

Biochemie

Intrazelluläre Proteinaseaktivierung in der Pankreatitis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften in Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Manuel Ruthenbürger
aus Soest
2003

Dekan: Herr Prof. Dr. sc. pol. Jens Leker

Erster Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Karlheinz Klemnauer

Zweiter Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Markus M. Lerch

Tag der mündlichen Prüfungen: 13., 15. und 17. Oktober 2003

Tag der Promotion: 17. Oktober 2003

Manuel Ruthenbürger

Intrazelluläre Proteinaseaktivierung in der Pankreatitis

2003

Meinen Eltern gewidmet

Danksagung :

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Markus M. Lerch für die kompetente Einführung in das Themengebiet, der Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit, sein stets vorhandenes Interesse und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung mit vielen interessanten Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Karlheinz Klempnauer danke ich für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. Walter Halangk danke ich für die zur Verfügung gestellten Cathepsin B- und L-defizienten Mäusen.

Herrn Dr. rer. nat. Burkhard Krüger danke ich für die kompetente Einführung in die Messtechnik der Enzymaktivierung in Azinuszellen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, sowie für die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Funktion des exokrinen Pankreas..... | 1 |
| 1.2 Zelluläre Mechanismen der Entwicklung einer Pankreatitis | 3 |
| 1.3 Die Rolle der Trypsinogenaktivierung während der Pankreatitis..... | 5 |
| 1.4 Einfluß von lysosomalen Cathepsin B auf die vorzeitige Zymogenaktivierung | 7 |
| 1.5 Die Rolle der Apoptose in der Pankreatitis | 9 |
| 1.6 Die Gruppe der Serinproteinasen | 10 |
| 1.7 Die Gruppe der Cysteinproteinasen..... | 13 |
| | |
| 2. Aufgabenstellung für die vorliegende Arbeit | 15 |
| | |
| 3. Material | 16 |
| 3.1 Materialien und Geräte | 16 |
| 3.2 Chemikalien | 17 |
| 3.3 Enzyme, Substrate, Inhibitoren und Antikörper..... | 17 |
| 3.4 Puffer, Medien und Lösungen..... | 18 |
| | |
| 4. Methoden | 21 |
| 4.1 Zell- und Pankreatitismodelle..... | 21 |
| 4.1.1 Tierhaltung..... | 21 |
| 4.1.2 Isolierung von Ratten- oder Mauspankreasazini..... | 21 |
| 4.1.3 Induktion einer Caerulein-Pankreatitis bei der Ratte oder der Maus.. | 22 |
| 4.1.4 Gewinnung von Pankreashomogenaten | 24 |
| 4.1.5 Isolation einer Zymogengranulafraktion | 24 |
| 4.1.6 Gewebefixierung und Vorbereitung für morphometrische Untersuchungen | 25 |
| 4.2 Elektronenmikroskopie | 25 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.3 | Enzymatische Assays | 26 |
| 4.3.1 | Ermittlung der Amylasesekretion von Azini | 26 |
| 4.3.2 | Bestimmung der Substrat- oder Inhibitorspezifität an gereinigten Enzymen | 26 |
| 4.3.3 | Spezifische Zymogenimmunpräzipitation und Messung aktivierender Enzyme | 27 |
| 4.3.4 | Ermittlung von elastase- oder trypsindegradierenden Enzymen | 28 |
| 4.3.5 | Fluorometrische Quantifizierung der Proteinaseaktivität und Nekrose in lebenden Azinuszellen | 28 |
| 4.3.6 | Fluoreszenzmikroskopische Messung der Proteinaseaktivierung und Nekrose in lebenden Azinuszellen | 29 |
| 4.3.7 | Bestimmung apoptotischer Zellen im Gewebe | 30 |
| 4.4 | Proteinchemische Methoden | 30 |
| 4.4.1 | Proteinkonzentrationsbestimmung | 30 |
| 4.4.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 31 |
| 4.5 | Immunoblot | 32 |
| 4.6 | Statistische Analyse | 32 |
| 5. | Ergebnisse | 34 |
| 5.1 | Amylasesekretion in isolierten Pankreasazini | 34 |
| 5.2 | Zymogene werden in supramaximal stimulierten Azini zeitabhängig und zellindividuell aktiviert | 36 |
| 5.3 | Die Aktivierung von Trypsinogen schützt die Azinuszelle vor der Entwicklung einer Nekrose | 40 |
| 5.4 | Proelastase wird in der Pankreatitis nicht durch Trypsin aktiviert und führt neben anderen nicht charakterisierten Proteinase zu Zellnekrose | 44 |
| 5.5 | Proelastase ist durch Cathepsin B aktivierbar und wird durch Cathepsin L degradiert | 47 |
| 5.6 | Elastaseaktivität und Nekroserate von Azinuszellen sind in Cathepsin B- defizienten Mäusen signifikant reduziert | 52 |
| 5.7 | Die Aktivierung von Procaspase-3 erfolgt unabhängig von der Aktivierung des Trypsinogens oder der Proelastase | 55 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 5.8 | Procaspase-3 wird in Azinuszellen wesentlich durch Cathepsin B und L vermittelt aktiviert..... | 62 |
| 6. | Diskussion | 66 |
| 6.1 | Amylasesekretion in CCK-stimulierten Azinuszellen..... | 66 |
| 6.2 | Die Aktivierung von Trypsinogen und Proelastase findet in supramaximal stimulierten Azinuszellen unabhängig voneinander statt | 67 |
| 6.3 | Die Nekrose ist in Azinuszellen nicht mit der Aktivierung von Trypsinogen assoziiert..... | 68 |
| 6.4 | Die Proelastaseaktivierung wird in Azinuszellen wesentlich durch Cathepsin B vermittelt..... | 70 |
| 6.5 | Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3 werden in Azinuszellen unabhängig voneinander aktiviert | 73 |
| 6.6 | Cathepsin B und L vermitteln die Aktivierung von Procaspase-3 in Azini75 | |
| 7. | Zusammenfassung..... | 77 |
| 8. | Literaturverzeichnis..... | 79 |
| 9. | Eigene Publikationen | 96 |
| 10. | Abkürzungen..... | 99 |
| 11. | Lebenslauf..... | 101 |

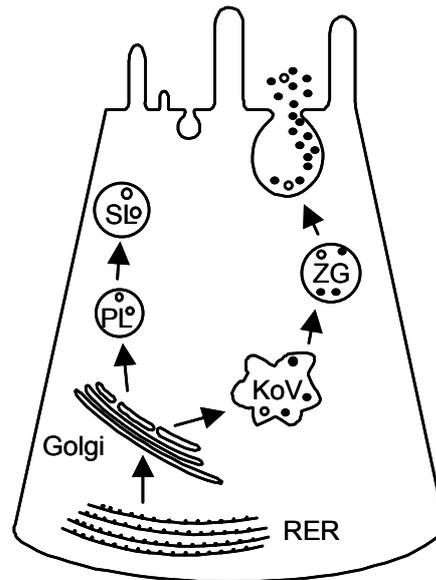
1. Einleitung

1.1 Funktion des exokrinen Pankreas

Die in der Nachbarschaft des Zwölffingerdarms lokalisierte Bauchspeicheldrüse, auch als Pankreas bezeichnet, ist eine seröse Drüse von etwa 70 bis 90g Gewicht. Sie besteht aus vielen Tausend schon makroskopisch sichtbaren Läppchen. Die morphologischen und funktionellen Grundeinheiten in diesen Lobuli bilden die als Azini bezeichneten Drüsenendstücke. Diese im Bindegewebe eingeschlossen Azini sind über Gänge miteinander verbunden und münden über den Pankreashauptgang in den Dünndarm. Die Azinuszellen synthetisieren mehr Protein als jede andere exokrine Zelle. Durch die Freisetzung verschiedenster Enzyme unterstützt das Pankreas die Verdauung der Nahrung im Darm wesentlich und ermöglicht den Abbau von Proteinen durch Enzyme, wie Trypsin und Elastase, von Kohlenhydraten durch Amylase und die Spaltung von Fetten durch Lipase.

Hierbei werden unter physiologischen Bedingungen durch Nahrungsaufnahme Acetylcholin und verschiedene Peptidhormone, wie das Cholecystinin (CCK) freigesetzt (Adler et al., 1995). Diese binden an Rezeptoren (Adler et al., 1991) auf der Zelloberfläche der Azinuszelle und setzen über Signaltransduktionswege die Proteinsekretion in Gang (Soudah et al., 1992; Owyang, 1993; Li und Owyang, 1994).

Die Synthese (Schema 1.1) der proteolytischen und lysosomalen Hydrolasen erfolgt in Ribosomen, die am rauhen endoplasmatischen Retikulum gebundenen sind. Zum Schutz der Zelle vor einer vorzeitigen Aktivierung, gefolgt von einer Autodigestion werden die Enzyme als inaktive Vorstufen, den Zymogenen, synthetisiert. Lysosomale Hydrolasen werden in der Regel zusätzlich mit einem Mannose-6-Phosphatrest versehen. In membranumschlossenen Kompartimenten werden die Zymogene zum Golgi-Komplex transportiert. Diese werden über einen Mannose-6-Phosphatrezeptor als lysosomale Proteine erkannt und schnüren sich in Vesikel verpackt vom Golgi ab. Über einen Reifungsprozeß vom primären zum sekundären Lysosomen werden die Zymogene aktiviert. Die sekretorischen Proteine werden ebenfalls in membranumschlossenen Vesikeln, den kondensierenden Vakuolen



| | | | |
|-------|------------------------------------|-----|------------------------|
| • | Sekretorische Zymogene | PL | Primäres Lysosom |
| ◦ | Lysosomale Enzyme | SL | Sekundäres Lysosom |
| RER | Rauhes endoplasmatisches Retikulum | KoV | Kondensierende Vakuole |
| | | ZG | Zymogengranulum |
| Golgi | Golgi-Komplex | | |

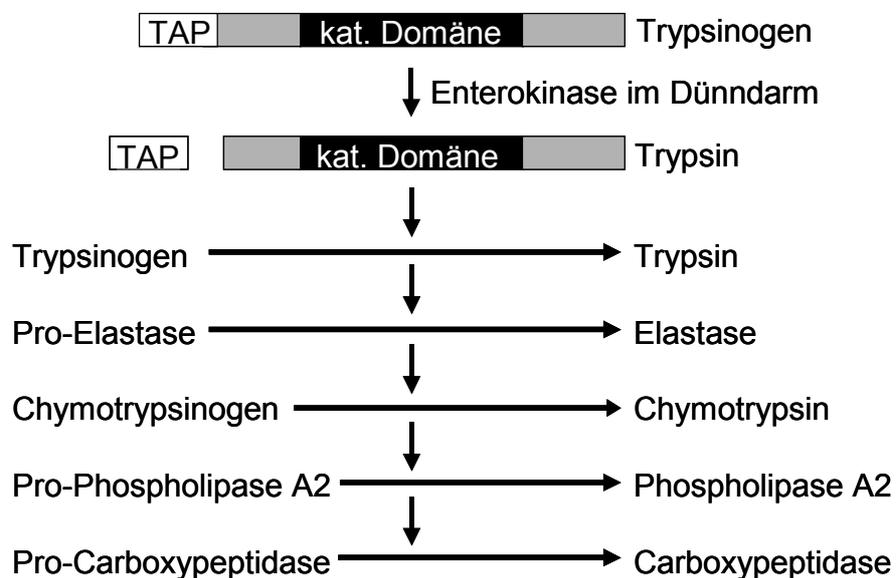
Schema 1.1: Enzymsynthese im Pankreas

Die Synthese der proteolytischen (schwarze Punkte) und lysosomalen Hydrolasen (weiße Punkte) erfolgt am rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER) als Zymogene. Lysosomale Hydrolasen werden zusätzlich mit einem Mannose-6-Phosphatrest versehen. Nach dem Transport zum Golgi-Komplex (Golgi) werden über den Mannose-6-Phosphatrezeptor lysosomale Proteine erkannt. Diese schnüren sich membranumhüllt ab und reifen über primäre (PL) zu sekundären (SL) Lysosomen. Sekretorische Proteine werden in kondensierenden Vakuolen (KoV) verpackt, reifen zu Zymogengranula (ZG) heran, und werden an der apikalen Zellmembran exozytiert.

verpackt, die zu den Zymogengranula reifen. Nach dem Transport und der Verschmelzung mit der apikalen Zellmembran werden die noch inaktiven Zymogene in das Lumen freigesetzt (Palade, 1975).

Unter physiologischen Bedingungen sind in den Zymogengranula neben den sekretorischen Proteinen auch kleinere Anteile von lysosomalen Proteinen nachweisbar. Die sekretierten Proteine werden über Gänge als Pankreassaft in den Dünndarm geleitet. Durch die von der Darmmukosa freigesetzte Enterokinase (Maroux et al., 1971) wird inaktives Trypsinogen durch Abspaltung des Trypsinogenaktivierungspeptids (TAP) aktiviert (Hurley et al., 1988). Nachfolgend

aktiviert Trypsin in einem Kaskadenprozeß die anderen Serinproteinasen, wie Chymotrypsinogen, Proelastase und Procarboxydase durch Abspaltung ihres jeweiligen Propeptides (Schema 1.2) (Rinderknecht, 1986). Andere Enzyme, wie Lipase und Amylase, werden in aktiver Form von den Azinuszellen sekretiert. Zum Schutz der Zelle vor einer vorzeitigen Aktivierung sind die Zymogene nicht nur durch Verpackung in den Zymogengranula von anderen zellulären Kompartimenten separiert, sondern können andererseits durch vorhandene Proteinaseinhibitoren inaktiviert werden (Witt et al., 2000; Pfützer et al., 2000; Threadgold et al., 2002). Weiterhin liegt der pH-Wert in Zymogengranula weit unterhalb des katalytischen Optimums für den überwiegenden Teil digestiver Proteinase (Orci et al., 1987).



Schema 1.2: Aktivierungskaskade der Pankreaszymogene

Die im Dünndarm freigesetzte Enterokinase spaltet das Trypsinogenaktivierungspeptid (TAP) vom Trypsinogen ab. Das freigesetzte Trypsin aktiviert nachfolgend kaskadenartig andere Zymogene durch Propeptidabspaltung.

1.2 Zelluläre Mechanismen der Entwicklung einer Pankreatitis

Die Pankreatitis tritt mit einer Inzidenz von 10 bis 46 pro 100000 Einwohnern auf und unterscheidet sich von anderen Entzündungskrankheiten dadurch, dass sie selten durch Infektionen oder Autoimmunprozesse ausgelöst wird (Mayerle und Lerch, 2000). Ein Großteil der Krankheitsverläufe führt nach kurzer Zeit zur vollständigen

Ausheilung. Bisher konnte kein kausales Konzept zur Behandlung dieser Erkrankung gefunden werden. 80% der Pankreatitiden beruhen auf einer akuten ödematösen Pankreatitis. Hierbei entwickelt sich aufgrund von Entzündungsreaktion ein interstitielles Ödem mit Auflösung der Organstruktur. Bereits 1896 stellte Chiari die Hypothese auf, dass das entscheidende Ereignis bei der Entstehung der Pankreatitis eine Selbstverdauung des Pankreas durch die eigenen Verdauungsenzyme ist und es zu einer Zellschädigung durch Nekrose kommt (Lerch et al., 1992; Kloppel et al., 1986; Foulis, 1980). Ein Großteil der heutigen Kenntnisse in Bezug auf die Entwicklung der Pankreatitis beruht nicht auf Studien beim Menschen, sondern auf Tiermodellen und isolierten Zellen. Biopsien sind aus medizinischen und ethischen Gründen schwer zu vertreten und andererseits sind die initialen Prozesse der Aktivierung bei den zur Behandlung kommenden Patienten bereits abgeschlossen und entziehen sich somit einer Untersuchung.

Studien an Ratten haben gezeigt, dass die intravenöse oder die intraperitoneale Gabe von supraphysiologischen Konzentrationen von Caerulein, einem synthetischen Cholecystokininanalogon, ein vergleichbares Krankheitsbild, wie bei der menschlichen ödematösen Pankreatitis auslöst (Adler et al., 1979; Lemmon und Schlessinger, 1995). Der große Vorteil dieses klinisch relevanten Krankheitsmodells liegt in der einfachen Handhabung, verbunden mit Reproduzierbarkeit und guter Charakterisierung. Die *In-vivo*-Stimulation kleiner Nagetiere mit physiologischen Konzentrationen von Caerulein führt zu einer 80% igen Entleerung der Enzymspeicher nach Bindung an dem hochaffinen CCK-A-Rezeptor. Im Modell der Caerulein induzierten Pankreatitis liegt eine Hyperstimulation des niedrigaffinen CCK-A-Rezeptors mit nachfolgender Blockade der Exozytose an der luminalen Azinuszellmembran vor (Saluja et al., 1989). Diese kann durch Gabe der 100-1000 Fachen einer physiologischen Konzentration entsprechenden Caeruleinmenge erreicht werden. Modelle auf der Basis von Zelllinien sind aufgrund des Verlustes der Enzymsekretion, der intrazellulären Proteinasenaktivierung und der Zellpolarität zur Beantwortung der initialen Ereignisse nur eingeschränkt einsetzbar. Jedoch können Primärzellen aus dem Pankreas des Tieres mittels Abbau des Bindegewebes durch Collagenase isoliert werden. Die dabei erhaltenen Azini, die aus drei bis einhundert zusammenhängenden Azinuszellen bestehen, zeigen nach supramaximaler Caerulein- oder Cholecystokininstimulation die gleichen zellulären Abläufe wie im Tiermodell. Die Azini eignen sich zur Untersuchung der intrazellulären Prozesse in

der initialen Phase einer Pankreatitis, sind aber aufgrund des hohen Differenzierungsgrades der Azinuszellen nur in kurzen Zeiträumen nutzbar.

In der Frühphase der experimentellen Pankreatitis konnte eine Aktivierung der sekretorischen Zymogene Trypsinogen und Proelastase nachgewiesen werden (Bialek et al., 1991; Luthen et al., 1995). Parallel konnten die nach Zymogenaktivierung abgespaltenen Propeptide des Trypsinogens (TAP) (Schmidt et al., 1992; Gudegeon et al., 1990; Mithofer et al., 1998) oder der Procarboxypeptidase (Appelros et al., 1998) im Pankreas, Serum und Urin gefunden werden. Im Urin und Serum von Pankreatitispatienten konnte ebenfalls TAP gefunden werden. Dessen Menge stellt eine prognostische Marke für den Schweregrad der Pankreatitis dar (Neoptolemos et al., 2000). Durch prophylaktische Gabe von Serinproteinaseinhibitoren konnte sowohl die experimentelle (Lasson und Ohlsson, 1984; Niederau und Grendell, 1998), als auch die durch endoskopische Untersuchungen beim Menschen verursachte Pankreatitis (Cavallini et al., 1996; Tympner und Rosch, 1982) signifikant reduziert werden. Die therapeutische Gabe solcher Inhibitoren an Patienten mit klinisch manifester Pankreatitis zeigte keine Erfolge, da die Proteinaseaktivierung am ehesten für die Krankheitsentwicklung in der initialen Phase relevant ist (Büchler et al., 1993). Klinische, sowie tierexperimentelle Studien zeigten, dass im zeitlichen Verlauf der Pankreatitis die Zymogenaktivierung innerhalb der ersten Stunde der Krankheitsphase beginnt und biphasisch mit einer zweiten Spitze nach mehreren Stunden beobachtet werden kann (Gukovskaya et al., 2002). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass mehrere Mechanismen an der Pankreaszymogenaktivierung beteiligt sind. Entzündungsprozesse könnten einen Einfluß auf die Zymogenaktivierung haben. Der Stand der Literatur legt nahe, dass die intrazelluläre Zymogenaktivierung maßgeblich in der Initiierung der Pankreatitis beteiligt ist.

1.3 Die Rolle der Trypsinogenaktivierung während der Pankreatitis

Seit einem halben Jahrhundert ist aus *In-vitro*-Studien bekannt, dass Trypsin nicht nur andere Zymogene, wie Chymotrypsinogen, durch Abspaltung dessen Propeptides aktivieren, sondern auch sich selbst autoaktivieren kann (Kunitz und

Northrop, 1935; Kassel und Kay, 1973). Man stellte daher neben anderen Theorien die Hypothese auf, dass der initiale Schritt der Pankreatitis auf einer Autoaktivierung von Trypsinogen beruht (Whitcomb, 1999). Das Trypsin könnte dann in einen kaskadenartigen Zymogenaktivierungsprozess, ähnlich wie im Dünndarm vorhanden, andere Zymogene aktivieren, die zur Autodigestion des Organs führen.

Subzelluläre Untersuchungen an Azini haben unter Verwendung von zellgängigen fluorogenen Trypsinsubstraten gezeigt, dass es nach supramaximaler CCK-Stimulation im sekretorischen Kompartiment nach wenigen Minuten zu einer Trypsinogenaktivierung kommt (Krüger et al., 1998). Durch Aktivitätsmessungen in über Dichtegradientenzentrifugation erhaltene subzellulären Fraktionen CCK-stimulierter Azini konnte außerdem die Trypsinaktivität nicht in Zymogengranula, sondern in Vesikel niedriger Dichte, die den zytoplasmatischen Vakuolen entsprechen, nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte in membranumschlossenen Vesikeln niedriger Dichte die Trypsinogenaktivierung nach wenigen Minuten der Pankreatitisinduktion ebenfalls nachgewiesen werden (Hofbauer et al., 1998). Diese Resultate stützten die Annahme, dass Trypsinogen in der Frühphase der Pankreatitis aktiviert wurde.

Wir konnten an Pankreasazini und Lobuli unter Verwendung eines reversiblen Trypsininhibitors zeigen, dass die Inhibierung der Trypsinaktivität unter supramaximaler CCK-Stimulation die Bildung des bei der Trypsinogenaktivierung freiwerdenden Aktivierungspeptides (TAP) in den Azinuszellen nicht beeinflusste (Halangk et al., 2002). Daraus konnte geschlossen werden, dass zur Trypsinogenaktivierung Trypsinaktivität nicht benötigt wird und offensichtlich keine Trypsinogenautoaktivierung stattfindet. Entfernte man den Inhibitor nach der CCK-Stimulation der Zellen durch Auswaschen, war eine vierfach höhere Trypsinaktivität als bei alleiniger Stimulation ohne Inhibitor nachweisbar. Somit konnte der 80 % ige Verlust des aktivierten Trypsins nur durch Inaktivierung durch sich selbst oder anderer Proteinase erklärt werden. Auf Stand dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die Trypsinogenautoaktivierungstheorie in isolierten Azinuszellen nicht zutrifft.

Ein Sonderfall stellt die hereditäre Pankreatitis dar, die mit Punktmutationen im Trypsinogen-Gen assoziiert ist (Whitcomb et al., 1996; Gorry et al., 1997; Teich et al., 1998; Simon et al., 2002). Man nahm daher an, dass die Pathogenese der Pankreatitis hierbei auf einer Funktionsverstärkung des Trypsins beruhen könnte. Da

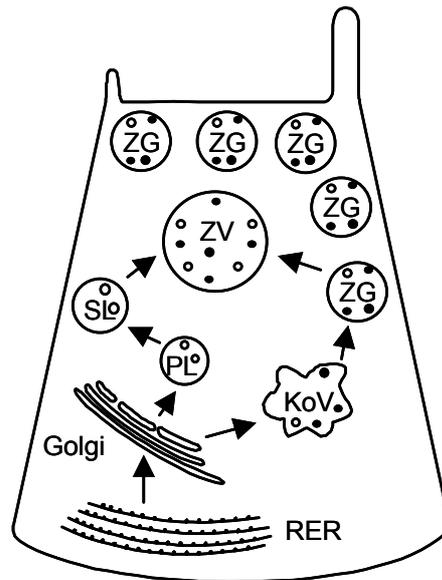
sich die Einflüsse dieser Mutationen auf Struktur und funktionelle Eigenschaften des Enzyms bisher hauptsächlich auf *In-vitro*-Ergebnisse beziehen, unterliegt die Theorie einer heftigen Diskussion (Varallyay et al., 1998; Teich et al., 2000; Sahin-Toth und Toth, 2000; Sahin-Toth, 2000; Le Marechal et al., 2001; Pfutzer et al., 2002).

