (2002).

90. Biczó, G. *et al.* Mitochondrial Dysfunction, Through Impaired Autophagy, Leads to Endoplasmic Reticulum Stress, Deregulated Lipid Metabolism, and Pancreatitis in Animal Models. *Gastroenterology* **154**, 689–703 (2018).
91. Diakopoulos, K. N. *et al.* Impaired Autophagy Induces Chronic Atrophic Pancreatitis in Mice via Sex- and Nutrition-Dependent Processes. *Gastroenterology* **148**, 626-638.e17 (2015).
92. Sendler, M. & Lerch, M. M. Zelluläre Pathomechanismen der akuten Pankreatitis. *J. Für Gastroenterol. Hepatol. Erkrank.* **18**, 102–109 (2020).
93. Garg, P. K. & Singh, V. P. Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* **156**, 2008–2023 (2019).
94. Willstätter, R. & Bamann, E. Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukocyten. *Hoppe-Seyler's Z. Für Physiol. Chem.* **180**, 127–143 (1929).
95. Turk, V. *et al.* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1824**, 68–88 (2012).
96. Turk, B., Turk, D. & Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 98–111 (2000).
97. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. Cysteine Peptidases. in *Handbook of Proteolytic Enzymes* 554–669 (Academic Press, 1998).
98. Kominami, E., Tsukahara, T., Hara, K. & Katunuma, N. Biosyntheses and processing of lysosomal cysteine proteinases in rat macrophages. *FEBS Lett.* **231**, 225–228 (1988).
99. Nishimura, Y., Kawabata, T. & Kato, K. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* **261**, 64–71 (1988).
100. Ishidoh, K. & Kominami, E. Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol. Chem.* **383**, 1827–1831 (2002).
101. Khaket, T. P., Kwon, T. K. & Kang, S. C. Cathepsins: Potent regulators in carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.* **198**, 1–19 (2019).
102. Turk, D. *et al.* Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *EMBO J.* **20**, 6570–6582 (2001).
103. Guncar, G. *et al.* Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **6**, 51–61 (1998).

104. Guncar, G. *et al.* Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Struct. Lond. Engl.* **1993** *8*, 305–313 (2000).
105. Musil, D. *et al.* The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* **10**, 2321–2330 (1991).
106. Bühling, F. *et al.* Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 612–619 (1999).
107. Bühling, F. *et al.* Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa. *Biol. Chem.* **385**, 439–445 (2004).
108. Haeckel, C. *et al.* Expression of cathepsin K in the human embryo and fetus. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **216**, 89–95 (1999).
109. Krueger, S. *et al.* Up-regulation of cathepsin X in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. *J. Pathol.* **207**, 32–42 (2005).
110. Krueger, S., Kalinski, T., Wolf, H., Kellner, U. & Roessner, A. Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture--regulation of cathepsin B expression and invasiveness. *Cancer Lett.* **223**, 313–322 (2005).
111. Kuester, D. *et al.* Upregulation of cathepsin W-expressing T cells is specific for autoimmune atrophic gastritis compared to other types of chronic gastritis. *World J. Gastroenterol.* **11**, 5951–5957 (2005).
112. Wex, T. *et al.* Human cathepsin W, a cysteine protease predominantly expressed in NK cells, is mainly localized in the endoplasmic reticulum. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 2172–2178 (2001).
113. Xia, L. *et al.* Localization of rat cathepsin K in osteoclasts and resorption pits: inhibition of bone resorption and cathepsin K-activity by peptidyl vinyl sulfones. *Biol. Chem.* **380**, 679–687 (1999).
114. Vasiljeva, O. & Turk, B. Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie* **90**, 380–386 (2008).
115. Turk, B. *et al.* Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* **376**, 225–230 (1995).
116. Turk, B. & Stoka, V. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett.* **581**, 2761–2767 (2007).
117. Kirschke, H., Wiederanders, B., Brömme, D. & Rinne, A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem. J.* **264**, 467–473 (1989).
118. Turk, B., Dolenc, I., Turk, V. & Bieth, J. G. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry* **32**, 375–380 (1993).