1.4 Einfluß von lysosomalen Cathepsin B auf die vorzeitige Zymogenaktivierung

Untersuchungen an subzellulären Kompartimenten der Azinuszelle zeigten, dass in den Zymogengranula unter physiologischen (Tooze et al., 1991; Kukor et al., 2002) als auch unter pathologischen Bedingungen (Willemer et al., 1990; Lerch et al., 1993) neben sekretorischen Zymogenen auch Anteile lysosomaler Proteine vorhanden waren (Schema 1.3).

Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei dem Cathepsin B gewidmet, da dieses *In vitro* Trypsinogen aktivieren konnte (Figarella et al., 1998; Greenbaum und Hirshkowitz, 1961). Auf Basis dieser Beobachtungen stellte man neben der Trypsinogenautoaktivierungshypothese die Annahme auf, dass die Trypsinogenaktivierung in der Pankreatitis durch Cathepsin B erfolgen könnte. Theorieunterstützend konnte außerdem gezeigt werden, dass es in der experimentellen Pankreatitis, wie in subzellulären Fraktionierungsexperimenten, zu einer Umverteilung von lysosomalem Cathepsin B zu einer mit Zymogengranula angereicherte Fraktion stattfindet (Saluja et al., 1987).

Jedoch mußte die Hypothese kritisch betrachtet werden, da Cathepsin B, wie erwähnt, auch unter physiologischen Bedingungen mit Trypsinogen kolokalisiert ist. Einen Einfluß könnte der pH-Wert haben, der im sekretorischen Kompartiment während der Pankreatitis sinkt (Niederau und Grendell, 1988). Somit könnte das unter Normalbedingungen in den Zymogengranula durch den dort vorliegenden pH-Wert inaktive Cathepsin B durch den sinkenden pH-Wert in der Pankreatitis aktiviert werden. Eine Pufferung dieser pH-Wertverschiebung mit schwachen Basen führte in Azinuszellen zu einer Blockade der Proteinaseaktivierung (Krüger et al., 2000; Leach et al., 1991), hatte aber im Tiermodell wiederum keinen Einfluß auf die Krankheitsentwicklung (Lerch et al., 1993). Die Umverteilung von Cathepsin B in eine



| | | | |
|-------|------------------------------------|-----|--------------------------|
| • | Sekretorische Zymogene | PL | Primäres Lysosom |
| ◦ | Lysosomale Enzyme | SL | Sekundäres Lysosom |
| RER | Rauhes endoplasmatisches Retikulum | KoV | Kondensierende Vakuole |
| Golgi | Golgi-Komplex | ZG | Zymogengranulum |
| | | ZV | Zytoplasmatische Vakuole |

Schema 1.3: Pathologische Prozesse in der Azinuszelle

In der Initialphase der Pankreatitis wird die Enzymsekretion blockiert. Hierdurch kommt es zu einer Anreicherung von Zymogengranula (ZG) und zu einer Umverteilung von lysosomalen Hydrolasen (weiße Punkte) zu den sekretorischen Proteinen (schwarze Punkte) in den zytoplasmatischen Vakuolen (ZV). Außerdem findet eine Zymogenaktivierung in diesen Kompartimenten statt.

mit Zymogengranula angereicherte Fraktion konnte in diesem Tiermodell durch experimentelle Beeinflussung der lysosomalen Sortierung erreicht werden und war nicht mit der Entwicklung einer Pankreatitis assoziiert.

In verschiedenen *In-vitro*-Experimenten führte die Verwendung von Cathepsininhibitoren entweder zu einer Steigerung (Leach et al., 1991), oder aber zur Senkung der intrazellulären Trypsinogenaktivierung (Saluja et al., 1997). Auch die präventive Gabe von lysosomalen Enzyminhibitoren schützte nicht vor der Entwicklung einer experimentellen Pankreatitis (Steer und Saluja, 1993) Andere Ergebnisse deuteten auf keine Beeinflussung der Trypsinogenaktivierung durch Cathepsininhibitoren hin (Klonowski-Stumpe et al., 1998) oder sprachen Cathepsin B

eine protektive Funktion in der Zymogenaktivierung zu (Gorelik et al., 1992). Die limitierte Zahl an zellgängigen und meist zu enzymespezifischen Inhibitoren lysosomaler Hydrolasen konnte die Cathepsinhypothese somit nicht eindeutig beantworten.

Wir konnten in einer experimentellen Pankreatitisstudie an Cathepsin B-defizienten Mäusen zeigen, dass im Vergleich zu den Wildtypieren die Trypsinogenaktivierung in der Pankreatitis um 90% reduziert war (Halangk et al., 2000). Die Abnahme der Trypsinogenaktivierung senkte jedoch den Schweregrad der Pankreatitis nur zu 50%. Begleitete Entzündungsprozesse wurden hiervon jedoch nicht beeinflusst.

Diese Beobachtung stellte den ersten experimentellen Beweis einer zentralen Funktion von Cathepsin B für die intrazelluläre Trypsinogenaktivierung während der Entwicklung der akuten Pankreatitis dar. Es muß jedoch noch andere Mechanismen geben, die die initiale Krankheitsentwicklung und deren Verlauf beeinflussen.

1.5 Die Rolle der Apoptose in der Pankreatitis

Der Tod einer Zelle beruht auf einer Nekrose oder Apoptose. Untersuchungen auf Basis von verschiedenen Pankreatitismodellen konnten zeigen, dass die intrazelluläre Zymogenaktivierung ein initiales Ereignis in der Entwicklung einer Pankreatitis darstellt (Yamaguchi et al., 1989; Bialek et al., 1991). Diese führt zu weitreichenden Entzündungsprozessen, die unter anderem zur Nekrose von Azinuszellen führen kann (Lerch et al., 1992). Die Apoptose dagegen ist ein energieabhängiger, streng regulierter Prozeß bei dem Entzündungsprozesse normalerweise nicht beteiligt sind.

Neuere Studien an verschiedenen Pankreatitismodellen haben gezeigt, dass Apoptose und Nekrose sich parallel entwickeln können (Kaiser et al., 1995; Fujimoto et al., 1997; Sandoval et al., 1996). Ein zentrales Ereignis in der Apoptose stellt die Aktivierung von Cysteinproteinasen, den Caspasen (Cohen, 1997; Hennig und Salvesen, 1999) dar, die auch bei Patienten mit Pankreatitis erhöht nachweisbar waren (Ramadani et al., 2000; Rau et al., 2001).

Man konnte bisher zwei unterschiedliche Hauptaktivierungswege der Procaspasen identifizieren (Scaffidi et al., 1998; Budihardjo et al., 1999). Einer wird über die

Todesdomänenrezeptoren (Denecker et al., 2001) aktiviert, wobei es über signalvermittelte Komplexe zu einer Aktivierung von Effektorcaspasen kommt. Nachfolgend werden hierdurch andere Caspasen, wie Procaspase-3 (Nicholson et al., 1995; Stennicke et al., 1998; Porter und Jannicke, 1999) in einem Kaskadenprozeß aktiviert, die zum Abbau zellulärer Funktionen führen.

In einem zweiten Weg sind mitochondriale Veränderungen (Kroemer et al., 1998; Crompton, 1999) mit Cytochrom C-Freisetzung eingeschlossen, die ebenfalls zu einer Effektorcaspasenaktivierung führen.

Neuere Experimente zeigten, dass es in Azinuszellen neben einer todesrezeptorvermittelten (Kornmann et al., 2000; Shi-Bing et al., 2001), auch zu einer CCK-rezeptorvermittelten Aktivierung apoptotischer Prozesse kommt (Gukovskaya et al., 2002) und daher die Apoptose neben der Nekrose in der Entwicklung des Zelltodes während der Pankreatitis mit eingebunden ist.

1.6 Die Gruppe der Serinproteinasen

Man kennt bisher fünf Typen von Peptidasen, in denen Serin-, Threonin-, Cystein-, Aspartyl- oder Metallogruppen die primäre Rolle im katalytischen Zentrum spielen. Die Serin-, Threonin- und Cysteinpeptidasen weisen im katalytischen Bereich eine als Nukleophil dienende Aminosäure auf, die sich von den Aspartyl- und Metalloproteinasen mit einem aktivierten Wassermolekül oder anderen Gruppen wesentlich unterscheiden. Eine Konsequenz hiervon ist, dass Acyl-Enzym-Zwischenprodukte nur durch Reaktion mit Serin-, Threonin und Cysteinpeptidasen ausgebildet werden können und somit nur diese als Transferasen bezeichnet werden können. Peptidasen in denen die Hydroxylgruppe einer Serinseitenkette als Nukleophil Peptidbindungen angreift, wird als Serinpeptidase bezeichnet. Die wenigen threoninabhängigen Peptidasen werden ebenfalls in diese Gruppe gefaßt.

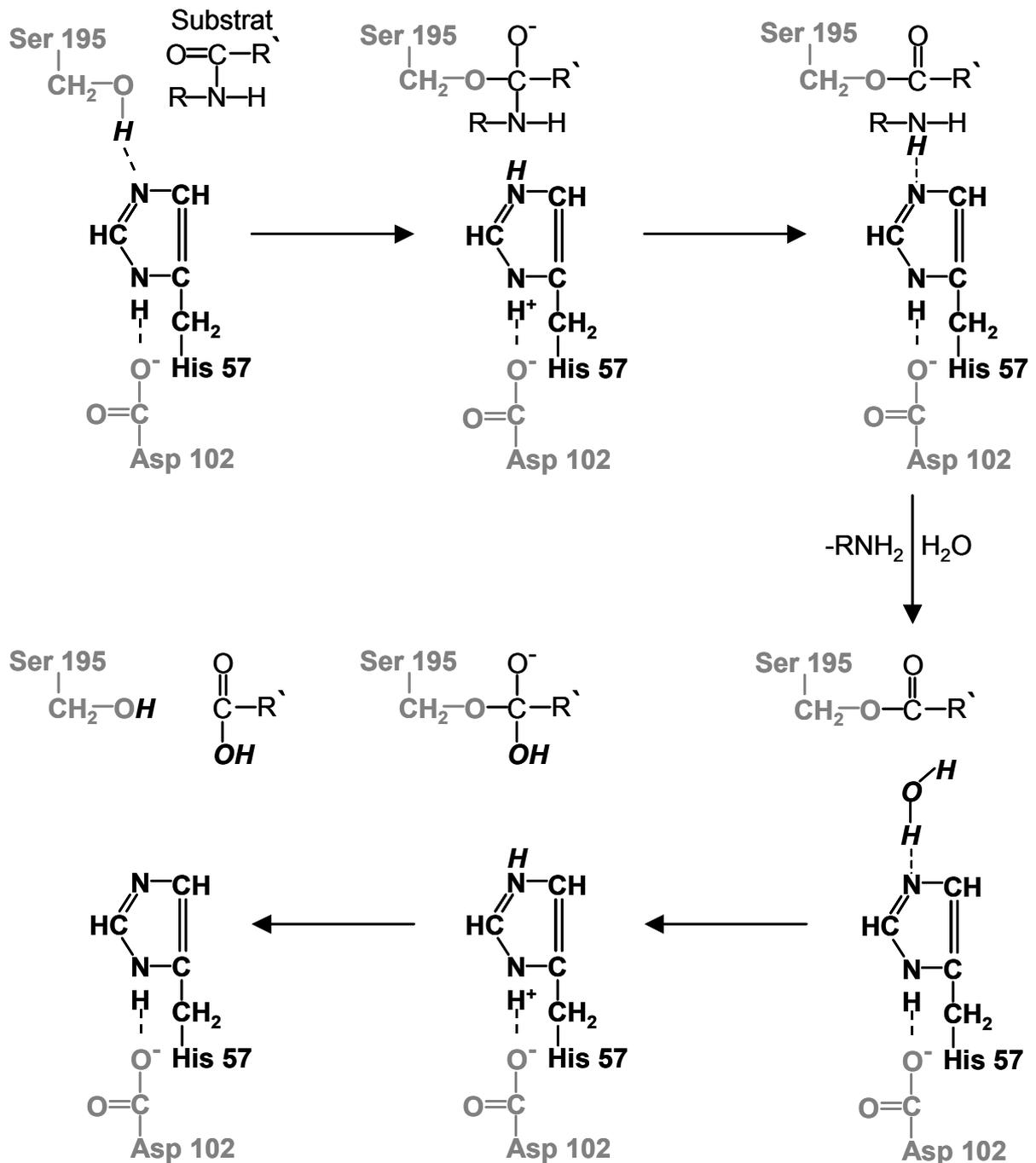
Man kennt bisher 40 Familien vom Typus der Serin- und Threoninpeptidasen, die auf Basis der Zusammensetzung und der Aminosäuresequenz unterschieden werden. Die hauptsächlich vom Pankreas sekretierten Proteinasen, wie Trypsin, Chymotrypsin und Elastase gehören der Familie S1 an. Im Pankreas konnten auch neuere Strukturvarianten mit transmembranärer Assoziation gefunden werden

(Wallrapp et al., 2000). Diese Peptidasen besitzen eine aus Histidin, Aspartat und Serin bestehende katalytische Triade. Ihre Tertiärstruktur besteht hauptsächlich aus Beta-Faltblattstrukturen mit einer Doppeldomänenstruktur aus Beta-Helices, zwischen denen sich das katalytische Zentrum befindet.

Ein Großteil der S1-Peptidasen wird mit einem N-terminalen Signal- und Propeptid synthetisiert. Dieses Peptid muß zur Generierung des aktiven Enzyms proteolytisch abgespalten werden und führt zu einer Konformationsänderung des Enzyms. Hierdurch kommt es zur Formation und Stabilisierung des aktiven Zentrums und der Bindungstasche. Die Länge dieser Extension variiert enorm zwischen zwei Aminosäuren beim Cathepsin G bis zu mehreren hundert Aminosäuren langen Ketten der Blutkoagulationsfaktoren (Patthy, 1990).

Das Trypsin kann als Prototyp der S1-Serinendopeptidasen angesehen werden (Kühne, 1876; Neurath und Zwillig, 1986). Von ihm konnte neben anderen Peptidasen die grundlegenden Eigenschaften dieser Enzymfamilie, sowie die Funktion bestimmter Strukturdomänen abgeleitet werden (Perona und Craik, 1995). Auf Basis von röntgenkristallographischen und chemischen Daten des Trypsins und des Chymotrypsins (Northrop und Kunitz, 1939) konnte der katalytische Mechanismus der Peptidspaltung hergeleitet werden (Steiz und Shulman, 1982; Kossiakoff und Spencer, 1981; Kraut, 1977). Hierbei findet im ersten Schritt eine Substratbindung über das Serin statt, bei dem über einen tetraedrischen Übergangszustand stabilisiert die Peptidbindung gespalten wird und sich ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt bildet (Schema 1.4). Die Aminkomponente diffundiert ab, und das Zwischenprodukt wird durch Wasser hydrolysiert. Es findet also eine Deacylierung und somit eine Freisetzung der sauren Komponente des Peptides statt. Dieser Mechanismus in dem das Serin 195, das Histidin 57 und das Aspartat 102 als katalytische Triade beteiligt sind, ist bei allen Serinpeptidasen gleich.

Die unterschiedliche Substratspezifität beruht auf strukturelle Unterschiede im Bindungszentrum. Diese Tasche besteht beim Chymotrypsin aus unpolaren Aminosäuren, die die Bindung von aromatischen und sperrigen Peptiden ermöglichen (Schellenberger et al., 1991). Im Trypsin befindet sich in dieser Tasche zusätzlich ein Aspartat 189, das die Bindung von Lysin- und Argininseitenketten ermöglicht (Graf et al., 1987). Elastase hingegen kann durch Austausch von Glycin gegen Valin und Threonin nur kleine Ketten binden (Bieth, 1978).



Schema 1.4: Mechanismus der Peptidspaltung durch Serinproteinasen

Im ersten Schritt der Peptidhydrolyse findet eine Acylierung des Serin-195 statt, bei dem über einen tetraedrisch koordinierten Übergangszustand die Peptidbindung gespalten und die Aminkomponente abdiffundiert. Histidin-57 und Aspartat-102 stabilisieren das Zwischenprodukt. Dieses wird nachfolgend durch Wasser deacyliert, wobei die saure Peptidkomponente freigesetzt wird. Auch hierbei wird der Protonentransfer und die Stabilisierung über Histidin-57 und Aspartat-102 vermittelt.

Andere strukturell wichtige Domänen stellen Calciumbindungsseitenketten dar, die für die Enzymstabilität wesentlich sind. Sie werden beim Trypsin aus einer Schleife von Glutamin 70 bis Glutamin 80 gebildet (Bode und Schwager, 1975) und führen bei Entfernung des Calciums zur schnellen Autodegradation (Colomb und Figarella, 1979; Colomb et al., 1979).

Die Entdeckung von Punktmutationen (Whitcomb et al., 1996; Whitcomb, 1999) im Trypsinmolekül, die mit der hereditären Pankreatitis assoziiert ist, zeigt das auch einzelne Aminosäureaustausche möglicherweise die Eigenschaften eines Enzyms wesentlich in Aktivierung (Witt et al., 1999), Aktivität und Stabilität beeinflussen können (Simon et al., 2002).

Viele Peptidasen treten aufgrund von mehreren unterschiedlichen Sequenzen im Genom in verschiedenen Varianten auf. Man kennt z. B. vom Trypsin kationische-, anionische- und Mesoformen, die speziesspezifisch in unterschiedlichen Anteilen gemeinsam auftreten (Higaki und Light, 1985).

1.7 Die Gruppe der Cysteinproteinasen

Peptidasen, bei denen das Nukleophil eine Sulfhydrylgruppe einer Cysteinseitenkette darstellt, bezeichnet man als Cystein-Typ-Peptidase. Der katalytische Mechanismus ähnelt dem der Serinpeptidasen, bei denen ein Nukleophil und ein Protonendonator interagieren. Die in den Cysteinpeptidasen vorhandene Histidinseitenkette dient hierbei als Protonendonator.

Auf die Eigenschaften dieser Peptidasengruppe zugeordneten Cathepsin B und L, die Mitglieder der Familie C1 sind, soll aufgrund ihrer Relevanz in der Pankreatitis näher eingegangen werden. Sie werden als Vorstufen mit einem N-terminalen Propeptid, sowie einem Signalpeptid synthetisiert. Das Propeptid des Cathepsin B und des Papains blockiert durch Bindung in umgekehrter Orientierung zum Substrat das aktive Zentrum (Cygler et al., 1996; Turk et al., 1996). Wie *In-vitro*-Studien für Cathepsin B gezeigt haben, kann es bei niedrigen pH-Werten, wie sie z. B. innerhalb eines Lysosoms vorliegen, zu einer Autoprozessierung kommen (Rowan et al., 1992; Mach et al., 1994). Der Abspaltung des Propeptides folgt manchmal eine weitere Prozessierung und Oligosaccharidmodifikation. Cathepsin B und L bestehen in der

Enzymvorstufe aus einer leichten und einer schweren Kette, die durch proteolytische Spaltung unter Verlust eines Di- oder Tripeptides entsteht. Bei Cathepsin B wird noch ein zusätzliches C-terminales Hexapeptid abgespalten (Rowan et al., 1993).

Die Familie C1 schließt sowohl Endopeptidasen, als auch Exopeptidasen ein, die im sekretorischen Kompartiment in Vakuolen oder Lysosomen transportiert werden. Die Unterscheidung zwischen Endo- und Exopeptidase ist verwirrend, da bei Cathepsin B die exopeptidatische, bei Cathepsin L die endopeptidatische Aktivität überwiegt (Kärgel et al., 1980,1981). Das C-terminal abspaltende Cathepsin B fungiert mechanistisch als Peptidyldipeptidase, die durch ein Paar von Histidinseitenketten in einer erweiterten Schleife am aktiven Zentrum die Bindung des C-terminalen Substratcarboxylates ermöglicht.

Die lysosomale Lokalisation von Cathepsin B und L deutet auf eine prinzipielle Funktion in der intrazellulären Proteindegradation hin, die bei Cathepsin L im Vordergrund steht. Jedoch konnten die Cathepsine auch in anderen Zellkompartimenten nachgewiesen werden. Knock-Out-Studien haben gezeigt, dass Cathepsin B eine Rolle in der Antigenpräsentation spielt (Deussing et al., 1998) und ist wie bisher erwähnt an die Trypsinogenaktivierung im Rahmen der Pankreatitis beteiligt ist (Halangk et al., 2000). Cathepsin L defiziente Mäuse haben eine gestörte Haarentwicklung und eine niedrigere Lebenserwartung (Roth et al., 1996; Reinheckel et al., 2001).

Eine wichtige in den apoptotischen Zelltod (Stennicke und Salvesen, 1998; Grutter, 2000) involvierte Cysteinproteinasengruppe stellen die Caspasen in Familie 14 dar. Die als signalvermittelnde Aktivatoren oder an der gezielten Proteindegradation beteiligten Caspasen sind Endopeptidasen, die eine hohe Spezifität zur Hydrolyse von Aspartylbindungen aufweisen. Von dieser Eigenschaft wurde auch ihr Name abgeleitet: Cystein-abhängige Aspartat spezifische Proteinase.

Die gut charakterisierte Caspase-3, die hauptsächlich die kernlokalisierte Poly(ADP-Ribose)-Polymerase degradiert, wird als inaktiver Einzelstrangvorläufer synthetisiert (Stennicke et al., 1998; Porter und Jannicke, 1999). Über einen kaskadenartigen Prozeß (Stennicke 2000) durch Effektorcaspasen, wie Caspase-8 (Muzio et al., 1998) wird diese in einem aktiven Heterodimer überführt (Martin et al., 1998). Bei den Effektorcaspasen nimmt man einen anderen Aktivierungsmechanismus durch Eigenprozessierung an (Yang et al., 1998).

2. Aufgabenstellung für die vorliegende Arbeit

Trypsin wird eine zentrale Rolle in den initialen Ereignissen bei der Entwicklung einer Pankreatitis zugeschrieben. Man ist hierbei von einem kaskadenartigen Aktivierungsprozeß wie er im Dünndarm vorliegt ausgegangen. Diese Annahme konnte bisher nur durch *In-vitro*-Versuche gestützt und nicht durch Untersuchungen in lebenden Zellen bestätigt werden.

Daher soll im Tiermodell supramaximal stimulierter Pankreasazini die Aktivierung der in der Kaskade oberstehenden Zymogene Trypsinogen und Proelastase untersucht werden. Messungen auf Einzelzellniveau, als auch in Zellsuspensionen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und Cytofluorometrie sollen unter Einsatz von spezifischen Inhibitoren zeigen, inwieweit die Hypothese einer Aktivierungskaskade in der Pankreatitis haltbar ist.

Außerdem wird die Zymogenaktivierung seit fast einem Jahrhundert im direktem Zusammenhang mit der Zellschädigung gebracht. Daher soll unter Anwendung des oben erwähnten Methodik gezeigt werden, ob die Trypsinogen- oder die Proelastaseaktivierung an der Entwicklung einer Azinuszellnekrose beteiligt ist.

Neuere Untersuchungen haben ein paralleles Auftreten der Zelluntergangs durch Apoptose und Nekrose in der Pankreatitis gezeigt. Aus diesem Grunde soll eine mögliche Verkopplung der durch CCK-Stimulation in Azinuszellen ausgelösten Mechanismen: 1) der Aktivierung der sekretorischen Zymogene, 2) des nekrotischen Zelluntergangs und 3) der in der Apoptose involvierten Procaspase-3-Aktivierung untersucht werden.