119. Turk, V., Turk, B. & Turk, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* **20**, 4629–4633 (2001).
120. Vasiljeva, O. *et al.* Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 387–403 (2007).
121. Felbor, U. *et al.* Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7883–7888 (2002).
122. Turk, B., Turk, D. & Salvesen, G. S. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 1623–1637 (2002).
123. Klotz, C., Ziegler, T., Daniłowicz-Luebert, E. & Hartmann, S. Cystatins of parasitic organisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **712**, 208–221 (2011).
124. Ogrinc, T., Dolenc, I., Ritonja, A. & Turk, V. Purification of the complex of cathepsin L and the MHC class II-associated invariant chain fragment from human kidney. *FEBS Lett.* **336**, 555–559 (1993).
125. Fox, T., de Miguel, E., Mort, J. S. & Storer, A. C. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* **31**, 12571–12576 (1992).
126. Mach, L., Mort, J. S. & Glössl, J. Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J. Biol. Chem.* **269**, 13030–13035 (1994).
127. Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K. & Jordans, S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* **90**, 194–207 (2008).
128. Yan, S. & Sloane, B. F. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol. Chem.* **384**, 845–854 (2003).
129. Turk, V., Turk, B., Guncar, G., Turk, D. & Kos, J. Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv. Enzyme Regul.* **42**, 285–303 (2002).
130. Mohamed, M. M. & Sloane, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 764–775 (2006).
131. Pozgan, U. *et al.* Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol. Chem.* **391**, 571–579 (2010).
132. Gabrijelcic, D. *et al.* Cathepsins B, H and L in human breast carcinoma. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. J. Forum Eur. Clin. Chem. Soc.* **30**, 69–74 (1992).
133. Turk, V., Kos, J. & Turk, B. Cysteine cathepsins (proteases)--on the main stage of cancer? *Cancer Cell* **5**, 409–410 (2004).
134. Stoka, V., Turk, B. & Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life* **57**, 347–353 (2005).

135. Gocheva, V. & Joyce, J. A. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle Georget. Tex* **6**, 60–64 (2007).
136. Polgár, L. & Csoma, C. Dissociation of ionizing groups in the binding cleft inversely controls the endo- and exopeptidase activities of cathepsin B. *J. Biol. Chem.* **262**, 14448–14453 (1987).
137. Khouri, H. E. *et al.* A model to explain the pH-dependent specificity of cathepsin B-catalysed hydrolyses. *Biochem. J.* **275 (Pt 3)**, 751–757 (1991).
138. Illy, C. *et al.* Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 1197–1202 (1997).
139. Turk, D. *et al.* Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: A basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors. *Biochemistry* **34**, 4791–4797 (1995).
140. Kerr, I. D., Wu, P., Marion-Tsukamaki, R., Mackey, Z. B. & Brinen, L. S. Crystal Structures of TbCatB and rhodesain, potential chemotherapeutic targets and major cysteine proteases of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e701 (2010).
141. Turk, V., Stoka, V. & Turk, D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 5406–5420 (2008).
142. Podobnik, M., Kuhelj, R., Turk, V. & Turk, D. Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen. *J. Mol. Biol.* **271**, 774–788 (1997).
143. Cygler, M. *et al.* Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **4**, 405–416 (1996).
144. Nägler, D. K. *et al.* Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry* **36**, 12608–12615 (1997).
145. Quraishi, O. *et al.* The occluding loop in cathepsin B defines the pH dependence of inhibition by its propeptide. *Biochemistry* **38**, 5017–5023 (1999).
146. Greenbaum, L. M., Hirshkowitz, A. & Shoichet, I. The activation of trypsinogen by cathepsin B. *J. Biol. Chem.* **234**, 2885–2890 (1959).
147. Halangk, W., Stürzebecher, J., Matthias, R., Schulz, H. U. & Lippert, H. Trypsinogen activation in rat pancreatic acinar cells hyperstimulated by caerulein. *Biochim. Biophys. Acta* **1362**, 243–251 (1997).
148. Saluja, A. K. *et al.* Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology* **113**, 304–310 (1997).
149. Hofbauer, B. *et al.* Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am. J. Physiol.* **275**, G352-362 (1998).