3. Material

3.1 Materialien und Geräte

| | |
|---|---|
| Drehinkubator | (Heidolph, Berlin) |
| Elektronenmikroskop | EM 10, (Philips, NL) |
| ELISA-Reader | MR 5000 (Dynatech, Denkendorf) |
| Fluoreszenzspektrometer | Spectra Max Gemini (Molecular Devices, USA) |
| Glasgeräte | (Schott, Mainz) |
| Heizblock | (Grant Instruments, GB) |
| Kühlschränke | -86°C Freezer (Forma Scientific, Bosch) |
| Kryomikrotom | Frigocut 2800N, (Jung, Heidelberg) |
| Konfokale Imagingeinheit | Openlab (Improvision, UK) |
| Küvettenphotometer | Bio Photometer (Eppendorf, Hamburg) |
| Magnetrührer | RFT (Ikamag, Staufen) |
| Mikroskop | Diaphot 200 (Nikon, Düsseldorf) |
| pH-Meter | pH Meter 761 Calimatic (Knick, Berlin) |
| Perfusor | Perfusor Secura (Braun, Melsungen) |
| Plastikartikel und chirurgisches Material | (Greiner, Cornig, Nalgene, Braun, Ethicon) |
| Pipetten | 10-1000 µl (Eppendorf, Hamburg) |
| Protein-Elektrophorese Kammern | Keutz Laborgeräte GbR, Kreuzkirchen |
| Stromversorgung | Power Pac 300 (Bio Rad, München) |
| Schüttelwasserbad | 1092 (GFL, Burgwedel) |
| Trans-Blot | SD Semi-Dry (Bio Rad, München) |
| Ultramikrotom | Ultratome (LKB, S) |
| Vortexer | VF2 (Janke & Kunkel) |
| Waagen | Analytic AC 210S, BL 600 (Sartorius, Göttingen) |
| Zentrifugen | 3E-1(Sigma, Düsseldorf), 5417C, 5417R(Eppendorf, Hamburg) |

3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham, Merck, Roth, Polysciences, Becton Dickinson oder Sigma mit dem Reinheitsgrad p.A. eingesetzt.

3.3 Enzyme, Substrate, Inhibitoren und Antikörper

| | |
|---|--|
| -AMC-Ala ₃ (Succinyl-Alanyl ₃ -Aminomethylcoumarin hydrochlorid) | Bachem (Heidelberg) |
| -AMC-Arg ₂ (Z-Arginyl ₂ -Aminomethylcoumarin hydrochlorid) | Bachem (Heidelberg) |
| -Caspase-3, Human, Rekombinant aus E. coli | Calbiochem (USA) |
| -Cathepsin B, aus der Rinderleber | Calbiochem (USA) |
| -Cathepsin L, aus der Rindermilz | Calbiochem (USA) |
| -CMAC-Ile-Pro-Arg (7-amino-4-chloromethylcoumarin-(CBZ-L-isoleucyl-L-Prolyl-L-arginin amid)) | Molecular Probes (USA) |
| -Collagenase, aus Cl. Histolyticum | Serva (Heidelberg) |
| -DEVD-CHO (Aspartat-Glutamin-Valin-Aspartat-Aldehyd) | Calbiochem (USA) |
| -E64d (L-trans-Epoxy succinyl—Leu-3-methylbutylamid-ethylester) | Bachem (Heidelberg) |
| -Elastase, aus dem Schweinepankreas | Calbiochem (USA) |
| -Monoklonaler-Elastase-Antikörper (IgG-Fraktion) | Schebotec (Berlin) |
| -Nafamostat (Nafamostat Mesilat, Futhan) | Tori Pharmaceuticals (Japan) |
| -Polyklonaler Elastaseantikörper (Serum) | Herr Prof. Dr. A. Borgström (Malmö, Schweden) |
| -Polyklonaler Caspase-3-Antikörper | Santa Cruz (USA) |
| -PhiPhiLux (PhiPhiLux G ₁ D ₂) | Oncolmmunin (USA) |
| -Pefabloc SC (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid hydrochlorid) | Calbiochem (USA) |

| | |
|---|---|
| -R110-Ile-Pro-Arg (Rhodamin 110, bis-(CBZ-L-isolecyl-L-prolyl-L-arginin amid dihydrochlorid) | Molecular Probes (USA) |
| -R110-Ala ₄ (Rhodamin 110, Bis-(CBZ-L-alanin ₄ amid)) | Molecular Probes (USA) |
| -S124 (Pefabloc TRY 1405) | Pentapharm (CH) |
| -Trypsin, aus dem Rinderpankreas | Calbiochem (USA) |
| -VPV-01 (Z-Val-Pro-Val-(OPh) ₂) | Herr Prof. Dr. med. Walter Halangk (Magdeburg) |

3.4 Puffer, Medien und Lösungen

Die angegebenen Puffer und Medien sind soweit nicht anders angegeben bei 4 °C mindestens einen Tag haltbar.

| | |
|---------------------|--|
| Cacodylatpuffer | 100 mM Natriumcacodylat pH 7.4 |
| Caspasepuffer | 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM Natriumchlorid, 1 mM Na-EDTA, 10 mM DTT, 0.1% (v/v) 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CHAPS) |
| Cathepsinpuffer | 100 mM Natriumacetat pH 4.0 (mit Essigsäure eingestellt), 5 mM Calciumchlorid, 10 mM Cystein |
| CathepsinMesspuffer | 100 mM Natriumacetat pH 5.5 (mit Essigsäure eingestellt), 5 mM Calciumchlorid, 10 mM DTT |
| DAPI-Puffer | 0.0001 % (w/v) DAPI in PBS |

| | |
|---------------------------|---|
| Einbettmedium | 10 % (w/v) Moviol, 25 % (w/v) Glycerin, 50 % (v/v) 200 mM Tris pH 8.5, auf 24 ml mit dest. Wasser auffüllen, 10 min unter Rühren auf 50 °C erwärmen, 2.5 % (w/v) 1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-octan zufügen, 15 min bei 5000 x g abzentrifugieren, Überstand abnehmen, bei -20 °C aufbewahren |
| EM-Puffer | 2% (v/v) Formaldehyd und 2 % (v/v) Glutardialdehyd in PBS |
| Fixationspuffer | 4% (v/v) Formaldehyd in PBS |
| HEPES-Puffer | 20 mM HEPES pH 7.4 |
| Homogenisationspuffer | 50 mM HEPES pH 6.5, 2 mM Magnesiumchlorid, 10 % (w/v) Succrose |
| Inkubationsmedium | 8 % (v/v) 100 mM HEPES, 73 % (v/v) DMEM, 19 % (v/v) 5 % (w/v) BSA Fraktion V, vor Gebrauch mit Sauerstoff sättigen |
| Laemmli-Probenpuffer (2x) | 125 mM Tris pH 6.8, 20 % (v/v) Glycerin, 0.2 % (w/v) Bromphenolblau, 4 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol |
| Lysepuffer | 1 % (w/v) Triton X-100, 150 mM Natriumchlorid, 50 mM HEPES pH 7.4, 10 mM Na-EDTA, 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 μ M Leupeptin, Haltbarkeit: 1 h |

| | |
|-------------------------------|---|
| Messmedium | 24.5 mM HEPES pH 7.5, 96 mM Natriumchlorid, 6 mM Kaliumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 2.5 mM Natriumdihydrogenphosphat, 500 μ M Calciumchlorid, 11.5 mM Glucose, 5 mM Na-Pyruvat, 5 mM Na-Glutamat, 5 mM Na-Fumarat, 1 % (v/v) DMEM, 1 % (w/v) BSA Fraktion V, 1 % (v/v) Ethanol, vor Gebrauch mit Sauerstoff sättigen |
| NET | 150 mM Natriumchlorid, 5 mM Na-EDTA, 50 mM Tris pH7.5, 0.5 % (v/v) Triton X-100 |
| Physiologische Kochsalzlösung | 0.9 % (w/v) Natriumchlorid |
| Ponceaulösung | 0.2 % (w/v) Ponceau S, 2 % (w/v) Trichloressigsäure |
| Transferpuffer | 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0.0375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol |
| Tris-Puffer | 100 mM Tris pH 8.0, 5 mM Calciumchlorid |
| Tris-Glycin-SDS | 248 mM Tris pH 8.0, 1.918 M Glycin, 1 % (w/v) SDS |
| PBS | 137 mM Natriumchlorid, 27 mM Kaliumchlorid, 81 mM Natriumhydrogenphosphat , 15 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7.4 |
| PBS-Natriumborhydrid | 1 % (w/v) Natriumborhydrid in PBS, Haltbarkeit: 1 h |
| Triton-Lysepuffer | 2 % (v/v) Triton X-100 |

4. Methoden

4.1 Zell- und Pankreatitismodelle

4.1.1 Tierhaltung

Männliche Wistar Ratten von 140-200 g Körpergewicht oder Mäuse von 25-40 g werden im universitätszugehörigen Tierstall in Käfigen zur Einstellung auf Laborbedingungen in einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus für mindestens sieben Tage unter freiem Zugang zur Standarddiät und Wasser gehalten. Vor der Induktion einer Pankreatitis oder der Entnahme eines Pankreas für die Azinuszellpräparation lässt man Ratten 12 h und Mäuse 6 h mit unbegrenztem Zugang zu Wasser fasten.

4.1.2 Isolierung von Ratten- oder Mauspankreasazini

Die gefasteten Tiere werden mit Aether narkotisiert, das Pankreas entnommen und durch Ausbluten getötet. Modifiziert nach Grosfils et al., 1993 wird das Pankreas sofort in einem 25 ml Erlenmeyerkolben mit 6 ml auf 37 °C vorgewärmten Inkubationsmedium überführt, welches vorher mit Sauerstoff begast und für Ratten mit 3 mg, bei Mäusen mit 1 mg Collagenase (Serva, Lot 14007) versetzt wurde. Das Pankreas wird mit einer Schere in Stücke von 2-3 mm Durchmesser zerschnitten und für 15 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad mit 100 rpm inkubiert. Anschließend wird das Medium dekantiert, durch neues Medium mit Collagenase ersetzt und für weitere 15 min unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Azini werden aus dem Pankreas durch fünfmaliges Pipettieren durch eine auf 2 mm, 1 mm und 0.5 mm aufgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze herausgelöst. Die Zellsuspension wird durch eine doppelte Lage Verbandsgaze filtriert, 20 sec bei 30 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml Medium ohne Collagenase resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation und Dekantation werden die in 15 ml

Medium suspendierten Zellen in Erlenmeyerkolben bei 37 °C im Wasserbad mit 50 rpm für 30 min äquilibriert und können anschließend für Stimulationsexperimente eingesetzt werden.

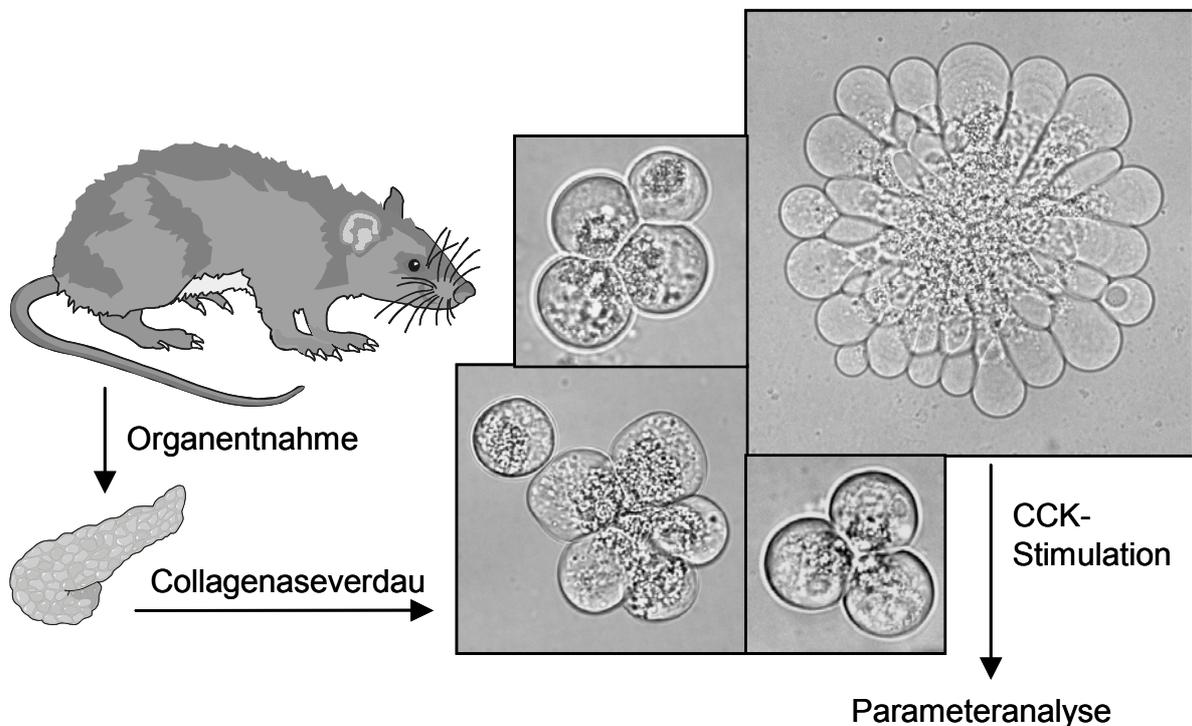


Abbildung 4.1: Isolation von Pankreasazinuszellen

Nach Entnahme des Pankreas aus der Ratte, wird das Bindegewebe des Organs mit Collagenase abgebaut, und man erhält Azini als lebende, funktionelle Untereinheiten aus mehreren Zellen, deren Größe durch die Präparationstechnik bestimmt wird. In diesen Untereinheiten kann nachfolgend der Einfluß von CCK und anderen Reagenzien auf die intrazellulären Prozesse analysiert werden.

4.1.3 Induktion einer Caerulein-Pankreatitis bei der Ratte oder der Maus

Hierzu werden Ratten durch intraperitoneale Gabe von 1,5 mg/kg/KG Pentobarbital narkotisiert und ein 2-3 cm langer Hautschnitt in der Medianlinie submandibulär gesetzt. Die Vena jugularis interna wird freipräpariert, längs angeschnitten und ein Jugularvenenkatheter vorgeschoben. Dieser wird mit 3 Nähten fixiert und anschließend die Wunde verschlossen. Der Katheter wird auf dem Rücken festgeklebt, so dass er von der Ratte nicht beschädigt werden kann.

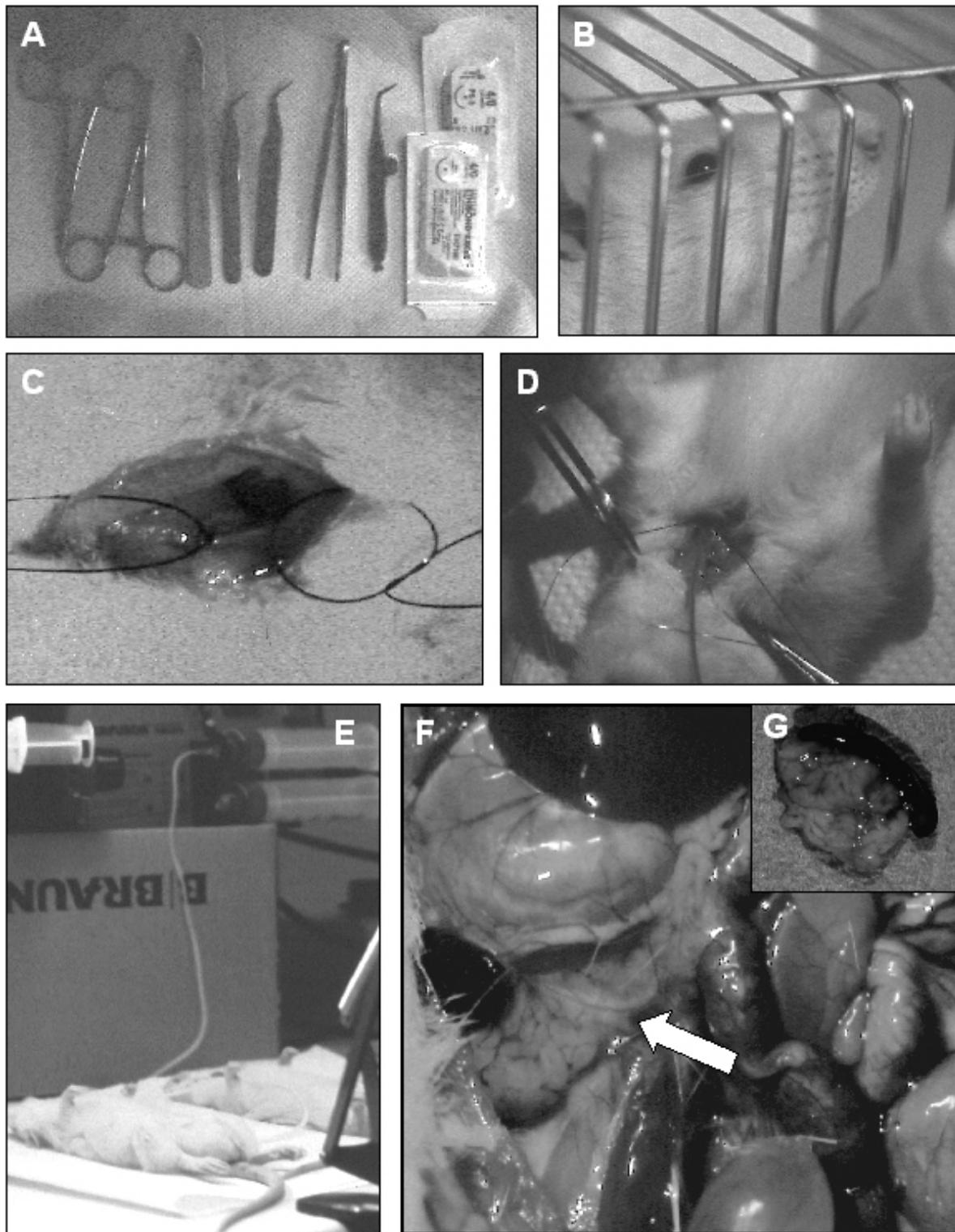


Abbildung 4.2: Induktion einer Caerulein induzierten Pankreatitis

A: Benötigte Geräte zur Operation der Ratten. **B:** männliche Wistar Ratte. **C:** Freipräparierte Vena jugularis externa. **D:** Fixierung des eingelegten Polyethylenkatheters mittels Nahtmaterial **E:** Infusion der Ratte mit Caerulein-Lösung unter Anwendung von Perfusoren **F:** Situs einer Ratte nach 2 stündiger Infusion von Caerulein in supramaximaler Konzentration. Der ödematöse Pankreas ist mit einem weißen Pfeil markiert. **G:** entnommener Pankreas, der noch an die Milz gebunden ist.

Die Tiere können sich im Käfig frei bewegen und haben freien Zugang zu Wasser. Zur Induktion der Pankreatitis wird den Tieren durch den Katheter über ein Zeitintervall von 1-24 h 10 µg/kg/KG/h Caerulein (Takkus, Roche) in Kochsalzlösung perfundiert (Lampel und Kern, 1977). Für Zeitintervalle bis zu zwei Tagen erhalten die Tiere eine stündliche intraperitoneale Gabe von Caerulein. Nach 1 h-14 d tötet man die Ratten durch Ausbluten oder Gabe einer Pentobarbitalüberdosis von 6 mg/kg/KG und entnimmt das zu untersuchende Gewebe.

In Mäusen wird die Pankreatitis durch intraperitoneale Injektion von 50 µg/kg/KG/h Caerulein über 1-8 h in 60 min Intervallen induziert. Die Tiere werden anschließend nach 1-24 h wie oben beschrieben getötet.

4.1.4 Gewinnung von Pankreashomogenaten

Das Pankreas wird entnommen und in eisgekühltem PBS mit der Schere in 1 mm große Stücke zerschnitten. Die Flüssigkeit wird dann vom kleingeschnittenen Pankreas dekantiert und nach Zugabe von PBS in einem 7 ml Homogenisator nach Potter der Weite S mit zehn Schüben homogenisiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation von Zelltrümmern und Zellkernen bei 100 x g und 0 °C wird der eisgekühlte Überstand mit einem Ultraschallstab bei 100 Watt und einem Tastverhältnis von 50 % zweimal 30 sec homogenisiert, auf einen Proteingehalt von 100 mg/ml eingestellt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.1.5 Isolation einer Zymogengranulafraktion

Das Pankreas wird entnommen und in eisgekühltem Homogenisationspuffer mit der Schere in 1 mm große Stücke zerschnitten. Das kleingeschnittene Pankreas wird dekantiert und nach Zugabe von 5 ml Homogenisationspuffer in einem 15 ml Homogenisator nach Dounce der Weite A mit zehn Schüben homogenisiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation von Zelltrümmern und Zellkernen bei 100 x g und 0 °C wird der Überstand abgenommen, nochmals 10 min bei 1300 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Cathepsinpuffer resuspendiert. Mit einem

Ultraschallstab wird die Fraktion bei 100 Watt und einem Tastverhältnis von 50 % zweimal 30 sec homogenisiert und 2 min bei 20000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, auf einen Proteingehalt von 50 mg/ml eingestellt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

4.1.6 Gewebefixierung und Vorbereitung für morphometrische Untersuchungen

Zur Elektronenmikroskopie wird das entnommene Gewebe von maximal 2 mm Größe sofort in einem zwanzigfachen Volumenüberschuß von EM-Puffer für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur Einbettung nach spätestens einem Tag im gleichen Puffer bei 4 °C aufbewahrt. Zur Detektion von apoptotischen Zellen wird das Gewebe in Tissue Tek (Sakura Finetek, USA) eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

4.2 Elektronenmikroskopie

Das fixierte Gewebe wird in Cacodylatpuffer 2 x 10 min inkubiert, 60 min in 2 % (w/v) Osmiumtetroxid postfixiert, nochmals 2 x 10 min in Cacodylatpuffer gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50, 70 und 100 % (v/v) jeweils 5 min zur Dehydrierung inkubiert. Anschließend wird das Gewebe in Epon 812 Gebrauchslösung eingebettet und 48 Stunden im Brutschrank bei 60 °C polymerisiert. Danach werden Gewebesemidünnschnitte für die Lichtmikroskopie mit Methylenblau gefärbt, Von ausgesuchten Arealen werden Ultradünnschnitte angefertigt und auf Kupfernetzchen aufgezogen. Nach Doppelkontrast mit Natriumuranylacetat und Bleicitrat erfolgt die elektronenmikroskopische Untersuchung.

4.3 Enzymatische Assays

4.3.1 Ermittlung der Amylasesekretion von Azini

Hierzu werden äquilibrierte Azinussuspensionen von 1 ml Volumen in mit Sauerstoff begasten Inkubationsmedium mit 1 pM – 1 μ M CCK in Zehnerpotenzintervallen, bzw. ohne Stimulanz für 30 min bei Raumtemperatur stimuliert. Die Zellen werden anschließend 30 sec bei 30 x g abzentrifugiert, auf Eis gestellt, der Überstand abgenommen, im Verhältnis 1:1 mit Lysepuffer versetzt und das Zellpellet unter 30 sec Vortexen in 1 ml Lysepuffer homogenisiert. Man zentrifugiert bei 0 °C 5 min bei 20000 x g ab, nimmt den Überstand ab und verwirft das Zellpellet. Je nach eingesetzter Zelldichte von 20-50 μ l/ml wird der Überstand 1:5-10, das Lysat 1:10-20 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, die Proben in 20 μ l Volumina auf eine 96-Well-Platte übertragen, 180 μ l/Well nach Herstellerangaben angesetztes Amyl-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben und die Amylaseaktivität photometrisch bei 405 nm in einer 2 min Kinetik bestimmt. Die Amylasesekretion wird als prozentuales Verhältnis des Überstandes zum Gesamtgehalt (Zellen plus Überstand) ausgedrückt.

4.3.2 Bestimmung der Substrat- oder Inhibitorspezifität an gereinigten Enzymen

Zur Bestimmung der Substratspezifität werden in einer 96 Well-Platte Trypsin oder Elastase in einer Endkonzentration von 10 mU/ml in 50 μ l/Well Tris-Puffer vorgelegt. Cathepsine stellt man auf die gleiche Konzentration in CathepsinMesspuffer ein. Caspase-3 wird in einer Endkonzentration von 1 kU/ml in Caspasepuffer vorgelegt. Das zu untersuchende Substrat wird im entsprechenden Puffer in einer Endkonzentration von 10 μ M (350 nM für PhiPhiLux) im 50 μ l Volumen zugegeben und im Fluorometer bei den für das Substrat entsprechenden Anregungs- und Emmisionswellenlängen (R 110-Substrate, PhiPhiLux : Ex 485 nm, Cutoff 515 nm, Em 530 nm; AMC-, CMAC-Substrate: Ex 340 nm, Cutoff 420 nm, Em 460 nm) eine

15 min Kinetik gemessen. Hintergrundfluoreszenzen werden von den entsprechenden Messwerten abgezogen.