150. Kukor, Z. *et al.* Presence of cathepsin B in the human pancreatic secretory pathway and its role in trypsinogen activation during hereditary pancreatitis. *J. Biol. Chem.* **277**, 21389–21396 (2002).
151. Hirano, T. *et al.* Apical secretion of lysosomal enzymes in rabbit pancreas occurs via a secretagogue regulated pathway and is increased after pancreatic duct obstruction. *J. Clin. Invest.* **87**, 865–869 (1991).
152. Turk, B., Turk, V. & Turk, D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* **378**, 141–150 (1997).
153. Kirschke, H., Barrett, A. J. & Rawlings, N. D. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* **2**, 1581–1643 (1995).
154. Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M. & Turk, B. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol. Chem.* **379**, 137–147 (1998).
155. Björk, I., Alriksson, E. & Ylinenjärvi, K. Kinetics of binding of chicken cystatin to papain. *Biochemistry* **28**, 1568–1573 (1989).
156. Björk, I. & Ylinenjärvi, K. Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinases actinidin, chymopapain A, and ficin. *Biochemistry* **29**, 1770–1776 (1990).
157. Lindahl, P., Abrahamson, M. & Björk, I. Interaction of recombinant human cystatin C with the cysteine proteinases papain and actinidin. *Biochem. J.* **281 (Pt 1)**, 49–55 (1992).
158. Turk, B., Colić, A., Stoka, V. & Turk, V. Kinetics of inhibition of bovine cathepsin S by bovine stefin B. *FEBS Lett.* **339**, 155–159 (1994).
159. Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M. & Nathanson, C.-M. Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.* 179–199 (2003) doi:10.1042/bss0700179.
160. Turk, V. & Bode, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* **285**, 213–219 (1991).
161. Pavlova, A., Krupa, J. C., Mort, J. S., Abrahamson, M. & Björk, I. Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration By release of loop anchoring through mutation of his110. *FEBS Lett.* **487**, 156–160 (2000).
162. Barrett, A. J. *et al.* Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem. J.* **236**, 312 (1986).
163. Rawlings, N. D., Tolle, D. P. & Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* **378**, 705–716 (2004).
164. Nycander, M., Estrada, S., Mort, J. S., Abrahamson, M. & Björk, I. Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. *FEBS Lett.* **422**, 61–64 (1998).

165. Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M. & Turk, V. Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* **384**, 211–214 (1996).
166. Grubb, A. & Löfberg, H. Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3024–3027 (1982).
167. Abrahamson, M., Barrett, A. J., Salvesen, G. & Grubb, A. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J. Biol. Chem.* **261**, 11282–11289 (1986).
168. Abrahamson, M. *et al.* Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem. J.* **268**, 287–294 (1990).
169. Thomas, T., Schreiber, G. & Jaworowski, A. Developmental patterns of gene expression of secreted proteins in brain and choroid plexus. *Dev. Biol.* **134**, 38–47 (1989).
170. Olafsson, I. & Grubb, A. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **7**, 70–79 (2000).
171. Mi, W. *et al.* Cystatin C inhibits amyloid-beta deposition in Alzheimer's disease mouse models. *Nat. Genet.* **39**, 1440–1442 (2007).
172. Kos, J., Stabuc, B., Cimerman, N. & Brünner, N. Serum cystatin C, a new marker of glomerular filtration rate, is increased during malignant progression. *Clin. Chem.* **44**, 2556–2557 (1998).
173. Kos, J. *et al.* Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 505–511 (2000).
174. Huh, C. G. *et al.* Decreased metastatic spread in mice homozygous for a null allele of the cystatin C protease inhibitor gene. *Mol. Pathol. MP* **52**, 332–340 (1999).
175. Sokol, J. P. & Schiemann, W. P. Cystatin C antagonizes transforming growth factor beta signaling in normal and cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* **2**, 183–195 (2004).
176. Kolwijck, E. *et al.* The balance between extracellular cathepsins and cystatin C is of importance for ovarian cancer. *Eur. J. Clin. Invest.* **40**, 591–599 (2010).
177. Završnik, J. *et al.* Cystatin C deficiency suppresses tumor growth in a breast cancer model through decreased proliferation of tumor cells. *Oncotarget* **8**, 73793–73809 (2017).
178. Shi, G. P. *et al.* Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **104**, 1191–1197 (1999).

179. Schulte, S. *et al.* Cystatin C deficiency promotes inflammation in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurisms in atherosclerotic mice. *Am. J. Pathol.* **177**, 456–463 (2010).
180. Ferguson, T. W., Komenda, P. & Tangri, N. Cystatin C as a biomarker for estimating glomerular filtration rate. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **24**, 295–300 (2015).
181. Tartakoff, A. M. & Jamieson, J. D. Subcellular fractionation of the pancreas. *Methods Enzymol.* **31**, 41–59 (1974).
182. Grosfils, K., Métioui, M., Tiouli, M. & Dehaye, J. P. Isolation of rat pancreatic acini with crude collagenase and permeabilization of these acini with streptolysin O. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **79**, 99–115 (1993).
183. Krüger, B., Lerch, M. M. & Tessenow, W. Direct detection of premature protease activation in living pancreatic acinar cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **78**, 763–764 (1998).
184. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
185. Halangk, W. & Lerch, M. M. Early events in acute pancreatitis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **33**, 717–731 (2004).
186. Lerch, M. M. *et al.* Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology* **103**, 205–213 (1992).
187. Grady, T. *et al.* Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am. J. Physiol.* **275**, G1010-1017 (1998).
188. Saluja, A. K. *et al.* Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* **276**, G835-842 (1999).
189. Dawra, R. *et al.* Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis. *Gastroenterology* **141**, 2210-2217.e2 (2011).
190. Murphy, J. A. *et al.* Direct activation of cytosolic Ca²⁺ signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **135**, 632–641 (2008).
191. Lerch, M. M., Saluja, A. K., Rünzi, M., Dawra, R. & Steer, M. L. Luminal endocytosis and intracellular targeting by acinar cells during early biliary pancreatitis in the opossum. *J. Clin. Invest.* **95**, 2222–2231 (1995).
192. Sherwood, M. W. *et al.* Activation of trypsinogen in large endocytic vacuoles of pancreatic acinar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5674–5679 (2007).
193. Mareninova, O. A. *et al.* Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* **119**, 3340–3355 (2009).

194. Mareninova, O. A. *et al.* Lysosome associated membrane proteins maintain pancreatic acinar cell homeostasis: LAMP-2 deficient mice develop pancreatitis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 678–694 (2015).
195. Fortunato, F. *et al.* Impaired autolysosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy, and necrosis in pancreatitis. *Gastroenterology* **137**, 350–360, 360.e1–5 (2009).
196. Meister, T. *et al.* Missorting of cathepsin B into the secretory compartment of CI-MPR/IGFII-deficient mice does not induce spontaneous trypsinogen activation but leads to enhanced trypsin activity during experimental pancreatitis--without affecting disease severity. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **61**, 565–575 (2010).
197. Steer, M. L., Meldolesi, J. & Figarella, C. Pancreatitis. The role of lysosomes. *Dig. Dis. Sci.* **29**, 934–938 (1984).
198. Rinderknecht, H., Renner, I. G. & Koyama, H. H. Lysosomal enzymes in pure pancreatic juice from normal healthy volunteers and chronic alcoholics. *Dig. Dis. Sci.* **24**, 180–186 (1979).
199. Talukdar, R. *et al.* Release of Cathepsin B in Cytosol Causes Cell Death in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* **151**, 747-758.e5 (2016).
200. Lyo, V. *et al.* Active cathepsins B, L, and S in murine and human pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **303**, G894-903 (2012).
201. Ekiel, I. & Abrahamson, M. Folding-related dimerization of human cystatin C. *J. Biol. Chem.* **271**, 1314–1321 (1996).
202. Lerch, M. M., Saluja, A. K., Dawra, R., Saluja, M. & Steer, M. L. The effect of chloroquine administration on two experimental models of acute pancreatitis. *Gastroenterology* **104**, 1768–1779 (1993).
203. Waterford, S. D., Kolodecik, T. R., Thrower, E. C. & Gorelick, F. S. Vacuolar ATPase regulates zymogen activation in pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* **280**, 5430–5434 (2005).
204. Bhoomagoud, M. *et al.* Reducing extracellular pH sensitizes the acinar cell to secretagogue-induced pancreatitis responses in rats. *Gastroenterology* **137**, 1083–1092 (2009).
205. Gorelick, F. S. & Thrower, E. The acinar cell and early pancreatitis responses. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **7**, S10-14 (2009).
206. Gukovskaya, A. S. *et al.* Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* **122**, 974–984 (2002).