Zur Messung der Inhibitorspezifität werden Enzym und Inhibitor im Well vorgelegt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach anschließender Substratzugabe fluorometrisch über 15 min quantifiziert, wobei die Aktivität des zu untersuchenden Enzyms ohne Inhibitor gleich 100 % gesetzt wird. Einflüsse der Lösungsmittel, in dem die Inhibitoren gelöst sind werden durch Zugabe gleicher Lösungsmittelmengen zum Enzym ohne Inhibitor kompensiert.

4.3.3 Spezifische Zymogenimmunpräzipitation und Messung aktivierender Enzyme

Eine Mischung aus gleichen Teilen von Protein A- und Protein-G-Sepharose wird mit HEPES-Puffer äquilibriert. Pro Ansatz werden 100 µl dieser 20 % igen Suspension mit 2µg eines gegen das zu untersuchende Zymogen gerichteten Antikörpers versetzt, zur Präadsorption in einem Rollinkubator für 60 min bei 4 °C inkubiert, 30 sec bei 100 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 2 ml Zymogengranulafraktion oder Gesamthomogenat mit einem Gesamtproteingehalt von 50 bzw. 100 mg/ml und 20 µM Nafamostat (Trypsininhibition) resuspendiert. Nach 60 min bei 4 °C in Rollinkubator zentrifugiert man ab und wäscht zweimal mit 1 ml HEPES-Puffer. Zur Aktivierung des präzipitierten Zymogens wird das Pellet in 1 ml des für die nachfolgende Aktivierung eingesetzten Puffers gewaschen, mit 100 µl des Enzyms von 1-1000 U/ml im entsprechenden Tris-Puffer für Trypsin, Cathepsinpuffer für Cathepsin B / L oder Caspasepuffer für Caspase-3 versetzt und im Schüttelwasserbad bei 200 rpm und 37 °C für 15-30 min inkubiert. Nach Abzentrifugation und dreimaligen Waschen mit 1 ml Tris-Puffer oder Caspasepuffer werden die Proben nachfolgend entweder proteinanalytisch untersucht oder die Sepharose mit 200 µl für das aktivierte Zymogen spezifisches R110-Substrat in einer Konzentration von 10 µM (350 nM für PhiPhiLux) im entsprechenden Puffer versetzt, die Suspension auf eine 96 Well-Platte übertragen und eine 2 h Kinetik mit Ex 485 nm, Cutoff 515 nm und Em 530 nm durchgeführt. Zur Auswertung wird die Eigenaktivierung ohne Enzym von den Messwerten subtrahiert und die

Zymogenaktivierung durch das entsprechende Enzym relativ zur Aktivierung mit einem Referenzaktivator prozentual ausgedrückt.

4.3.4 Ermittlung von elastase- oder trypsindegradierenden Enzymen

Trypsin oder Elastase in einer Endkonzentration von 100 mU/ml werden in 50 µl dest. Wasser vorgelegt, mit den zu untersuchenden Enzymen, wie Elastase, Trypsin, Cathepsin B oder L in gleicher Endkonzentration in 50 µL dest. Wasser vorgelegt und mit 400 µl für das entsprechende Enzym optimalen Puffer versetzt (Tris-Puffer für Trypsin, Elastase; Cathepsinpuffer für Cathepsine). Nach 0–8 h Inkubation bei 37 °C entnimmt man in 1–2 h Intervallen eine 10 µl-Probe, versetzt diese in einer 96 Well-Platte mit dem neunfachen Volumen Tris-Puffer, in dem 10 µM des Trypsinsubstrates R110-Ile-Pro-Arg oder des Elastasesubstrates R110-Ala₄ gelöst sind und mißt eine 15 min-Kinetik bei den Wellenlängen Ex 485 nm, Cutoff 515 nm und Em 530 nm. Die Enzymdegradation über die Zeitintervalle wird prozentual zur Aktivität nach 0 h dargestellt.

4.3.5 Fluorometrische Quantifizierung der Proteinaseaktivität und Nekrose in lebenden Azinuszellen

Zur Messung der intrazellulären Proteinaseaktivierung (Krüger et al., 1998) werden Azinuszellen in Inkubationsmedium mit 100 nM CCK supramaximal stimuliert, in 0-60 min Intervallen 1 ml Proben genommen und die Zellsuspensionen mit Sauerstoff begast. Die Proben werden 20 sec bei 30 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 1ml Messpuffer mit 10 µM Substrat (350 nM PhiPhiLux) und 5 µg/ml Propidiumiodid resuspendiert, nochmals abzentrifugiert, 3 x 200 µl des Überstandes als Hintergrundkontrolle in 96-Well Mikrotiterplatten transferriert, mit substrathaltigen Puffer auf 1 ml aufgefüllt, das Zellpellet resuspendiert, ebenfalls 3 x 200 µl/Well auf die Mikrotiterplatte übertragen und die Substratspaltung über 60 min fluorometrisch (PhiPhiLux 30 min) bei den

entsprechenden Wellenlängen (R 110-Substrate, PhiPhiLux: Ex 485 nm, Cutoff 515 nm, Em 530 nm; AMC-, CMAC-Substrate: Ex 340 nm, Cutoff 420 nm, Em 460 nm) gemessen. Nach Abschluss der Enzymkinetik werden die Zellen durch Zugabe von 50 µl/Well Triton-Lysepuffer und Suspension lysiert und man mißt nach 5 min Inkubation die Propidiumiodid Fluoreszenz (Ex 350 nm, Cutoff 590 nm, Em 630 nm), die die Gesamtzellkernmenge repräsentiert. Die Enzymaktivität wird auf gleiche Zellkernmengen / Well äquilibriert und entweder prozentual in Relation zu einer Kontrolle oder zur maximalen Aktivierung dargestellt.

Zur simultanen Messung der Zellnekrose wird die Propidiumiodid Inklusion der Zellen nach Transfer auf die 96-Well Platte und 5 min Inkubation als Endpunktfloreszenz gemessen. Die Nekroserate wird in Prozent relativ zur Gesamtzellkernzahl minus der Fluoreszenz nach 0 min ausgedrückt.

4.3.6 Fluoreszenzmikroskopische Messung der Proteinaseaktivierung und Nekrose in lebenden Azinuszellen

Zur Visualisierung und Messung der Zymogenaktivierung auf Einzelzellniveau in einem Azinus werden diese 20 min in Inkubationsmedium mit 10 µM des des Elastasesubstrates R110-Ala₄ und Trypsinsubstrates CMAC-Ile-Pro-Arg und 5 µg/ml Propidiumiodid beladen. In einer Perfusionskammer werden diese mit Cell Tak (Becton Dickinson, Bedford, MA) auf einer Glasoberfläche fixierten Azini in substrathaltigen Medium mit 100nM CCK stimuliert und die intrazelluläre Substratspaltungskinetik bei 40 x Vergrößerung an einem hochauflösenden digitalen Fluoreszenzmikroskop beobachtet (CMAC, AMC-Substrate: Ex 330 nm, Em 450 nm; R110-Substrate, PhiPhiLux: Ex 485 nm, Em 535 nm).

Das Eintreten der Nekrose in einer Zelle kann gleichzeitig durch Aufnahme des Propidiumiodids (Ex 560 nm, Em 630 nm) und Fluoreszenz des Zellkerns visualisiert werden.

Zur Sichtbarmachung der Procaspase-3-Aktivierung werden Azini über 60 min mit 100 nM CCK stimuliert, das Medium gegen eines mit 330nM des Caspase-3-Substrates PhiPhiLux in Kombination mit 10 µM des Elastasesubstrates AMC-Ala₃

oder Trypsinsubstrates CMAC-Ile-Pro-Arg für 20 min beladen und am Fluoreszenzmikroskop digital fotografiert.

4.3.7 Bestimmung apoptotischer Zellen im Gewebe

5 µM Kryosektionen des Gewebes werden auf Polylysin beschichteten Objektträgern 60 min bei Raumtemperatur getrocknet, in eisgekühltem Aceton für 30 sec postfixiert und anschließend in eisgekühltem Fixationspuffer für 90 min nachfixiert. Die Schnitte werden nachfolgend mit PBS 3 x 5 min gewaschen, 30 min in PBS-Natriumborhydrid inkubiert und nochmals in PBS 3 x 5 min gewaschen. Die Markierung freier 3'-OH-DNA-Enden erfolgt mit der Terminalen Deoxynukleotid Transferase (TdT) Methode unter Verwendung von Fluorescein konjugierten Digoxigenin Nukleotiden. Hierzu wird das ApopTag Kit (Serologicals Corporation, Norcross, USA) nach angegebener Vorschrift eingesetzt. Zur Markierung aller Zellkerne werden die Schnitte nach Markierung der apoptotischen Kerne für 30 sec in DAPI-Puffer inkubiert, 4 x 5 min in PBS gewaschen, mit Moviol unter Deckgläschen eingebettet und im Dunkeln ü. N. getrocknet. Zur Auswertung werden randomisierte Fluoreszenzbilder mit 40 x Vergrößerung erstellt und die Apoptoserate als prozentuales Verhältnis von Fluorescein markierten Kernen zu DAPI-positiven Kernen ausgedrückt.

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinbestimmung wird der Bradford-Assay von Biorad (München) nach Angabe des Herstellers eingesetzt (Bradford, 1976). Durch Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an die vorhandenen Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm stellt ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung dar. Die

Proben werden auf einem kalibrierten BSA-Standard von 50 - 1000 µg/ml Protein bezogen.

4.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt nach dem Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Das Detergenz SDS komplexiert Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur. Die Größe der negativen Ladung des Komplexes ist dabei direkt proportional zum Molekulargewicht des Proteins. Die Trenngele enthalten je nach gewünschter Auflösung 7-15 % (w/v) Acrylamid, 0.2-0.4 % (w/v) Bisacrylamid 370 mM Tris pH 8.8 und 0.1 % (w/v) SDS. Das Sammelgel besteht aus 3 % (w/v) Acrylamid, 0.15 % (w/v) Bisacrylamid, 125 mM Tris pH 6.8 und 0.1 % (w/v) SDS. Die Polymerisation der Gele wird durch Zugabe von 0.5 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat und 0.05 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin gestartet. Die Proteinproben werden vor dem Gellauf mit dem gleichen Volumen Laemmli-Probenpuffer (2 x) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Als Molekulargewichtsstandard wird ein 7-200 kDa Marker von Biorad (München) eingesetzt.

Die Elektrophorese erfolgt in einem Tris-Glycin-SDS-Puffer bei 25 mA im Sammelgel und 50 mA im Trenngel. Zur Immundetektion von Proteinen werden diese nach der Elektrophorese aus den SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Der Transfer vom äquilibrierten Gel auf die Membran erfolgt jeweils zwischen drei Lagen aus mit Transferpuffer getränktem Whatmanpapier in einer Semidry-Blotkammer mit 1 mA/cm² Gelfläche für 2 h. Nach erfolgtem Transfer färbt man die Proteine mit Ponceaulösung, markiert die Banden des Molekulargewichtsstandards und entfärbt die Membran durch Waschen mit NET.

4.5 Immunoblot

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrocellulose zu verhindern, werden diese vor der Inkubation mit Protein abgesättigt. Die Membran inkubiert man hierfür bei 4 °C ü. N. mit NET-0.2 % (w/v) Gelatine. Zur Detektion der Proteine wird der Blot 1 h mit dem entsprechenden Antikörper in Verdünnungen von 1:100-500 in NET-0.2 % (w/v) Gelatine inkubiert, 2 x 10 min mit NET gewaschen, anschließend der Blot in NET-0.2 % (w/v) Gelatine mit einem Peroxidase-gekoppelten speziesspezifischen Antikörper (Amersham) in einer Verdünnung von 1 : 10000 für 1 h inkubiert, 2 x 10 min in NET-0.1 % (v/v) Tween-20 und jeweils einmal 5 min in PBS-0.1 % (v/v) Tween-20 und PBS gewaschen.

Der Nachweis der markierten Proteine erfolgt mit dem ECL-Kit (Amersham) nach Vorschrift des Herstellers, bei dem die auf dem Blot gebundene Peroxidase Wasserstoffperoxid spaltet und der freiwerdende Sauerstoff die Oxidation von Luminol unter Chemilumineszenz katalysiert. Zur Detektion wird der Blot auf polyäthylenbeschichtetes Papier gelegt, mit Cellophan luftblasenfrei abgedeckt und ein Röntgenfilm für 5 sek - 1 h, in Abhängigkeit von der Stärke der Chemilumineszenz exponiert und anschließend entwickelt.

4.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse repräsentieren, falls nicht anders angegeben, die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, deren Fehlerbalken, die mittlere Standardabweichung darstellt.

Alle Experimente an einzelnen Azini wurden mindestens 130 mal wiederholt, entsprechend einer Mindestzellzahl von 400. Die Auswertungen sind als Mittelwert dargestellt, deren Schwankung das 95 % ige Konfidenzintervall wiedergibt. Zellen mit einer Substratfluoreszenz <5 % im Vergleich zur maximalen Fluoreszenz wurden als Zellen ohne entsprechende Aktivierung definiert.

Zur Bestimmung der Nekrose wurden von randomisierte Sektionen mit mindestens zehn Zellen bei 1500 x Vergrößerung durch Elektronenmikroskopie aufgenommen und pro Experiment minimal 500 Zellen ausgewertet.

Die Auswertung der Apoptoserate erfolgte an mindestens drei unabhängigen Experimenten, von denen jeweils zehn Felder mit einer mittleren Zellzahl von 125 ausgezählt wurden.

Signifikante Unterschiede mit $p < 0.05$ sind mit einem Stern gekennzeichnet.

5. Ergebnisse

5.1 Amylasesekretion in isolierten Pankreasazini

Azinuszellen stellen die funktionelle Einheit des Pankreas dar. Stimuliert man diese Zellen mit Cholecystokinin (CCK), so führt diese über Bindung an dem CCK-Rezeptor zu einer Calcium gekoppelten Signaltransduktion. In Folge dessen werden Verdauungsenzyme am apikalen Pol der Zelle freigesetzt. (Adler et al., 1991; Soudah et al., 1992).

Um die physiologische Intaktheit des verwendeten Systems der isolierten Pankreasazini zu garantieren, wurde die Amylasesekretionsleistung der Azini in Abhängigkeit von der CCK-Konzentration nach Isolierung durch Collagenaseverdau untersucht.

Williams et al. konnte 1978 zeigen, dass in vitalen Azinuszellen eine Stimulation mit ansteigenden CCK-Konzentrationen zu einer gerichteten Freisetzung von Amylase in Form einer hyperbolischen Kurve führt. Stimulationen mit physiologischen CCK-Konzentrationen (0.1 nM) führen zu einer maximalen Sekretion der Zellen, wogegen supramaximale CCK-Konzentrationen (1 μ M) eine Sekretionsblockade von Verdauungsenzymen zur Folge haben.

Stimulierte man isolierte Azini 30 Minuten mit aufsteigenden CCK-Konzentrationen, so erhielt man die in Abb. 5.1 dargestellte Amylasesekretionskurve, Die Basalsekretion ohne Stimulus lag bei 7.5 % und beruhte aufgrund eines nicht vermeidbaren spontanen Zelluntergangs, sowie eines gestörten Zellmetabolismus im Verlauf des Stimulationsexperimentes. Die Stimulation mit physiologischen CCK-Konzentrationen ergab eine maximale Sekretionsleistung von 28 % des Gesamtgehaltes an Amylase. Supramaximale CCK-Konzentrationen führten durch eine Blockade der Amylasesekretion zu einem Abfall auf 10 %.

Vor der Durchführung von Stimulationsexperimenten wurden die Präparationsansätze auf Verunreinigungen von Zelltrümmern und Intaktheit der Zellen durch Trypan-Blau-Exklusion überprüft. Hierbei wurden nur Präparationen mit mehr als 95 % intakter Zellen eingesetzt.

Da die zur Isolation verwendeten Collagenasen unterschiedliche Anteile von CCK-rezeptorabbauenden Enzymverunreinigungen enthielten, konnte über die

Amylasesekretion neben der Zellvitalität auch der Reinheitsgrad der eingesetzten Collagenase bestimmt werden. Unter Anwendung dieser Technik konnte eine Collagenase gefunden werden, die vernachlässigbare Anteile an CCK-Rezeptor abbauenden Enzymen enthielt und deren collagenolytische Aktivität Azini mit einer gewünschten mittleren Größe von ca. 20 Zellen lieferte.

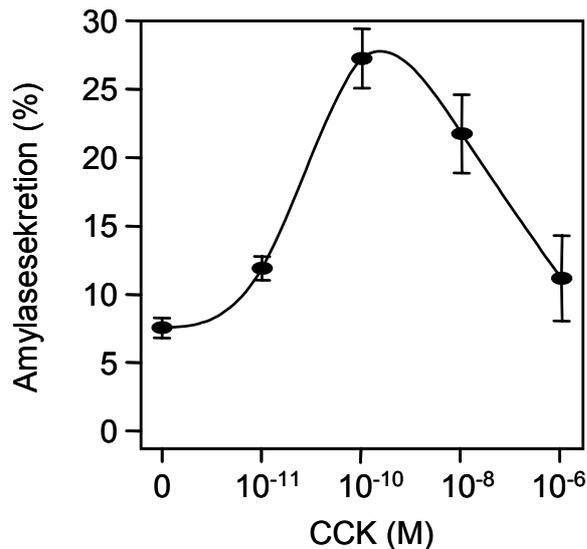


Abb. 5.1: Amylasesekretionsverlauf von Azinuszellen in Abhängigkeit von der CCK-Konzentration

Azinussuspensionen werden mit 1 pM – 1 μM CCK für 30 Minuten stimuliert, bzw. ohne Stimulanz inkubiert. Die von den Zellen in den Überstand sekretierte Amylase und die intrazellulär vorhandene Amylaseaktivität werden photometrisch durch Spaltung eines Amylasesubstrates bestimmt. Die Amylasesekretion wird als prozentuales Verhältnis der Amylasemenge im Überstand gegenüber dem Gesamtgehalt in den Zellen plus Überstand ausgedrückt.

5.2 Zymogene werden in supramaximal stimulierten Azini zeitabhängig und zellindividuell aktiviert

Bei den in der Entwicklung einer Pankreatitis initial ablaufenden Zymogenaktivierungsmechanismen wird dem Trypsin eine zentrale Rolle zugeordnet (Kunitz und Northrop, 1935; Kassel und Kay, 1973). Aktiviertes Trypsinogen könnte hierbei in einem kaskadenartigen Zymogenaktivierungsprozess, ähnlich wie im Dünndarm vorhanden, andere Zymogene aktivieren (Rinderknecht, 1986).

Jedoch steht bisher die Frage offen, ob das in der Aktivierungskaskade obenstehende Trypsin andere unter ihm stehende Zymogene, wie z. B. die Proelastase auch in der Pankreatitis aktiviert. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde eine mögliche Verkopplung der Aktivierung von Trypsinogen mit Proelastase in Azinuszellen untersucht.

Für die Messung von Enzymaktivitäten in lebenden Azini wurden peptidgekoppelte Rhodamin- oder Coumarinderivate eingesetzt. Diese waren aufgrund ihrer Hydrophobizität zellpermeabel und gegenüber chromogenen Substraten um zwei bis vier Zehnerpotenzen sensitiver. Da es in der Pankreatitis zu einer Aktivierung verschiedenster Zymogene kommt, wurden die eingesetzten Substrate hinsichtlich ihrer Spezifität in einem *In-vitro*-System in Gegenwart von aufgereinigten Enzymen charakterisiert. Fluorogene, die mit dem Tripeptid Isoleucin-Prolin-Arginin (R110-Ile-Pro-Arg) konjugiert waren, wurden nur von Trypsin, jedoch nicht von Elastase gespalten (Abb. 5.2 A). Substrate, die mit einem Alanintetrapeptid gekoppelt waren (R110-Ala₄), wurden nur von Elastase und nicht von Trypsin gespalten (Abb. 5.2 B). Andere Serinproteinasen wie das Chymotrypsin, oder die Cysteinproteinasen Cathepsin B und L, spalteten die obengenannten Substrate unter den eingesetzten Messbedingungen nicht (Daten nicht gezeigt).

Die Substrate sind daher zur spezifischen fluorometrischen Quantifizierung von Trypsin oder Elastase neben anderen Proteinasen in lebenden Zellen geeignet.

Stimulierte man Rattenpankreasazini mit supramaximalen CCK-Konzentrationen von 100 nM, konnte eine zeitabhängige Aktivierung von Trypsinogen oder Proelastase unter Verwendung des entsprechenden Substrates gemessen werden (Abb. 5.2 C,D). Diese Trypsin- oder Elastaseaktivität erreichte nach 20-30 Minuten CCK-Stimulation ihr Maximum und fiel danach kontinuierlich ab. Nach 60 Minuten Stimulation waren noch 60 % der Elastase-, bzw. 50 % der Trypsinaktivität

nachweisbar. Unstimulierte Kontrollzellen zeigten in Folge der Präparation bedingt eine Basalaktivität von 10 bis 20 %, die jedoch nicht signifikant über den Inkubationszeitraum anstieg.

Mit Hilfe dieser Methode war die Zymogenaktivierung in lebenden Azinuszellsuspensionen quantifizierbar, liess jedoch keine Aussage in Bezug auf die Aktivierung in einzelnen Zellen zu.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Azini mit dem Elastasesubstrat R110-Ala4 und dem Trypsinsubstrat CMAC-Ile-Pro-Arg beladen und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit CCK supramaximal stimuliert. Aufgrund unterschiedlicher Anregungs- und Emissionwellenlängen der Fluorogene konnte die enzymspezifische Spaltung simultan untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass nach 5–15 min supramaximaler CCK-Stimulation eine Aktivierung von Trypsinogen und Proelastase nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.3 A,B). Diese Aktivierung war in den einzelnen Zellen eines Azinus individuell unterschiedlich (Abb. 5.3 C). Bei der Auswertung von über 400 Zellen zeigten 16 % weder eine Trypsinogen- noch eine Proelastaseaktivierung und 17 % entwickelten nur eine Trypsinogenaktivierung. Die meisten Zellen entwickelten mit 41 % eine alleinige Proelastaseaktivierung oder eine simultane Aktivierung beider Zymogene (26 %).

Diese Beobachtungen zeigen, dass nach supramaximaler CCK-Stimulation die Zymogene Trypsinogen und Proelastase in der Azinuszelle möglicherweise unabhängig voneinander aktiviert werden.