207. Van Acker, G. J. D. *et al.* Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, G794-800 (2002).
208. Singh, V. P. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* **108**, 1387–1395 (2001).
209. Van Acker, G. J. D., Weiss, E., Steer, M. L. & Perides, G. Cause-effect relationships between zymogen activation and other early events in secretagogue-induced acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G1738-1746 (2007).
210. Jancsó, Z. & Sahin-Tóth, M. Mutation That Promotes Activation of Trypsinogen Increases Severity of Secretagogue-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* **158**, 1083–1094 (2020).

10 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Greifswald, 18.05.2021

Jana Marielle Modenbach

11 Lebenslauf

12 Veröffentlichungen & Abstracts

12.1 Publikationen

Lukas J., Pospech J., Oppermann C., Hund C., Iwanov K., Pantoom S., Petters J., Frech M., Seemann S., Thiel F.G., **Modenbach J.M.**, Bolsmann R., de Freitas Chama L., Kraatz F., El-Hage F., Gronbach M., Klein A., Müller R., Salloch S., Weiss F.U., Simon P., Wagh P., Klemenz A., Krüger E., Mayerle J., Delcea M., Kragl U., Beller M., Rolfs A., Lerch M.M., Sendler M: *Role of endoplasmic reticulum stress and protein misfolding in disorders of the liver and pancreas*, Adv Med Sci, 2019 Sep;64(2):315-323.

Tran, Quang Trung; Tran, Van Huy; Sendler, Matthias; Doller, Julia; Wiese, Mats; Bolsmann, Robert; Wilden, Anika; Glaubitz, Juliane; **Modenbach, Jana Marielle**; Thiel, Franziska Gisela; de Freitas Chama, Laura L.; Weiss, Frank Ulrich; Lerch, Markus M.; Aghdassi, Ali A.. *Role of Bile Acids and Bile Salts in Acute Pancreatitis: From the Experimental to Clinical Studies*. Pancreas, 2021 Jan; 50(1):3-11.

12.2 Kongressbeiträge und Abstracts

Modenbach J.M., Weiss F.U., Gronbach M., Oppermann C., El-Hage F., Pospech J., Lerch M.M., Sendler M. (2018). *An in vitro system to evaluate potential therapeutic substances for ER stress reduction during pancreatitis*. Poster auf der 50. Jahrestagung des European Pancreatic Club, 13.-16. Juni in Berlin (Deutschland) [Pancreatology, Volume 18, Issue 4, S24].

Modenbach J.M., Weiss F.U., Gronbach M., Oppermann C., El-Hage F., Pospech J., Lerch M.M., Sendler M. (2019). *An in vitro system to evaluate potential therapeutic substances for ER stress reduction during pancreatitis*. Poster auf der 39. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V., 07.-09. Februar in Göttingen (Deutschland).

Modenbach J.M., Weiss F.U., Lerch M.M., Sendler M. (2019). *Degradation of Cystatin C, an endogenous Cathepsin inhibitor, stabilizes Cathepsin B activity within pancreatic zymogen granules*. Poster auf der 51. Jahrestagung des European Pancreatic Club, 26.-29. Juni in Bergen (Norwegen) [Pancreatology, Volume 19, Supplement 1, S102].