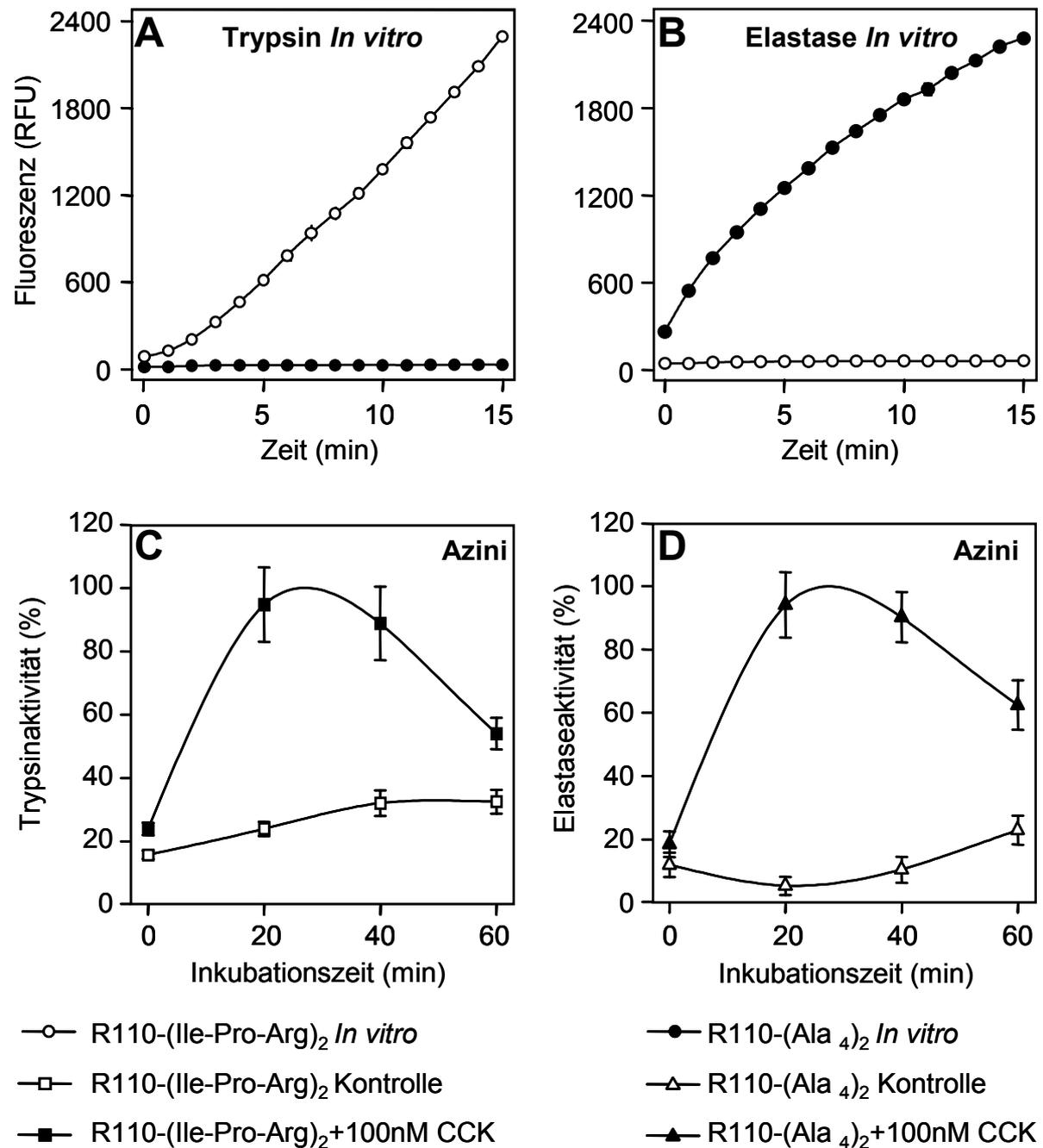


Abbildung 5.2: Spezifischer Nachweis von Trypsin- und Elastaseaktivität *In vitro* und in lebenden Azini

(A, B) Spezifische Spaltung der fluorogenen Substrate CMAC-Ile-Pro-Arg (weiße Kreise) und R110-Ala₄ (schwarze Kreise) durch Trypsin und Elastase. (C, D) Zeitlicher Verlauf der mit den oben angegebenen Substraten gemessene Trypsin- (schwarze Quadrate) und Elastaseaktivität (schwarze Dreiecke) in Azinuszellen nach 0-60 minütiger supramaximaler Stimulation mit 100 nM CCK. Die jeweilige Enzymaktivität der nicht stimulierten Kontrollzellen ist in Form von weissen Quadraten oder Dreiecken dargestellt.

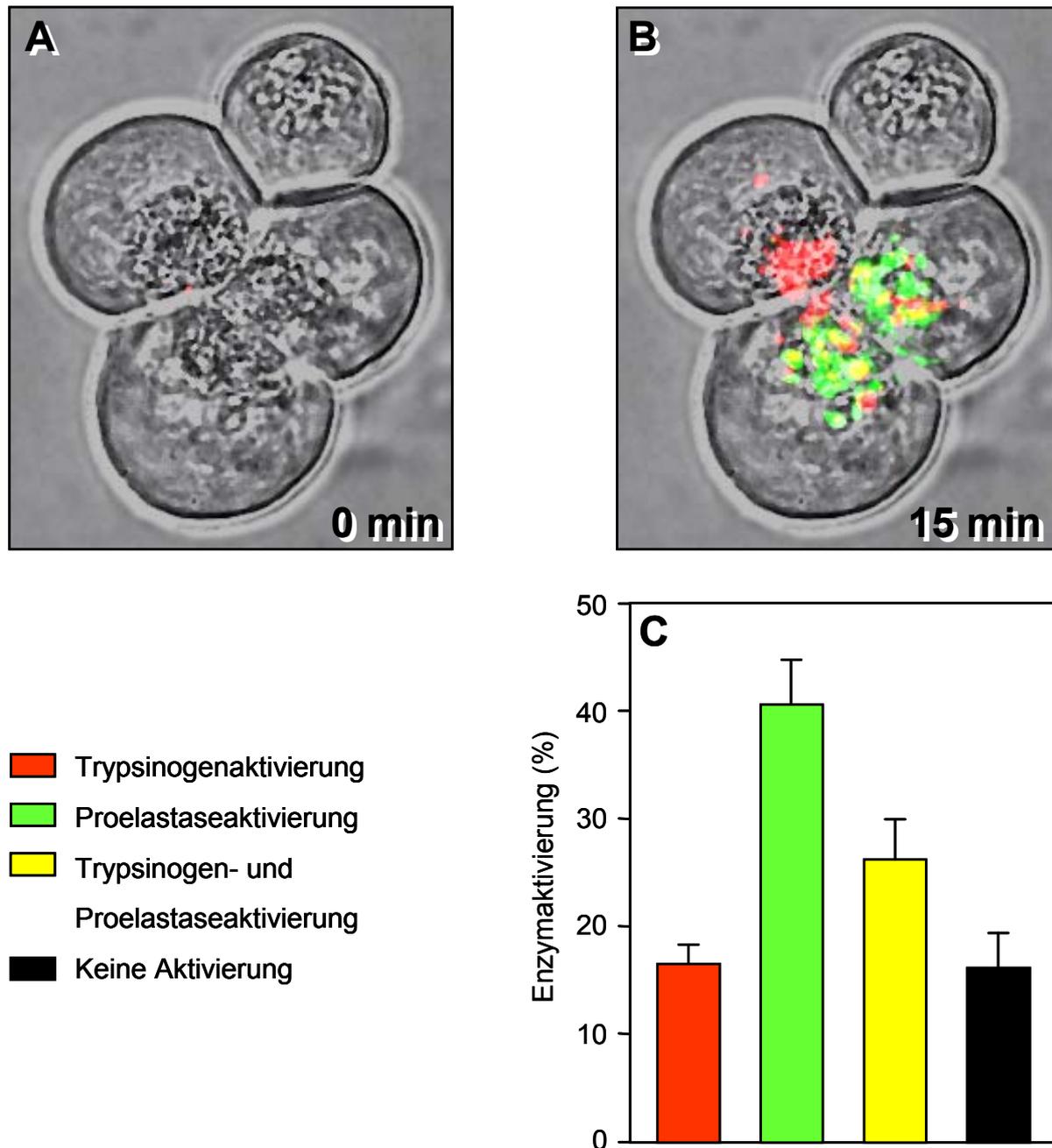


Abbildung 5.3.: Intrazelluläre Aktivierung von Trypsinogen und Proelastase nach supramaximaler CCK-Stimulation

(A, B) Überlagerungsaufnahmen aus Phasenkontrast und konfokaler Fluoreszenz eines aus vier Zellen bestehenden Azinuszellschleims in Anwesenheit eines Trypsin- (CMAC-Ile-Pro-Arg) und Elastase spezifischen (R110-Ala₄) fluorogenen Substrates. Nach 15 Minuten supramaximaler Stimulation mit 100 nM CCK entwickelt sich zellindividuell im sekretorischen Kompartiment eine in rot dargestellte Trypsinogen und grün dargestellte Proelastaseaktivierung. (C) Quantitative Auswertung der unterschiedlichen Zymogenaktivierungsmuster auf Einzelzellniveau in CCK stimulierten Azini.

5.3 Die Aktivierung von Trypsinogen schützt die Azinuszelle vor der Entwicklung einer Nekrose

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass es in der Pankreatitis in Folge der Zymogenaktivierung u. a. zu einer Zellschädigung durch Nekrose kommt (Kloppel et al., 1986; Foulis, 1980). Es wurde daher angenommen, dass auch hierbei die Trypsinogenaktivierung eng mit dem Zelluntergang im Verlauf der Pankreatitis assoziiert ist.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Azini unter Verwendung der für diesen Einsatz charakterisierten Trypsin und Elastasesubstrates in Gegenwart eines Nekrosemarkers stimuliert. Hierdurch konnte man nach Induktion der Zymogenaktivierung durch supramaximale CCK-Konzentrationen, mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie den Einfluß einer bestimmten Zymogenaktivierung auf die Schädigung einer Azinuszelle untersucht werden.

In Abb. 5.4 A-C ist eine Zeitkinetik eines CCK-stimulierten Azinus zu sehen, in dem es nach fünf Minuten wie bereits erwähnt zu einer zelldifferenziellen Trypsinogen- und Proelastaseaktivierung kam. Nach 55 Minuten zeigte eine Zelle, die vorher eine alleinige Proelastaseaktivierung entwickelte, Nekrose. Der Nachweis der Zellschädigung erfolgte mit dem DNA-Fluoreszenz-Farbstoff Propidiumiodid, der für vitale Zellen impermeabel ist. Wurde eine Zelle nekrotisch, kam es zu einem Verlust der Membranintegrität, wodurch das Propidiumiodid in die Zelle diffundiert und die Kern-DNA anfärbt.

Die Zellen wurden im Mittel nach 60 min CCK-Stimulation nekrotisch. Die Dauer bis zur Nekrose ein war hierbei nicht von der vorherigen Zymogenaktivierung abhängig (Daten nicht gezeigt).

Die Auswertung von 400 Azinuszellen, zeigte im Vergleich zu Zellen, die ohne Aktivierung nekrotisch wurden, dass Zellen nach alleiniger Trypsinogenaktivierung eine 18 % niedrigere Nekroserate aufwiesen (Abb. 5.4 D). Zellen mit Proelastaseaktivierung zeigten eine 17 % höhere und Zellen mit simultaner Aktivierung von Trypsinogen und Proelastase wiesen eine den Kontrollzellen entsprechende Nekroserate auf.

Nach diesen Daten kann der Trypsinogenaktivierung eine zellprotektive Funktion zugeordnet werden. Außerdem ist Trypsin bei gleichzeitiger Anwesenheit in der Lage

die mit der Proelastaseaktivierung assoziierte Nekrose auf Kontrollniveau zu reduzieren.

Da dieses Ergebnis keine repräsentative Folgerung auf den Gesamteinfluß Zellen zuließ, wurde in Azinuszellsuspensionen die Trypsinaktivität spezifisch inhibiert. Hierfür wurde Nafamostat eingesetzt, das *In vitro* im mikromolaren Bereich Trypsin vollständig inaktivierte, aber Elastase nicht beeinflusste (Abb. 5.5 A).

Stimulierte man Azini mit supramaximalen CCK-Konzentrationen in Anwesenheit von 10 µM Nafamostat, so wurde die Trypsinaktivität in Azinuszellsuspensionen nahezu vollständig inhibiert, die Elastaseaktivität aber nicht beeinträchtigt (Abb. 5.5 B, C). Die Gesamtnekrose in den Azinuszellsuspensionen stieg nach supramaximaler CCK-Stimulation auf 8 % an, war jedoch nicht durch die Trypsininhibition mit Nafamostat beeinflussbar (Abb. 5.5 D).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Trypsin keinen Einfluß auf die CCK-induzierte Gesamtzellnekrose in Azinuszellen hat.

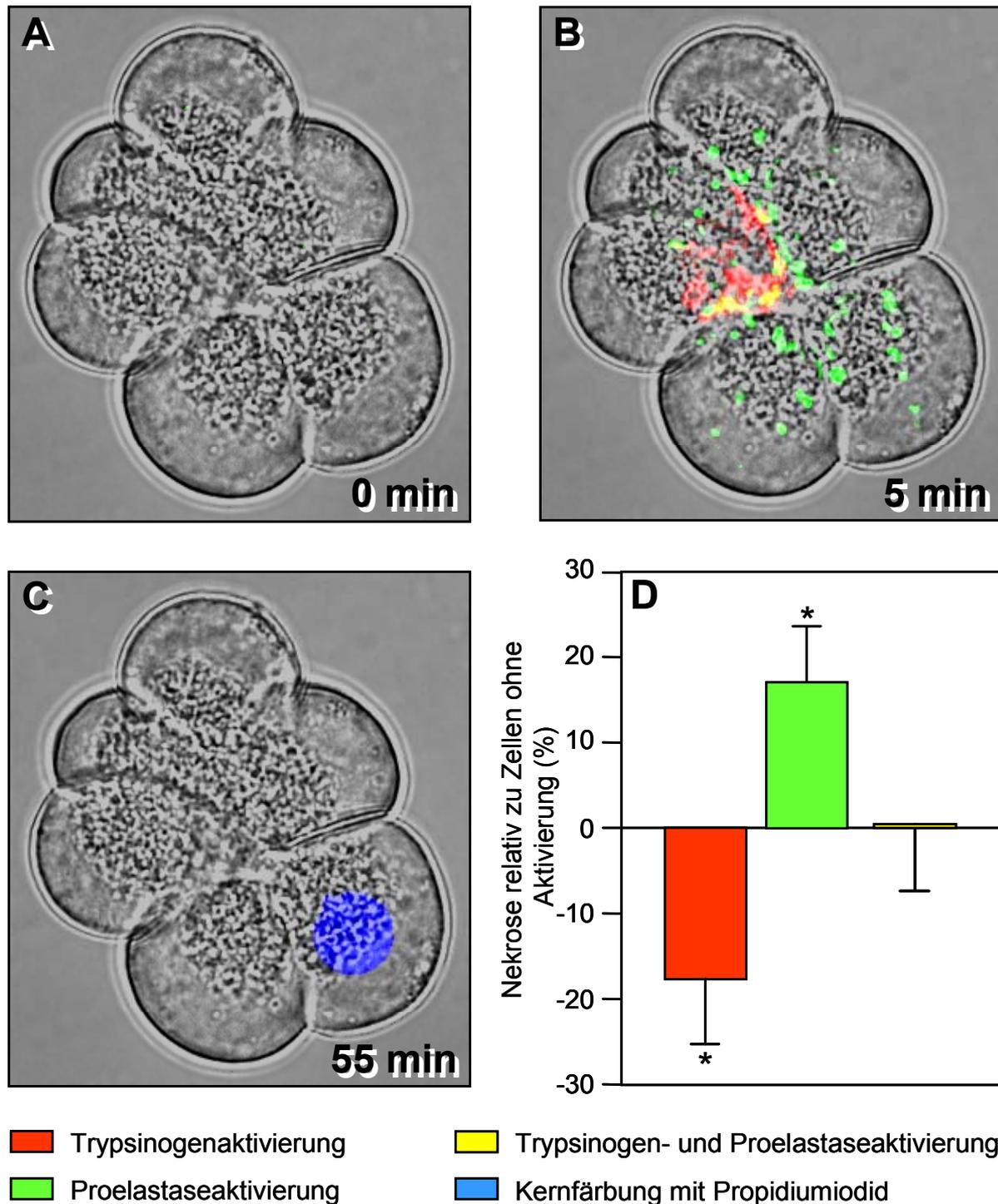


Abbildung 5.4: Entwicklung von Nekrose nach zellspezifischer Zymogenaktivierung

Zeitkinetik eines Azinus in Gegenwart des Trypsin- (CMAC-Ile-Pro-Arg) und Elastasesubstrates (R110-Ala₄), sowie des für vitale Zellen impermeablen Kern-DNA-Farbstoffes Propidiumiodid. Die Bilder sind aus Phasenkontrast- und konfokalen Fluoreszenzaufnahmen zusammengesetzt. **(A, B)** Nach fünf Minuten Stimulation in Gegenwart von 100 nM CCK entwickelt sich eine zellspezifische Trypsinogen (rot) und Proelastaseaktivierung (grün). **(C)** 55 Minuten später wird eine Zelle nach vorheriger Aktivierung von und Proelastase nekrotisch, nachgewiesen durch Propidiumiodidaufnahme und Kernfärbung (blau). **(D)** Zellindividuelle Nekroserate nach Entwicklung unterschiedlicher Zymogenaktivierungsmuster in Relation zu Zellen die ohne Aktivierung nekrotisch wurden.

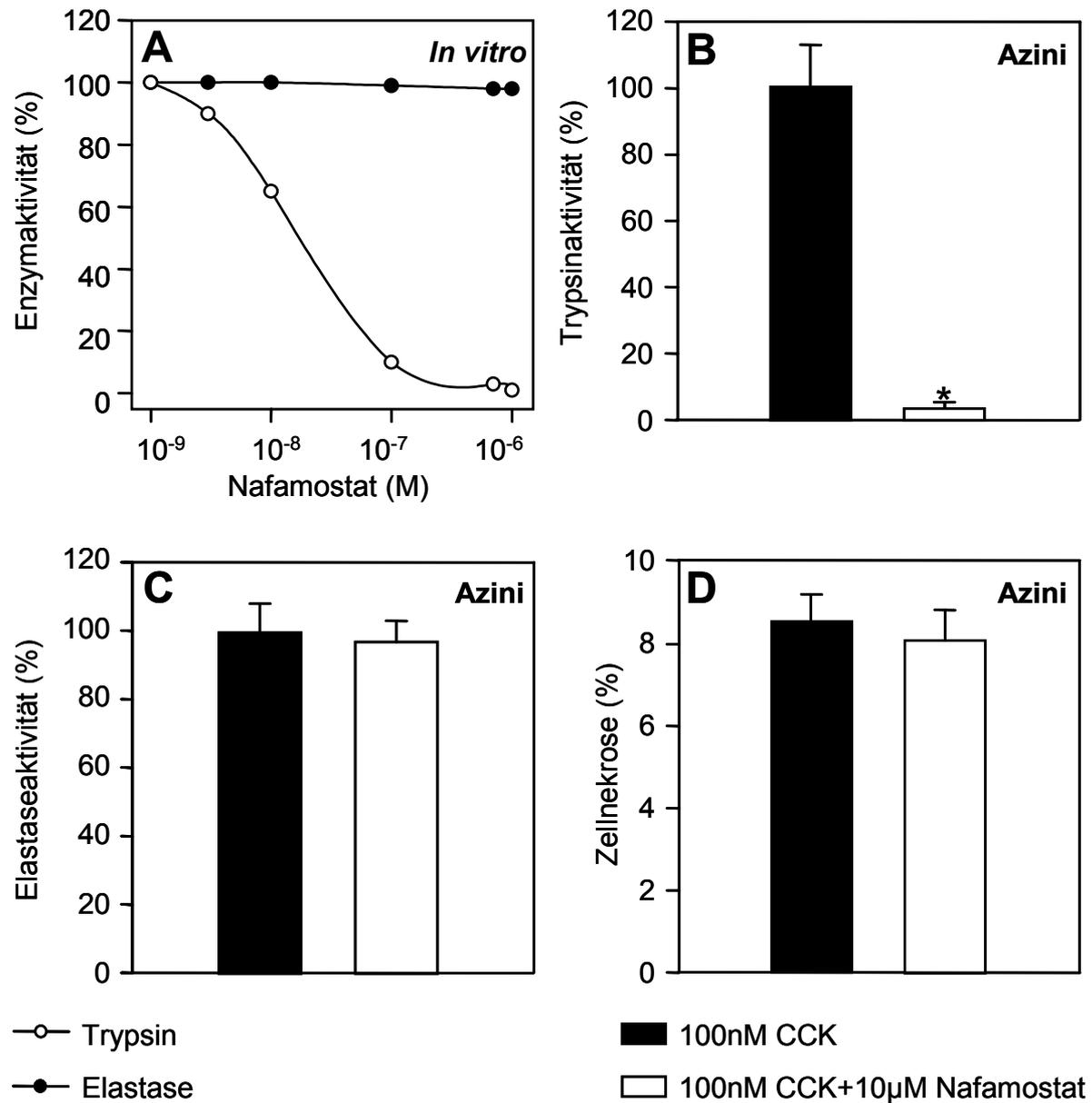


Abbildung 5.5: Spezifische Inhibierung von Trypsin *In vitro* und in lebenden Azini

(A) Effekt des Trypsininhibitors Nafamostat von 1 nM-1 µM auf die Aktivität von Trypsin (weisse Kreise) oder Elastase (schwarze Kreise), gemessen mit dem Trypsinsubstrat R110-Ile-Pro-Arg und dem Elastasesubstrat R110-Ala₄. Die Enzymaktivitäten sind in Relation zur Aktivität ohne Inhibitor dargestellt. (B, C) Mit den gleichen Substraten gemessene Trypsin- und Elastaseaktivität in Azini nach 40 minütiger Stimulation mit 100 nM CCK ohne (schwarze Balken) und mit 10 µM Nafamostat (weisse Balken). (D) In den Azinuszellen parallel entwickelte und durch Propidiumiodid Inklusion gemessene Zellnekrose in Ab- oder Anwesenheit des Inhibitors.

5.4 Proelastase wird in der Pankreatitis nicht durch Trypsin aktiviert und führt neben anderen nicht charakterisierten Proteinase zu Zellnekrose

Die bisherigen Resultate deuteten darauf hin, dass die Aktivierung von Proelastase möglicherweise trypsinunabhängig stattfindet und mit der Azinuszellnekrose assoziiert ist. Die spezifische Inhibition von Trypsin oder Elastase in Azinuszellen soll nach dem Ausschlußprinzip zeigen, ob diese Annahme bestätigt werden kann.

Wie in Abb. 5.5 C gezeigt, hatte die spezifische Trypsininhibition durch Nafamostat in Azinuzellsuspensionen keinen Einfluss auf die Elastaseaktivität. Zur Kontrolle des erhaltenen Ergebnisses wurden Azini in Gegenwart von Nafamostat supramaximal stimuliert und die Trypsinogen- und Proelastaseaktivierung auf Einzelzellniveau fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass nach fünf Minuten eine CCK-induzierte Proelastaseaktivierung ohne Trypsinaktivität stattfand (Abb. 5.6 A-C). Da die bei Einzelzellmessungen beobachtete zellprotektive Funktion des Trypsins durch dessen Inhibition weggefallen war, konnte weiterhin eine Verdopplung der Elastase assoziierten Nekrose in Gegenwart von Nafamostat beobachtet werden (Abb. 5.6 D). Auf Basis der bisherigen Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die Trypsinogenaktivierung nicht, aber andere Zymogenaktivierungen, wie die der Proelastase zur Zellnekrose führen. Daher wurde der Einfluß eines Serinpeptidasen- und eines Elastaseinhibitors auf die Enzymaktivität und Gesamtnekrose in Azinuzellsuspensionen untersucht.

Hierzu wurden zwei Inhibitoren eingesetzt : VPV-01, ein Inhibitor auf Peptidbasis, der *in vitro* Elastase spezifisch ab 1 μ M inaktivierte (Abb. 5.7 A). Pefabloc SC wurde zur unspezifischen Inhibition von Serinproteinasen wie Trypsin oder Elastase eingesetzt, der diese im gleichen Maße inaktivierte (Abb. 5.7 B). Da VPV-01 eine eingeschränkte Zellpermeabilität besaß, konnte mit 100 μ M VPV-01 die Elastaseaktivität in supramaximal stimulierten Azinuzellsuspensionen auf maximal 23 % gesenkt werden. Die unspezifische Serinpeptidaseninhibition mit Pefabloc SC reduzierte die Elastaseaktivität fast vollständig auf 5 % (Abb. 5.7 C). Die in den Azinuzellen parallel gemessene Gesamtnekrose konnte durch VPV-01 um 38 % und nach Serinproteinaseninhibitor mit Pefabloc SC um 90 % abgesenkt werden (Abb. 5.7 D).