Modenbach J.M., Weiss F.U., Lerch M.M., Sandler M. (2020). *Cystatin C regulates Cathepsin B activity within pancreatic zymogen granules and prevents pancreatic protease activation*. Poster auf der 40. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V., 13.-15. Februar in Halle/Saale (Deutschland).

Modenbach J.M., Weiss F.U., Lerch M.M., Sandler M. (2020). *Cystatin C regulates Cathepsin B activity within pancreatic zymogen granules and prevents pancreatic protease activation*. Vortrag auf der 52. Jahrestagung European Pancreatic Club, 02.-03. Juli in Paris (Virtual Meeting) [Pancreatology, Volume 20, Supplement 1, S12].

Modenbach J.M., Weiss F.U., Lerch M.M., Sandler M. (2020). *Cystatin C-inhibition of cathepsin B is a crucial protective mechanism of the pancreas against the effect of prematurely activated digestive proteases*. Poster auf der 51. Jahrestagung der American Pancreatic Association, 30. Oktober - 03. November in Miami (Virtual Meeting) [Pancreas, Volume 49, Issue 10, S1421].

13 Preise

- September 2018 2. Platz beim Science Slam Contest mit dem Thema „Zellstressbewältigungsstrategien“, Forschungscamp der Graduiertenakademie der Universität Rostock
- Februar 2020 Abstract-Preis, Deutscher Pankreas Club e.V.

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen herzlich danken, die mich über die letzten Jahre unterstützt und bei meiner Doktorarbeit begleitet haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Markus M. Lerch bedanken. Ich danke Ihm für die Gelegenheit der Erstellung meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe in der Klinik für Innere Medizin A an der Universitätsmedizin Greifswald.

Mein besonderer Dank für die kompetente, engagierte Unterstützung und die Übernahme meiner Betreuung gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Uwe Bornscheuer von der Universität Greifswald.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Matthias Sandler möchte ich für die großartige fachliche Betreuung, für die vielen konstruktiven Diskussionen und dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, bedanken. Ebenfalls ein Dank gilt unserem Laborleiter Herrn Dr. rer. nat. Frank Ulrich Weiss, der immer eine gute Idee zu inhaltlichen als auch technischen Frage hatte.

Für die große Unterstützung im Bereich der MS/MS-Analyse möchte ich Frau Dr. rer. nat. Elke Hammer vom Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung von der Universitätsmedizin Greifswald meinen Dank aussprechen.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung und für die meist amüsanten Mittagspausen sowie die angenehme und gutgelaunte Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei Frau Kathrin Gladrow, Diana Krüger, Frau Juliane Glaubitz und Frau Agnieszka Smolinska bedanken. Sie standen mir immer mit guter Laune, sowie Hilfsbereitschaft zur Seite. Des Weiteren hatten sie immer ein offenes Ohr für mich und haben mich immer wieder aufgebaut, wenn ich den Kopf mal hingen ließ.

Zum Schluss möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Familie sowie meinen Freunden Julia Janke, Sophie Janke und Sebastian Heim bedanken. Meine Familie hat mich die letzten Jahren stark unterstützt und mir überhaupt mein Studium ermöglicht. Ich möchte mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die große Unterstützung sowie die Aufmunterungen bedanken und dass sie nie müde waren meine Anrufe entgegenzunehmen. Ihr habt mich immer motiviert und liebevoll begleitet.

15 Förderhinweis

Die Promotion wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „*PEPPP-Proteinfehlfaltung, ER-Stress und Proteindegradation – Entwicklung einer systematischen Pipeline für individualisierte Therapien bei erblichen Leber- und Pankreaserkrankungen*“ angefertigt und durch Mittel des Europäischen Sozialfonds (ESF) finanziert (ESF/14-BM-A55-0045/16). Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil des Qualifikationsprogrammes „Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbänden – Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern“.



Europäische Fonds EFRE, ESF und ELER
in Mecklenburg-Vorpommern 2014-2020



EUROPÄISCHE UNION
Europäischer Sozialfonds