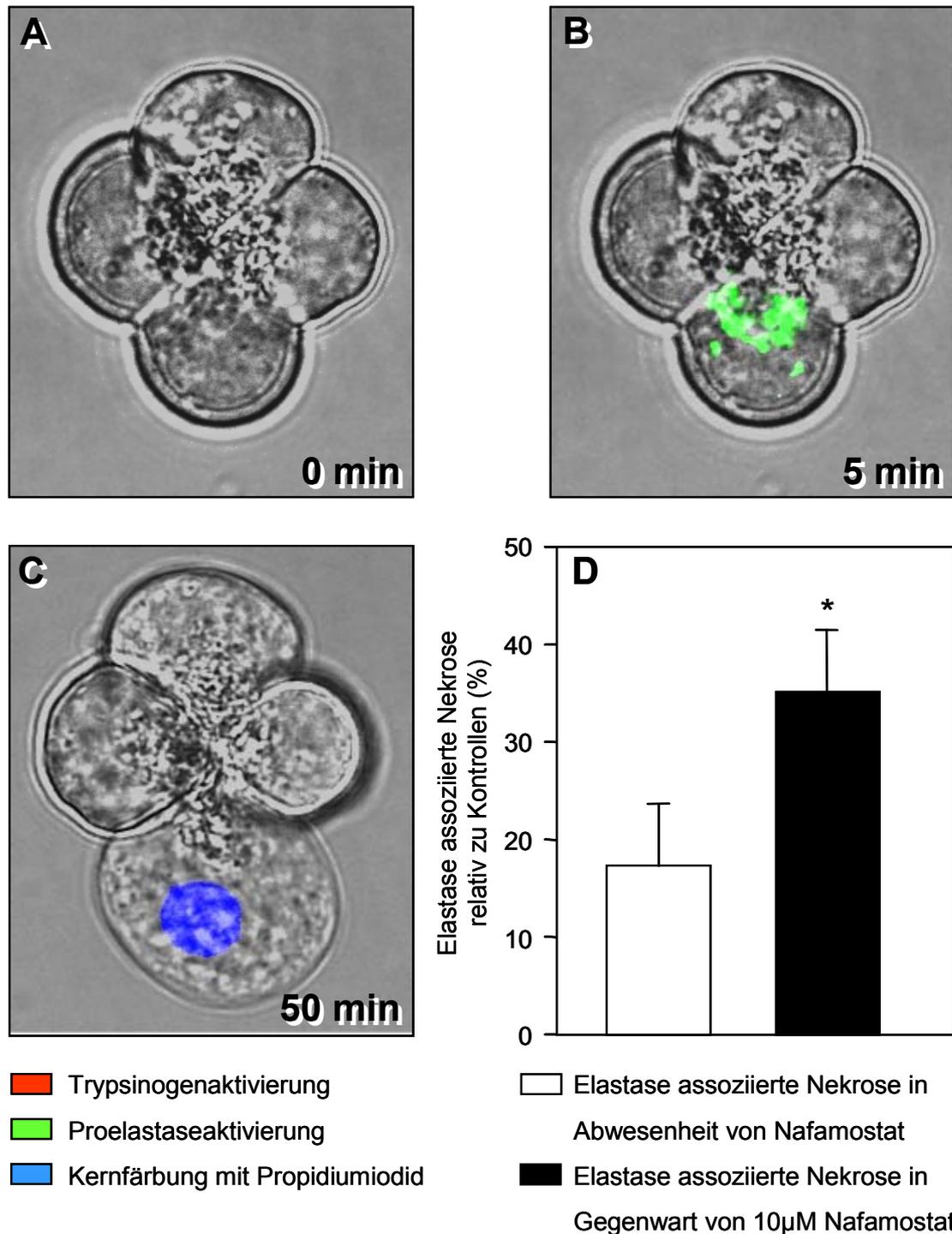


Abbildung 5.6: Differenzielle Entwicklung von Nekrose nach Trypsininhibierung

Zeitkinetik eines mit 10 μ M Nafamostat beladenen Azinus in Anwesenheit des Trypsin- (CMAC-Ile-Pro-Arg) und Elastasesubstrates (R110-Ala₄) und Propidiumiodid. Die Aufnahmen stellen Überlagerungen aus Phasenkontrast und konfokaler Fluoreszenz dar. **(A, B)** Nach fünf Minuten CCK-Stimulation aktiviert eine Zelle Proelastase (grün). **(C)** 50 Minuten später wird diese Zelle nekrotisch, nachgewiesen durch Propidiumiodidaufnahme (blau). **(D)** Nekroserate von Zellen mit alleiniger Proelastaseaktivierung in An- und Abwesenheit von Nafamostat. Als Nulllinie wurde die Rate der Zellen gewählt, die ohne Inhibitor und ohne Aktivierung nekrotisch wurden.

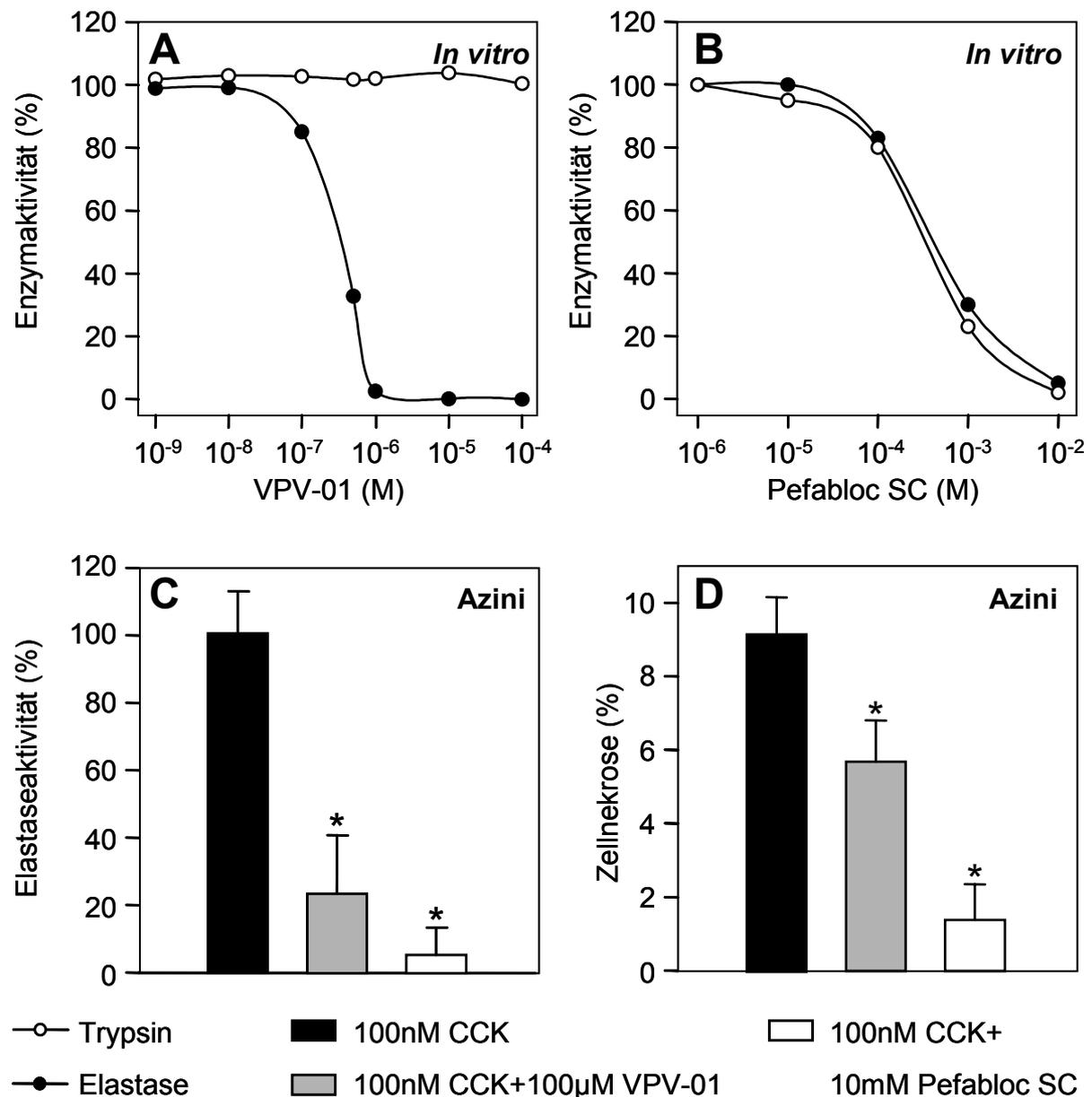


Abbildung 5.7: Spezifische Inhibierung von Elastase In vitro und in lebenden Azini

(A, B) Konzentrationsabhängiger Einfluss des Elastaseinhibitors VPV-01 bzw. des unspezifischen Serinproteinaseinhibitors Pefabloc SC auf die Aktivität von Trypsin (weisse Kreise) oder Elastase (schwarze Kreise), gemessen mit dem Trypsinsubstrat R110-Ile-Pro-Arg und dem Elastasesubstrat R110-Ala₄. (C) Mit R110-Ala₄ gemessene Elastaseaktivität in Azini nach 40 Minuten Stimulation mit 100 nM CCK ohne Inhibitor (schwarze Balken), mit 100 µM VPV-01 (graue Balken) und 10 mM Pefabloc SC. (D) Durch Propidiumiodidaufnahme parallel gemessene Azinuszellnekrose in Ab- oder Anwesenheit der obengenannten Inhibitoren.

Somit ist die Proelastaseaktivierung neben anderen noch nicht identifizierten Serinproteinasen und im Gegensatz zu Trypsin wesentlich an der Entwicklung einer Azinuszellnekrose beteiligt.

5.5 Proelastase ist durch Cathepsin B aktivierbar und wird durch Cathepsin L degradiert

In den vorangegangenen Experimenten konnten wir in supramaximal stimulierten Pankreasazini eine trypsinunabhängige Aktivierung von Proelastase nachweisen. Außerdem konnten wir in einer früheren Arbeit zeigen, dass Trypsinogen in der Pankreatitis über Cathepsin B vermittelt aktiviert wird (Halangk et al., 2000). Infolgedessen haben wir untersucht ob auch Proelastase möglicherweise über Cathepsin B oder L aktiviert werden kann.

Die Cathepsin B vermittelte Proelastaseaktivierung konnte unter den in der Literatur angegebenen Bedingungen nicht nachvollzogen werden und musste deshalb unter Änderung der Versuchsbedingungen wiederholt werden (Hakanson et al., 1991). Außerdem wurden die früheren Untersuchungen an Schweinepankreaselastase durchgeführt, die keine genauen Schlüsse auf das Verhalten von der Rattenpankreaselastase unter diesen Bedingungen zulässt.

Da Proelastase nicht kommerziell zu erwerben war, wurde diese aus einer Rattenzymogengranulafraktion mittels eines an einer Protein A und G-Sepharosegelmatrix konjugierten Proelastase bindenden Antikörpers isoliert und für Aktivierungsexperimente eingesetzt. Die so an eine Gelmatrix gebundene Proelastase wurde mit Trypsin, Cathepsin B und L unter verschiedenen Puffer- und pH-Wert-Bedingungen inkubiert und nachfolgend die matrixgebundene Elastaseaktivität fluorometrisch gemessen. Zur Korrektur von Proteindegradation und Antikörperverlust wurde die Proelastaseaktivierung in Relation zum Aktivierungspotential durch Trypsin unter dem gegebenen pH-Wert- und Pufferbedingungen quantifiziert.

Aktivierungsexperimente über einem Zeitraum von 30 Minuten zeigten, dass Rattenpankreasproelastase nach 15 Minuten Inkubation in Gegenwart von Trypsin vollständig aktivierbar war und nach weiteren 30 Minuten Inkubation die Aktivierbarkeit auf 90 % des Wertes nach 15 Minuten abgesunken war (Abb. 5.8). Die Inkubation der Proelastase in Gegenwart des Puffers zeigte weiterhin, dass keine messbare Eigenaktivierung nach 30 Minuten zu verzeichnen war.

Zur Messung des Proelastaseaktivierungspotentials von Cathepsin B und L wurde somit ein Inkubationszeitraum von 15 Minuten gewählt, in dem Trypsin in der Lage war Proelastase vollständig zu aktivieren.

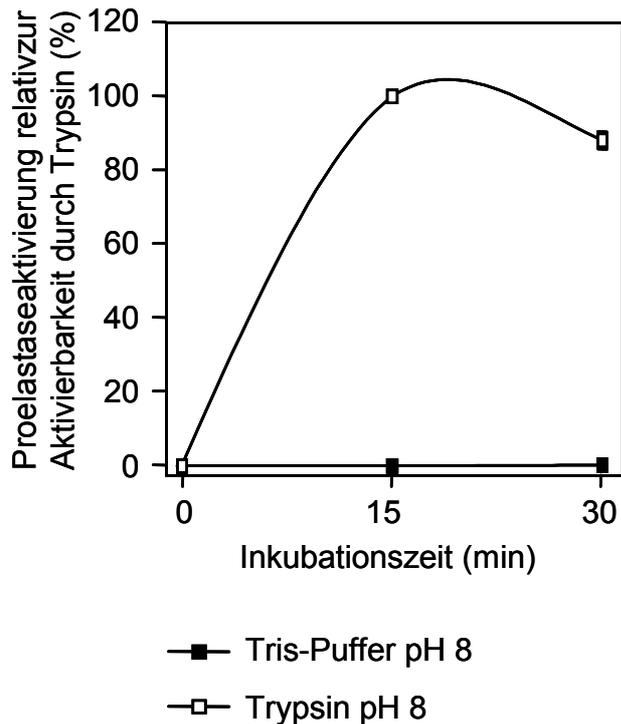


Abbildung 5.8: Aktivierungspotential von Trypsin auf Proelastase

Proelastase wurde aus einer Rattenzymogengranulafraktion durch Immunpräzipitation mit einem an Protein A+G-Sepharose gebundenen polyklonalen, Elastaseantikörper präzipitiert. Die an der Sepharose gebundene Proelastase wurde Anschließend mit Trypsin oder in Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 8 und 37 °C inkubiert. In 15 Minutenintervallen wurden Proben genommen und die vorhandene Elastaseaktivität mit dem Substrat R110-Ala₄ fluorometrisch gemessen.

Das in Abbildung 5.9 wiedergegebene Aktivierungsexperiment zeigte deutlich, dass Cathepsin B 180 % des Proelastaseaktivierungspotentials von Trypsin besass. Im Gegensatz dazu hatte Cathepsin L kein Aktivierungsvermögen.

Die gelelektrophoretische Auftrennung und immunologische Detektion des aktivierten Präzipitates zeigte zusätzlich, dass es in Gegenwart von Trypsin zu einer vollständigen Aktivierung der bei 36 kDa im Polyacrylamidgel laufenden Proelastase kam und bei ca. 30 kDa die aktivierte Form detektierbar war.

In Gegenwart von Cathepsin B war ebenfalls die Konvertierung der Proform zur aktiven Elastase erkennbar, jedoch waren noch kleine Anteile der Proelastase detektierbar.

Nach Inkubation des Präzipitates mit Cathepsin L war weder Pro- noch aktive Elastase detektierbar. Diese Beobachtung liess auf einer möglichen Degradation des Antikörpers, der Proform oder aktiven Elastase durch Cathepsin L schließen.

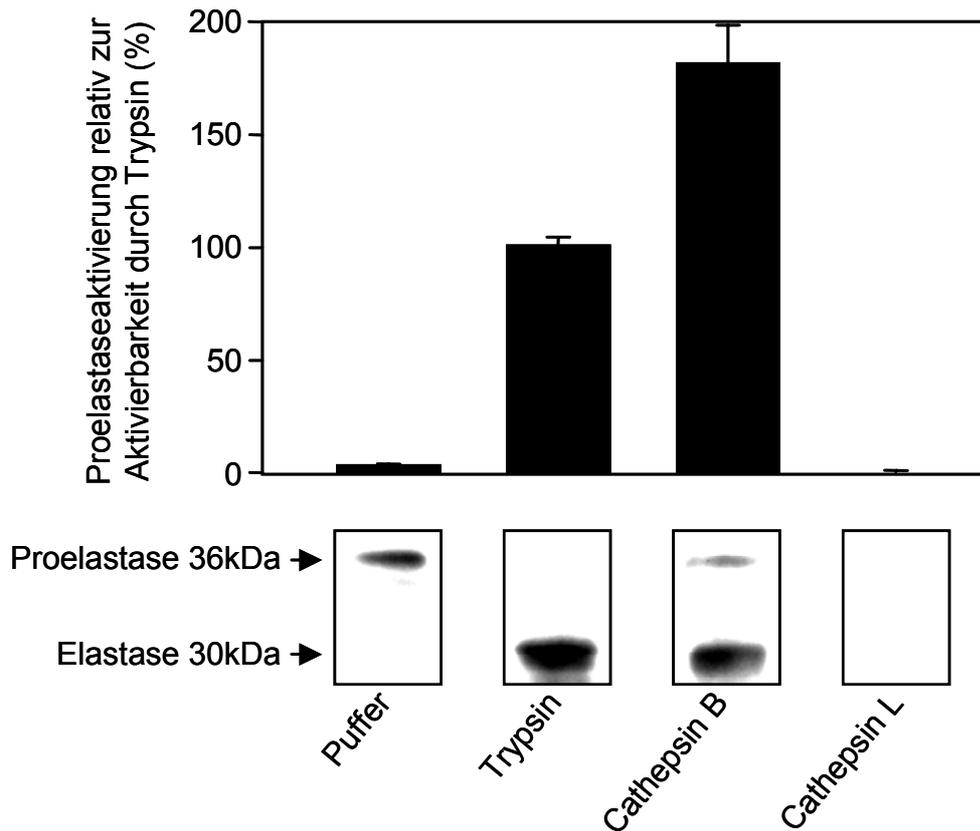


Abbildung 5.9: Aktivierung und Degradation von Proelastase durch Trypsin, Cathepsin B und Cathepsin L

Proelastase wurde aus einer Rattenzymogengranulafraktion durch Immunpräzipitation mit einem an Protein A+G-Sepharose gebundenen polyklonalen, Elastaseantikörper präzipitiert. Die an der Sepharose gebundene Proelastase wurde Anschließend mit Trypsin in Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 8, Cathepsin B und L in Cathepsinpuffer bei einem pH-Wert von vier für 15 Minuten inkubiert und nach Entfernung der Enzyme die Elastaseaktivität der Sepharose durch 60 Minuten Inkubation in Gegenwart des R110-Ala₄-Substrates in Tris-Puffer fluorometrisch bestimmt. Die erhaltene Elastaseaktivität nach Inkubation mit den angegebenen Enzymen ist in Relation zur maximalen Aktivierung durch Trypsin bei einem pH-Wert von 4 und 8 dargestellt.

Analyse der aktivierten Präzipitate durch SDS-PAGE (10-20 %-Gel) und einem Immunoblot unter Verwendung eines elastasespezifischen monoklonalen Antikörpers. Die Elastase wurde mit einem Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper und dem ECL-Detektionssystem nachgewiesen. Die Proelastase ist als obere 36 kDa Bande im Präzipitat zu erkennen, die nach Aktivierung und Abspaltung des Propeptides durch Trypsin oder Cathepsin B ca. 6 kDa tiefer läuft. Nach Cathepsin L-Inkubation ist weder eine Proelastase-, noch eine Elastasebande detektierbar.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde Elastase über acht Stunden in Gegenwart von Trypsin, Cathepsin B und L inkubiert und der Verlauf der Elastaseaktivität fluorometrisch quantifiziert.

Dabei hatte sich herausgestellt, dass weder Trypsin, noch Cathepsin B eine Elastasedegradation induzierten (Abb. 5.10 A, B). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Elastase bei einem pH-Wert von 8 innerhalb des Messzeitraumes keiner

Eigendegradation unterlag. Bei pH-Werten von 4, dem Optimum für maximale Cathepsin B und L-Aktivität, ergab sich eine Eigendegradation, die nach acht Stunden Inkubation zu einer 50 % igen Reduktion der Ausgangsaktivität führte.

Im Gegensatz zu Trypsin und Cathepsin B zeigte Cathepsin L ein eindeutiges Elastase degradierendes Potential (Abb. 5.10 C). Nach acht Stunden waren nur noch 15 % der Ausgangsaktivität zu messbar. Die Eigendegradation war in diesem Zeitraum vernachlässigbar gering.

Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass das fehlende Western-Blot-Bandenmuster des mit Cathepsin L inkubierten Proelastasepräzipitates auf einer vollständigen Degradation der Proform und aktiven Form des Enzyms durch Cathepsin L beruhte.

Untersuchte man die Stabilität von Trypsin in Gegenwart von Elastase oder den Cathepsinen B und L, so stellte sich heraus, dass Cathepsin L sehr viel schneller als bei Elastase nach einer Stunde 85 % des Trypsins degradierte (Abb. 5.11 B). Trypsin wurde durch Cathepsin B nicht degradiert, war aber im Gegensatz zur Elastase bei einem pH-Wert von 4 weit weniger stabil und verlor nach einer Stunde 50 % der Ausgangsaktivität (Abb. 5.11 B), die bei Elastase erst nach acht Stunden Inkubation unter den gleichen Bedingungen erreicht wurde.

In Puffern mit pH-Werten von 8 war Trypsin weit stabiler, unterlag aber auch hier einer ausgeprägten Eigendegradation, die bei gleichzeitiger Anwesenheit von Elastase nach drei Stunden sogar von 60 % auf 40 % verringert werden konnte (Abb. 5.11 A, B).

Nach diesen Daten kann davon ausgegangen werden, dass Proelastase durch Cathepsin B *In vitro* aktivierbar ist. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass die Serinpeptidasen Trypsin und Elastase sich nicht gegenseitig degradieren, aber von der Cysteinpeptidase Cathepsin L abgebaut werden.

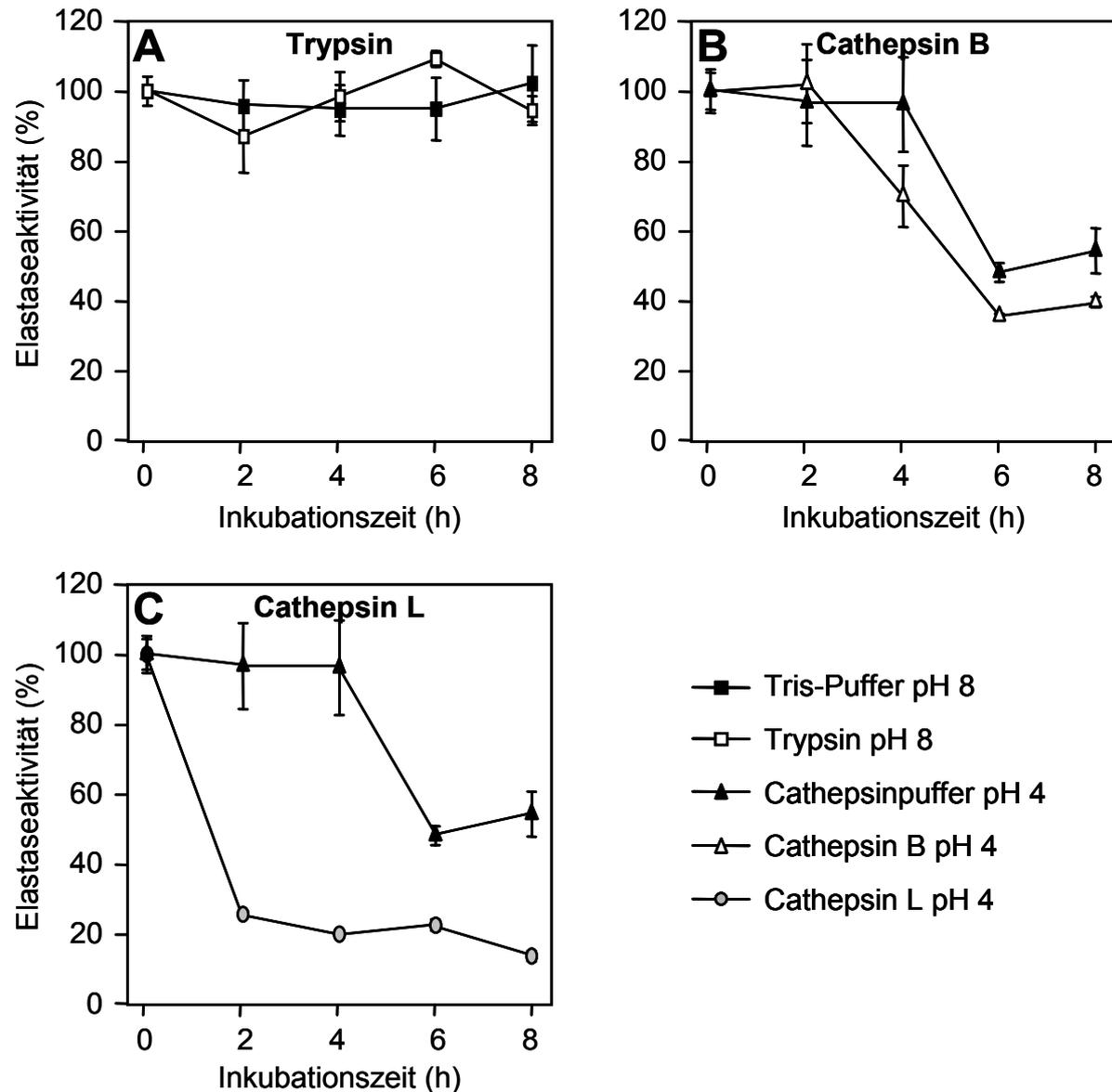


Abbildung 5.10: Degradationspotential von Trypsin, Cathepsin B und L auf Elastase

100 mU /ml Elastase wurde mit **A:** Trypsin, **B:** Cathepsin B und **C:** Cathepsin L bei gleicher Enzymaktivität mit oder ohne Enzym unter den angegebenen Pufferbedingungen über acht Stunden bei 37 °C inkubiert. In 120 Minutenintervallen wurden Proben genommen, mit Tris-Puffer auf einen pH-Wert von 8 umgepuffert und die vorhandene Elastaseaktivität mit dem Substrat R110-Ala₄ in Relation zur Ausgangsaktivität nach null Stunden fluorometrisch gemessen.

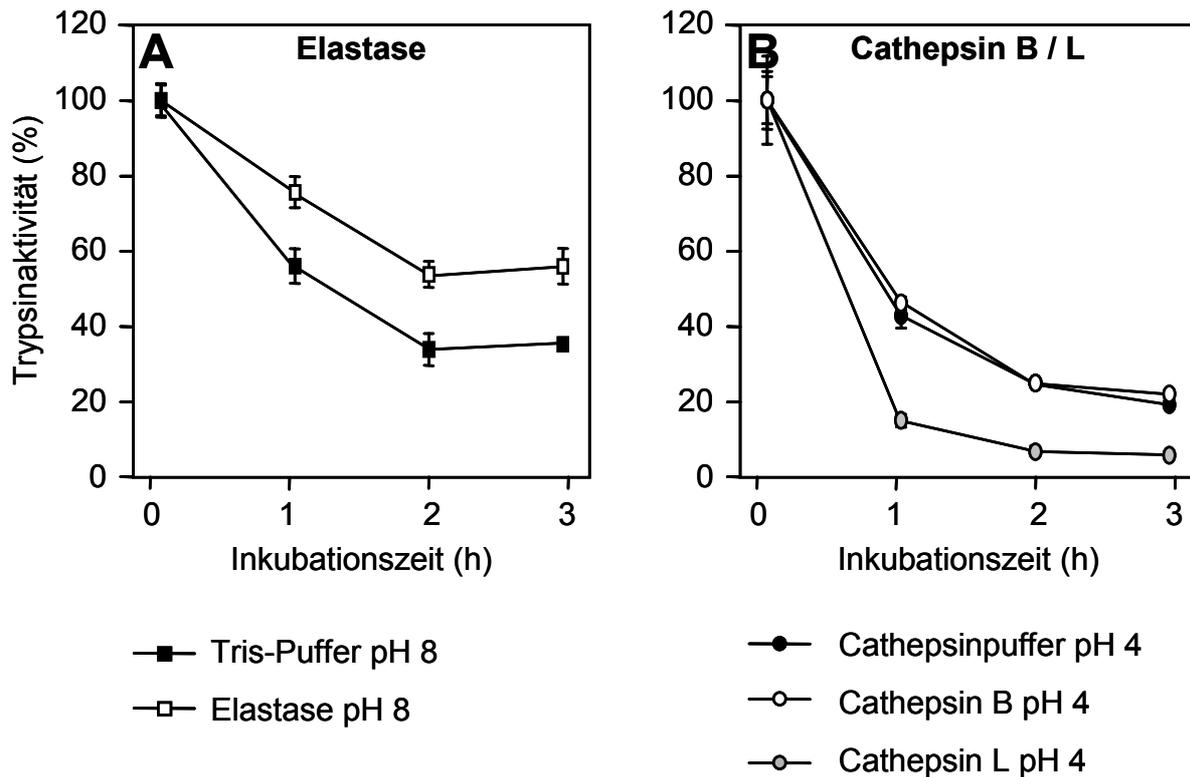


Abbildung 5.11: Degradationspotential von Elastase, Cathepsin B und L auf Trypsin

100 mU / ml Trypsin wurde mit **A:** Elastase, **B:** Cathepsin B und L gleicher Konzentration mit oder ohne Enzym unter den angegebenen Pufferbedingungen über drei Stunden bei 37 °C inkubiert. In stündlichen Intervallen wurden Proben genommen, mit Tris-Puffer auf einen pH-Wert von 8 umgepuffert und die vorhandene Trypsinaktivität mit dem Substrat R110-Ile-Pro-Arg in Relation zur Ausgangsaktivität nach null Stunden fluorometrisch quantifiziert..

5.6 Elastaseaktivität und Nekroserate von Azinuszellen sind in Cathepsin B-defizienten Mäusen signifikant reduziert

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass *In vitro* Proelastase durch Cathepsin B aktivierbar ist. Es stellte sich daher die Frage ob dieser Weg der Aktivierung in der Azinuszelle eine pathophysiologische Relevanz in der Entstehung der Pankreatitis hat.

Mit kommerziell erhältlichen Cathepsin B-Inhibitoren ließ sich diese Fragestellung nur unzureichend beantworten. Daher wurden Azinuszellen aus Cathepsin B-defizienten Knock out Mäusen isoliert und die Elastaseaktivität nach supramaximaler CCK-Stimulation cytofluorometrisch quantifiziert.

Diese war im Vergleich zu Zellen aus Kontrollmäusen um 40 % reduziert (Abb. 5.12 A). Die parallel entwickelte Nekroserate war in den Knock-Out-Tieren nicht signifikant reduziert (Abb. 5.12 B).

Die elektronenmikroskopische Auswertung nekrotischer Pankreasazinuszellen in der Caerulein-Pankreatitis zeigte im Verlauf nach acht bis 24 Stunden eine 50 % ige Reduktion der Nekroserate im Vergleich zu Wildtypkontrollen (Abb.. 5.13 A).

Die Morphologie der nekrotischen Zellen wies aber keine Unterschiede zwischen den Cathepsin B-defizienten Tieren und Kontrollen auf (Abb. 5.13 B,C).

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass eine Cathepsin B vermittelte Aktivierung von Proelastase in Azinuszellen stattfindet, jedoch noch zusätzlich andere nicht charakterisierte Peptidasen in diesem Prozeß involviert sind.

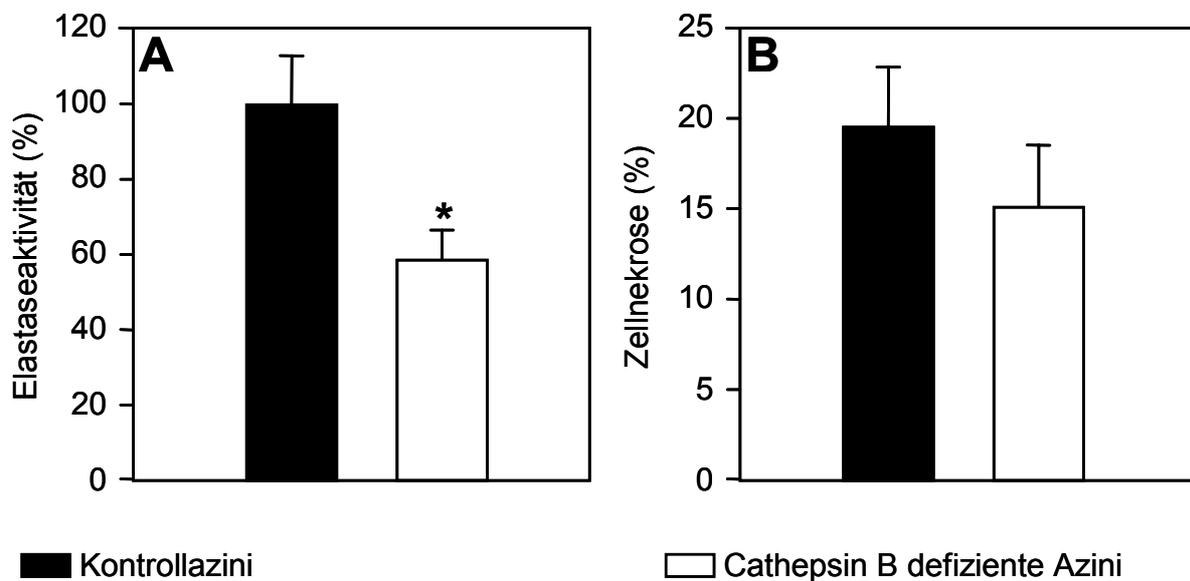


Abbildung 5.12: Einfluß von Cathepsin B auf die Elastaseaktivität und Nekrose in Azini

(A) Mit dem Substrat R110-Ala₄ gemessene Elastaseaktivität aus Kontrolltieren (schwarze Balken) und Cathepsin B-defizienten Tieren (weiße Balken) isolierten Mausazini nach 40 Minuten Stimulation mit 100 nM CCK. (B) In den Azini parallel bestimmte Nekrose, ermittelt durch Popidiumiodidaufnahme und Kernfärbung.

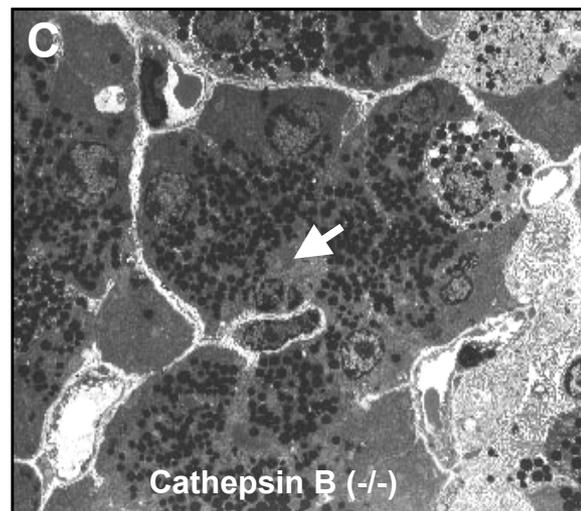
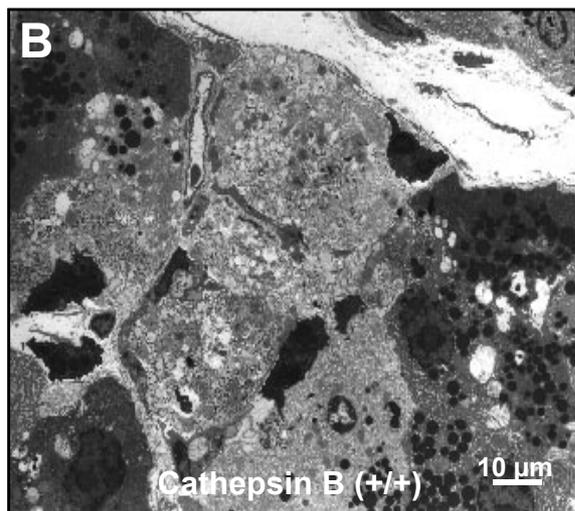
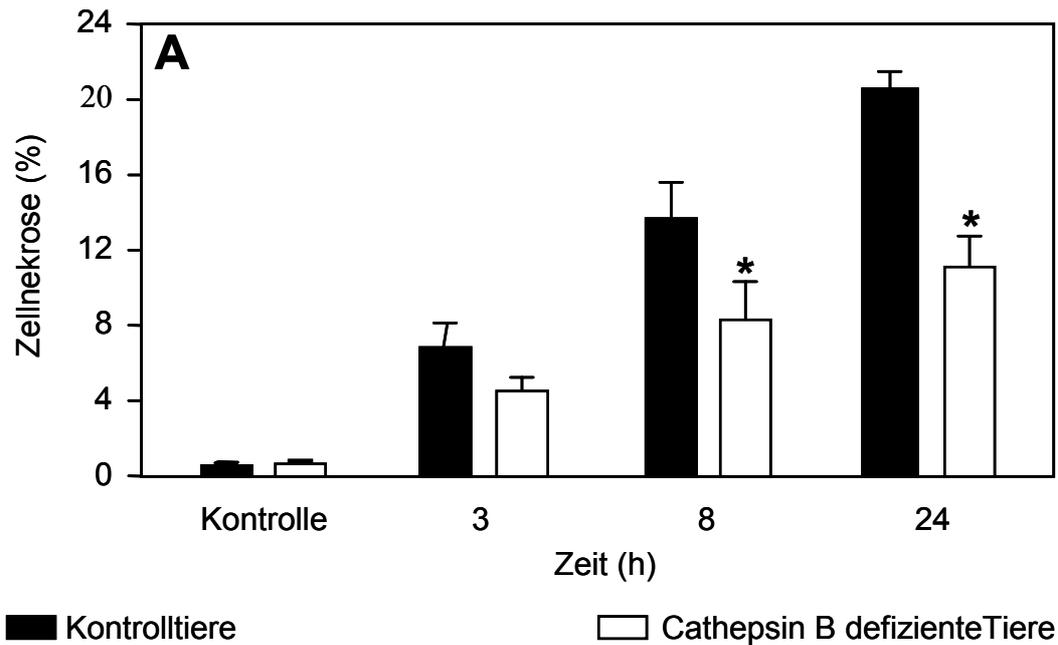


Abbildung 5.13: Nekrose in der Caerulein-Pankreatitis von Cathepsin B defizienten Mäusen

(A) 24 stündiger Verlauf der Entwicklung von nekrotischen Azinuszellen in der Caerulein-Pankreatitis. Die durch Auswertung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen erhaltenen Kontrollwerte sind durch schwarze Balken und die von CathepsinB-defizienten Tieren sind durch weiße Balken gekennzeichnet. **(B)** Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme eines Wildtyptieres nach einer 24 stündigen Pankreatitis mit prominenter Zellnekrose, gekennzeichnet durch Zellmembran-, Organellenauflösung und kondensierten Kernen. **(C)** Entsprechende Cathepsin B-defiziente Tieraufnahme (C) mit um das azinäre Lumen (weisser Pfeil) weitgehend intakten Zellen und dicht gepackten Zymogengranula.

5.7 Die Aktivierung von Procaspase-3 erfolgt unabhängig von der Aktivierung des Trypsinogens oder der Proelastase

In der Vergangenheit konnten Studien an Pankreatitismodellen zeigen, dass Apoptose und Nekrose sich parallel entwickeln können (Kaiser et al., 1995; Fujimoto et al., 1997; Sandoval et al., 1996). Weiterhin zeigten neuere Experimente, dass es in Azinuszellen zu einer CCK-rezeptorvermittelten Aktivierung apoptotischer Prozesse kommt (Gukovskaya et al., 2002). Im vorangegangenen Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in der Pankreatitis zu einer Zymogenaktivierung assoziierten Zellschädigung durch Nekrose kommt. Inwieweit hierbei auch der Zelluntergang durch Apoptose eine Rolle spielt, konnte bisher nicht beantwortet werden.

Abbildung 5.14 zeigt die mit Hilfe der TUNEL-Methode quantifizierte 3-OH-Zellkern-DNA-Strangbrüche, im Verlauf der Caerulein-Pankreatitis bei der Ratte. Die Zahl der apoptotischen Zellkerne stieg von 0,9 % im gesunden Gewebe nach vier Stunden Induktion einer Caerulein-Pankreatitis auf 3,5 % an. Somit sind apoptotische Prozesse insbesondere in der initialen Phase der Pankreatitis involviert. Es stellte sich daher die Frage, ob die Apoptose mit der Zymogenaktivierung, als auch mit der Zellschädigung durch Nekrose assoziiert ist.

Das Zeitfenster zur Erfassung der intraazinären Zymogenaktivierung nach supramaximaler CCK-Stimulation lag innerhalb der ersten Stunde. Apoptotische Zellkerne waren erst nach mehreren Stunden CCK-Stimulation quantitativ erfassbar. Daher war eine direkte Korrelierung der Apoptose mit der Zymogenaktivierung nicht möglich. Andere häufig genutzte Techniken, wie die fluorometrische Messung der Annexin-V-Bindung an Phosphatidylserin waren nicht nutzbar, da es in CCK-stimulierten Azini auch ohne apoptotische Prozesse zu einem teilweisen Verlust der Zellmembranpolarität kam (Daten nicht gezeigt). Da der sprunghafte Anstieg der 3-OH-Zellkern-DNA-Strangbrüche innerhalb der Initialphase der Pankreatitis maßgeblich auf einer Caspase-3-induzierten Degradation von DNA-Schutzenzymen (Kuida et al., 1996) in der Apoptose beruht, wurde diese über die Caspase-3-Aktivität quantifiziert. Die zur fluorometrischen Messung eingesetzten Caspasesubstrate sind aufgrund der am Fluorogen gekoppelten, aspartatreichen Peptide stark negativ polarisiert und daher nicht zellpermeabel. Die Entwicklung von PhiPhiLux-G₁D₂-Substraten auf der Basis von einem zwischen zwei

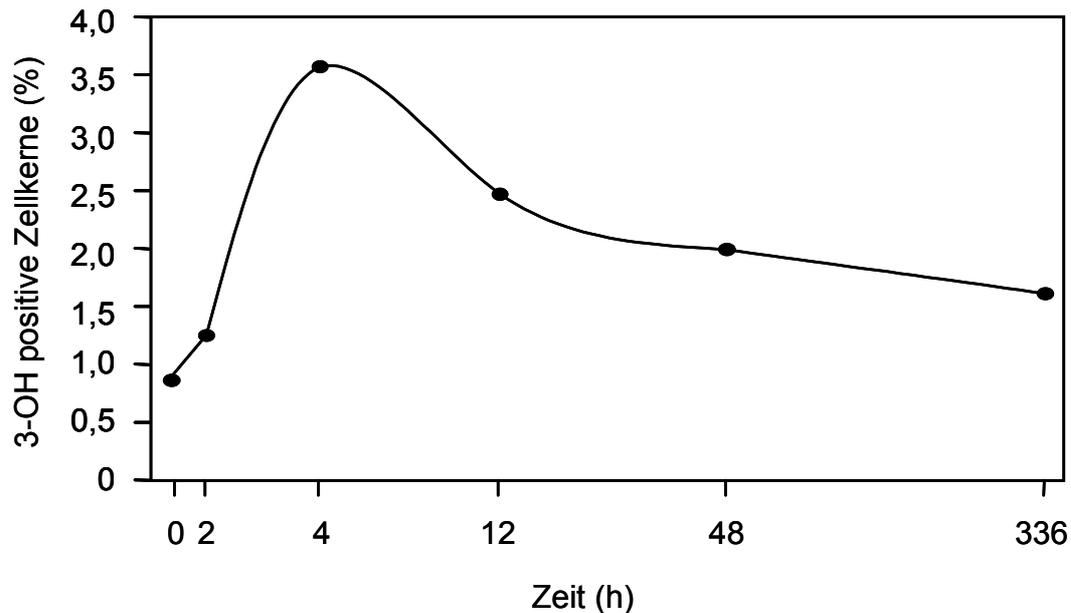


Abbildung 5.14: Verlauf der Apoptoserate in der Caerulein-Pankreatitis der Ratte

Apoptotische DNA-Strangbrüche wurden mit Hilfe der TUNEL-Methode Fluorescein-markiert und als Verhältnis zu allen mit DAPI markierten Zellkernen ausgedrückt. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil apoptotischer Azinuszellen im Verlauf einer Caerulein-Pankreatitis über 14 Tage.

Rhodaminmolekülen sandwichartig sitzenden Peptid ermöglicht die Zellgängigkeit (Komoriya et al., 2000).

Eine simultane Untersuchung der Aktivierung von Trypsinogen oder Proelastase mit Procaspase-3 war somit unter Anwendung dieser Caspasesubstrates in lebenden Azinuszellen möglich.

Abbildung 5.15 zeigt die zur Untersuchung der Aktivierungsprozesse eingesetzten Substrate. Zur Visualisierung der Trypsinaktivität wurde das bisher verwendete CMAC-Ile-Pro-Arg eingesetzt, das *In vitro* nur von Trypsin, jedoch nicht von Caspase-3 oder Elastase gespalten wurde (Abb. 5.15 A). Zur spezifischen Detektion der Elastase wurde ein AMC-gekoppeltes Alanintripeptid eingesetzt, das ebenfalls nicht von aufgereinigtem Trypsin oder Caspase-3 gespalten wurde (Abb. 5.15 B). Der Nachweis der Caspase-3-Aktivität in Gegenwart von Trypsin oder Elastase erfolgte mit PhiPhiLux-G₁D₂, einem zellgängigen Sandwichsubstrat (Abb. 5.15 C). Durch unterschiedliche Anregungs- und Emissionswellenlängen konnte entweder die

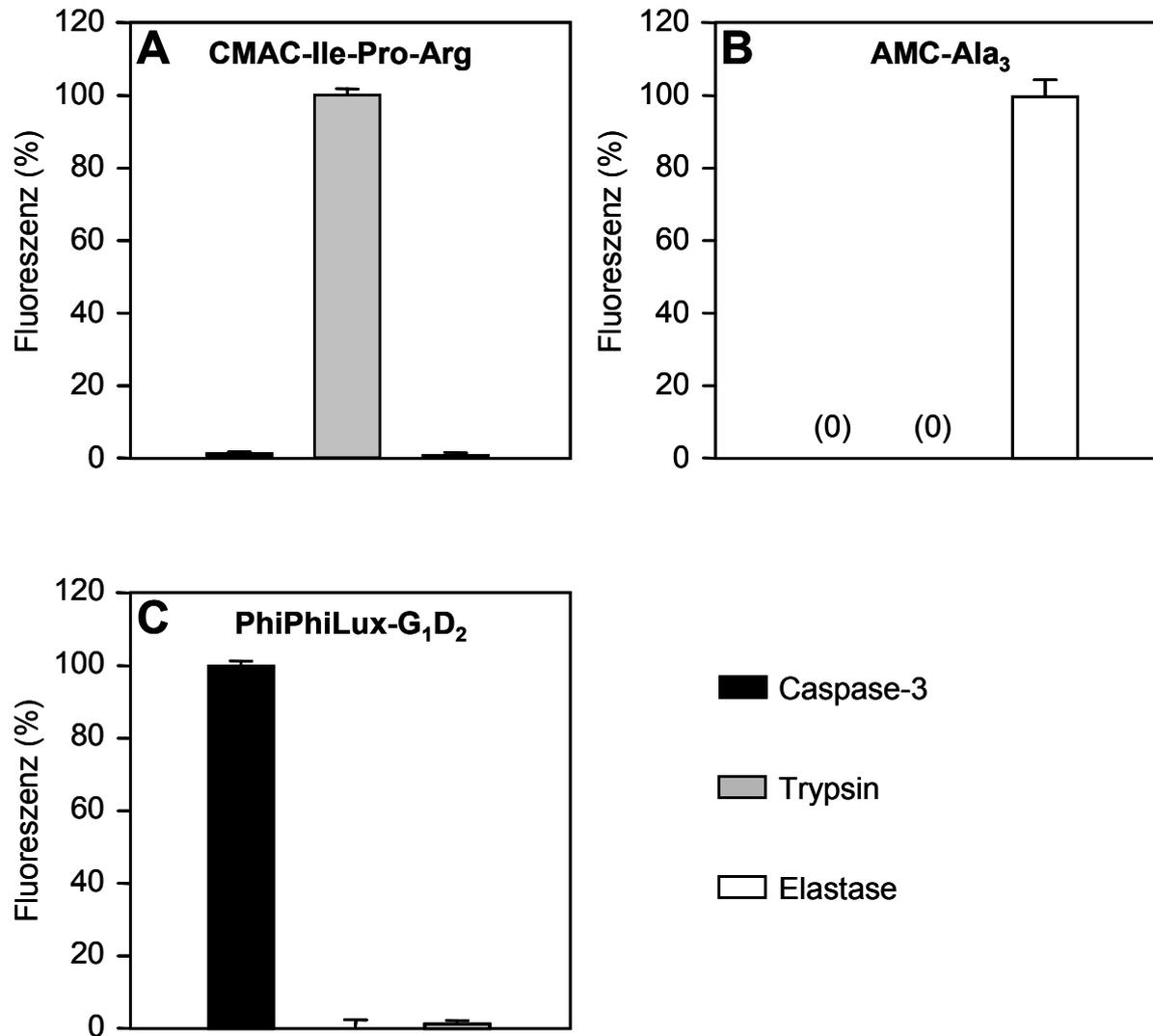


Abbildung 5.15: Spezifischer Nachweis von Trypsin, Elastase und Caspase-3 *In vitro*

Fluorometrisch ermittelte Spezifitäten der peptidgekoppelten Fluorogene CMAC-Ile-Pro-Arg, AMC-Ala₃ und PhiPhiLux-G₁D₂ gegen Caspase-3 (schwarzer Balken), Trypsin (grauer Balken) und Elastase (weißer Balken). Die Fluoreszenzen sind in Relation zur maximalen Substratspaltung ausgedrückt.

Elastase- mit der Caspase-3-Aktivität oder die Trypsin- mit der Caspase-3-Aktivität gemessen werden.

Unter Verwendung dieser Substrate hatte sich herausgestellt, dass es zu einem zellindividuellen Zymogenaktivierungsmuster nach supramaximaler Stimulation der Azini kam (Abb. 5.16 A, B). Die Auswertung von über 400 Zellen zeigte, dass nach supramaximaler CCK-Stimulation 43 %, bzw. 45 % der Zellen eine Procaspase-3- oder Trypsinogenaktivierung entwickelten (Abb. 5.16 C). 68 % der Zellen wiesen eine Proelastaseaktivierung auf.

Die unterschiedlichen Aktivierungsmuster in den Azinuszellen ließen weiterhin erkennen, dass von den Caspase-3 positiven Zellen 52% eine alleinige Procaspase-3-Aktivierung aufweisen, die sich nicht signifikant von der Trypsinogen- oder Proelastaseaktivierung assoziierten Procaspase-3-Aktivierung mit 35-38 % unterschied (Abb. 5.16 D).

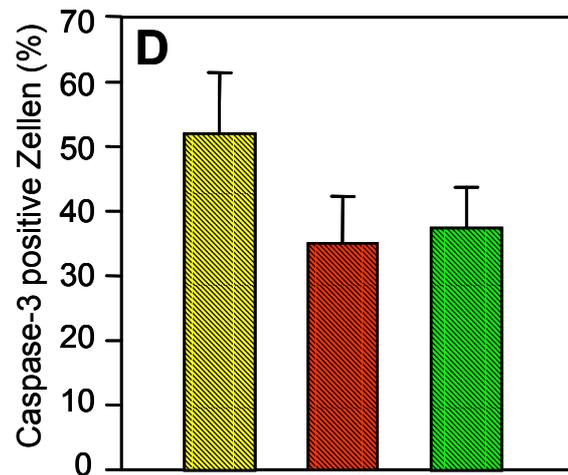
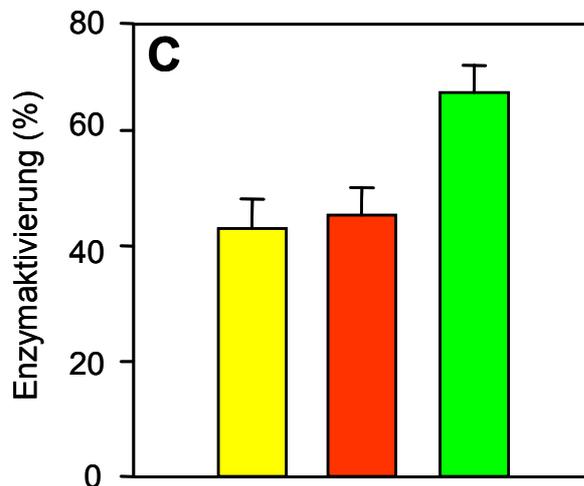
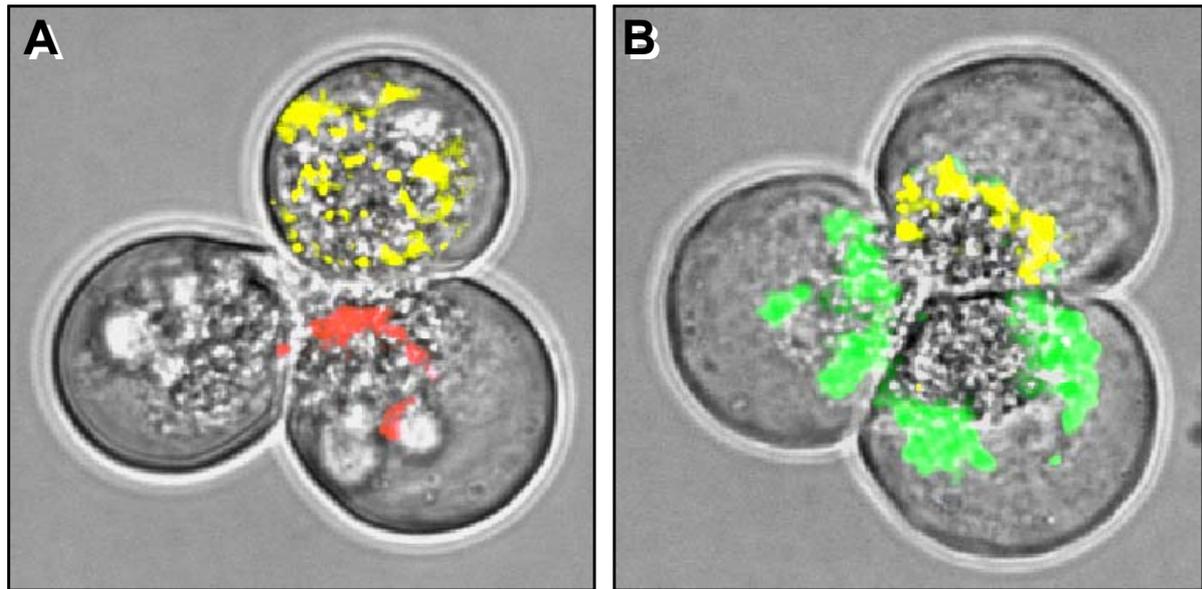
Dieses Ergebnis ließ keinen eindeutigen Schluss auf den Mechanismus einer möglicherweise von Trypsin oder Elastase unabhängig erfolgenden Procaspase-3-Aktivierung zu. Daher wurde zur Untersuchung dieser Annahme Caspase-3 mit DEVD-CHO inhibiert. *In vitro* zeigte DEVD-CHO eine spezifische Inhibierung von Caspase-3, die die Aktivität von Trypsin oder Elastase nicht beeinflusste (Abb. 5.17 A). In Azini konnte hiermit die Caspase-3-aktivität nach supramaximaler CCK-Stimulation um 90 % gesenkt werden. Die in den Azinuszellen entwickelte Trypsin- und Elastaseaktivität wurde in Anwesenheit des Inhibitors nicht signifikant verändert (Abb. 5.17 B). Ebenso wurde die Azinuszellnekrose in den CCK-stimulierten Azinuszellen nach Caspase-3-Inhibition nicht signifikant verändert (Abb. 5.17 C).

Dieses Resultat unterstützt die aus den Einzelzellmessungen sich angedeutete Annahme, dass Trypsinogen und Proelastase unabhängig von Procaspase-3-Aktivität aktiviert werden. Zusätzlich konnte belegt werden, dass die Azinuszellnekrose ebenso nicht durch eine Procaspase-3-Aktivierung beeinflusst wird.

Zur Untermauerung der unabhängigen Aktivierung der Zymogene Trypsin, Proelastase und Procaspase-3 wurde mit dem im vorherigen Ergebnisteil charakterisierten VPV-01 die Elastaseaktivität inhibiert. Die Verwendung dieses Inhibitors hatte sowohl *In vitro* (Abb. 5.18 A), als auch in CCK-stimulierten Azini (Abb. 5.18 B) keinen Einfluß auf die Caspase-3-Aktivität.

Die Inhibierung mit S124 führte *In vitro* und in Azinuszellen zu einer 90 % igen Reduktion der Trypsinaktivität (Abb. 5.19 A,B). Die Caspase-3- und Elastaseaktivität wurde aber in Anwesenheit des Inhibitors nicht signifikant erniedrigt oder erhöht.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Zymogene Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3 vollständig voneinander entkoppelt aktiviert werden und sich auch in ihrer Aktivität nicht beeinflussen.



Caspase-3-Aktivierung
 Caspase-3-Aktivierung ohne Trypsin oder Elastase
 Trypsinogenaktivierung
 Caspase-3-Aktivierung in Gegenwart von Trypsin
 Proelastaseaktivierung
 Caspase-3-Aktivierung in Gegenwart von Elastase

Abbildung 5.16: Zelldifferenzielle Aktivierung von Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3
(A, B) Aus konfokaler Fluoreszenz und Phasenkontrast zusammengesetzte Bilder eines dreizelligen Azinus, in dem nach 60 Minuten Stimulation mit 100 nM CCK die Proteinaseaktivierung nach Beladung mit dem Caspase-3-Substrat PhiPhiLux-G₁D₂ (gelb) in Kombination mit dem Trypsinfluorogen CMAC-Ile-Pro-Arg (rot) oder dem Elastasefluorogen AMC-Ala₃ (grün) dargestellt wurde. **(C)** Quantitative Verteilung der jeweiligen Enzymaktivitäten (gleiche farbliche Zuordnung wie in A, B) in den stimulierten Azini. **(D)** Procaspase-3-Aktivierung assoziierte Aktivierung von Trypsinogen (schwarz-rot schraffierter Balken), Proelastase (schwarzgrün schraffierter Balken), oder keiner Proteinaseaktivierung (schwarz-gelb schraffierter Balken).

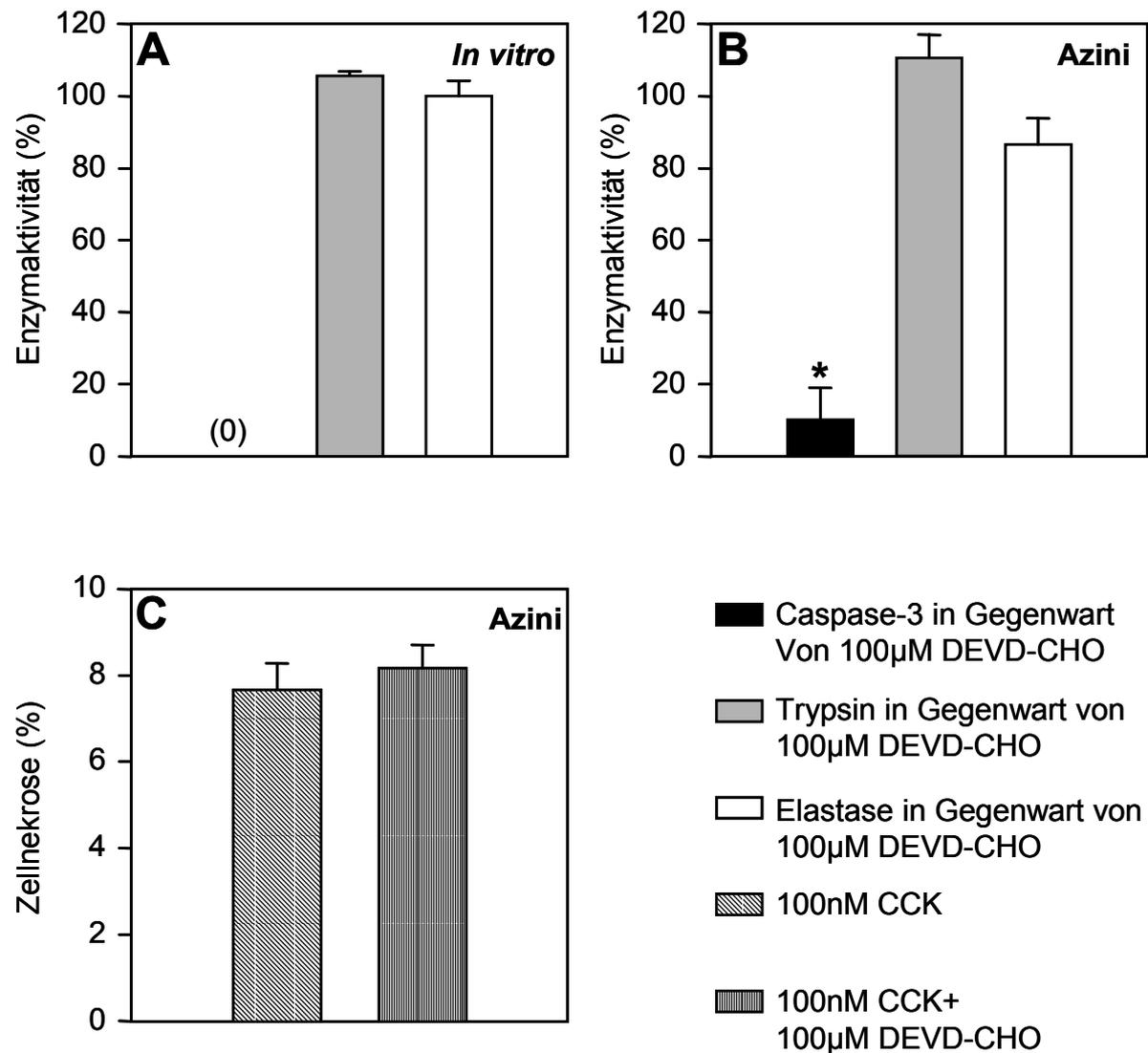


Abbildung 5.17: Einfluß der spezifischen Caspase-3-Inhibierung auf Trypsin, Elastase und Nekrose

(A) Effekt von 100 µM des Caspase-3-Inhibitors DEVD-CHO auf Caspase-3 (schwarzer Balken, gemessen mit PhiPhiLux-G₁D₂), Trypsin (grauer Balken, R110-Ile-Pro-Arg-Substrat) und Elastase (weißer Balken, R110-Ala₄-Substrat) in Relation zur Aktivität ohne Inhibitor wiedergegeben. (B) Entsprechend gemessene Enzymaktivitäten in Azini nach 60 Minuten 100 nM CCK mit 100 µM DEVD-CHO. Die Werte sind als prozentuales Verhältnis zur Enzymaktivität ohne Inhibitor dargestellt. (C) Mit Propidiumiodid quantifizierte Nekrose nach 60 Minuten supramaximaler CCK-Stimulation in Abwesenheit (schräg schraffierter Balken) oder in Gegenwart von 100 µM DEVD-CHO (längsschraffierter Balken).

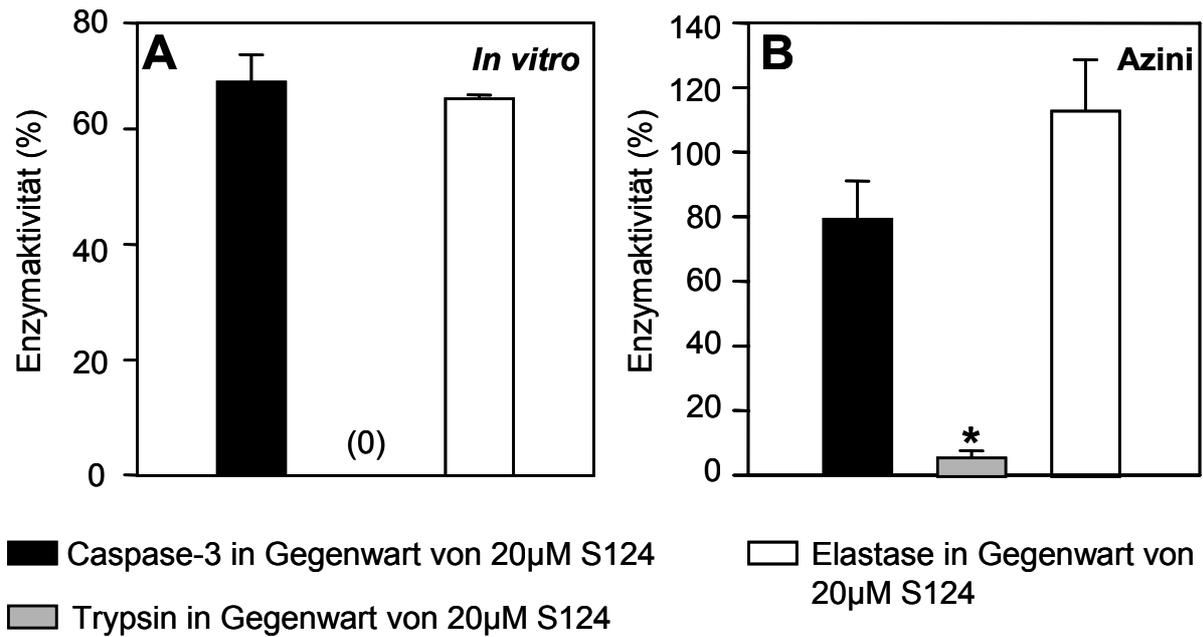


Abbildung 5.18: Effekt der spezifischen Inhibierung von Trypsin auf Caspase-3 und Elastase

(A) Einfluß von 20 µM des Trypsininhibitors S124 auf Caspase-3 (schwarzer Balken, gemessen mit PhiPhiLux-G₁D₂), Trypsin (grauer Balken, R110-Ile-Pro-Arg-Substrat) und Elastase (weißer Balken, R110-Ala₄-Substrat) in Relation zur Aktivität ohne Inhibitor. (B) Mit den entsprechenden Substraten gemessene Enzymaktivitäten in Azini nach 60 Minuten CCK-Stimulation in Gegenwart von 20 µM S124. Die Werte sind als prozentuales Verhältnis zur Enzymaktivität ohne Inhibitor dargestellt.

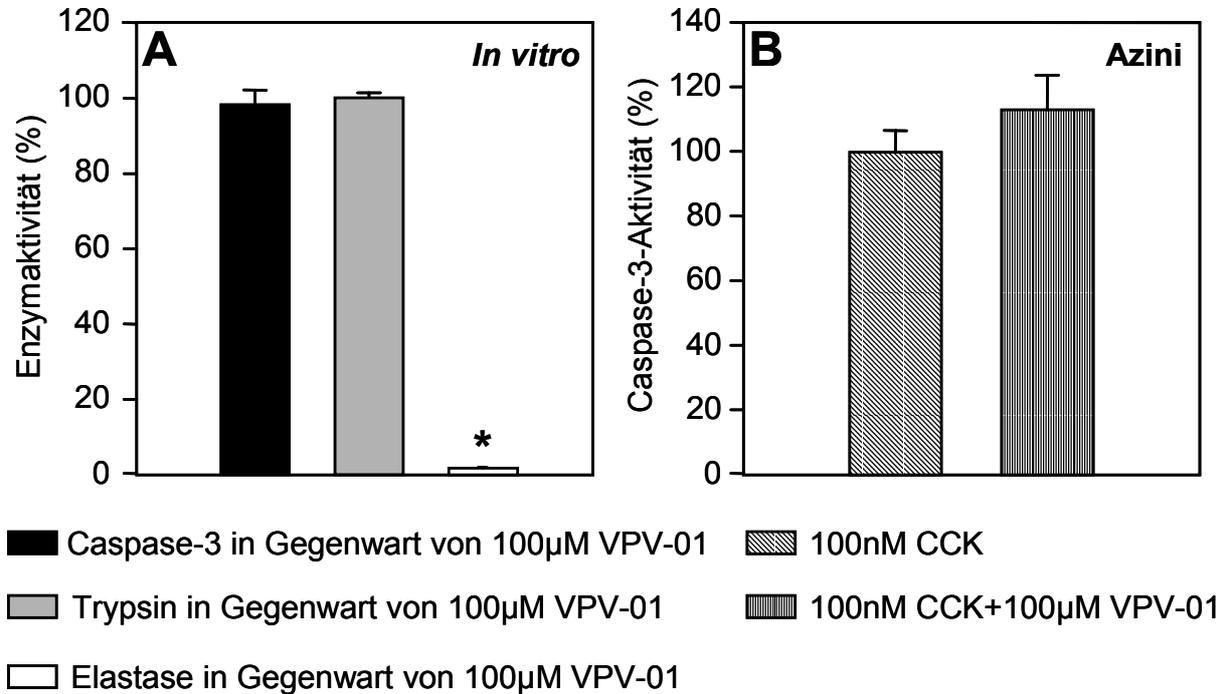


Abbildung 5.19: Einfluß der spezifischen Elastaseinhibierung auf Caspase-3 und Trypsin

(A) Inhibitorische Wirkung von 100 µM VPV-01 auf Caspase-3 (schwarzer Balken, gemessen mit PhiPhiLux-G₁D₂), Trypsin (grauer Balken, R110-Ile-Pro-Arg-Substrat) und Elastase (weißer Balken, R110-Ala₄-Substrat). Die Aktivitäten sind im Verhältnis zur Aktivität ohne Inhibitor wiedergegeben. (B) Prozentuale, azinäre Caspase-3-Aktivität nach 60 Minuten CCK-Stimulation ohne Inhibitor (schräg schraffierter Balken) und in Anwesenheit von 100 µM VPV-01 (längs schraffierter Balken).

5.8 Procaspase-3 wird in Azinuszellen wesentlich durch Cathepsin B und L vermittelt aktiviert

Im vorangegangenen Teil konnte gezeigt werden, dass die Aktivierungsmechanismen von Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3 voneinander unabhängig sind. Infolgedessen stellte sich die Frage, ob Procaspase-3 nur durch die in vielen Zellsystemen und unterschiedlichen Organen nachgewiesene Effektorcaspasen vermittelte Aktivierungskaskade aktiviert wird, oder ob es noch alternative Aktivierungsprozesse gibt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass lysosomale Enzyme, wie die Cathepsine in der Procaspase-3-Aktivierung involviert sind (Ishisaka et al., 1998; 2001).

Zur Klärung, ob dieser Aktivierungsprozeß auch in Azinuszellen eine Rolle spielt, wurde der zellgängige Cathepsininhibitor E64d eingesetzt. Dieser zeigte *In vitro* eine unspezifische Inhibition von Cathepsin B oder L, reduzierte aber die Caspase-3-Aktivität nicht signifikant (Abb. 5.20 A).

Die CCK-induzierte azinäre Caspase-3- Aktivität konnte nach unspezifischer Cathepsininhibition mit E 64 im Vergleich zur Kontrolle um 50 % reduziert werden (Abb. 5.20 B).

Nach diesem Resultat kann davon ausgegangen werden, dass in Azinuszellen Cathepsine in der Aktivierung von Procaspase-3 beteiligt sind.

Als mögliche Kandidaten konnten in anderen Organen Cathepsin B (Foghsgaard et al., 2001; Guicciardi et al., 2001) und Cathepsin L (Ishisaka et al., 1999) identifiziert werden. Aufgrund von *In-vitro*-Daten (Stoka et al., 2001) wurde eine direkte Aktivierung ausgeschlossen. Jedoch sind die Aktivierungsexperimente bei pH-Werten von 7.4 durchgeführt wurden, bei dem Cathepsin B und L nicht aktiv sind. Daher mussten die Untersuchungen bei einem pH-Wert von 4 wiederholt werden, unter denen Cathepsin B und L *In vitro* eine optimale katalytische Aktivität aufweisen. Für die Untersuchungen konnte kommerziell erhältliche Procaspase-3 nicht genutzt werden, da Anteile von aktiven Enzym zu einer schnellen Autoaktivierung des gesamten Zymogenanteils führten. Als Alternative wurde nach der gleichen Methode, wie bei der Proelastasepräzipitation aus Rattenpankreasomogenat durch einen an Protein A und G-Sepharose konjugierten Procaspase-3 bindenden Antikörpers das Zymogen an die

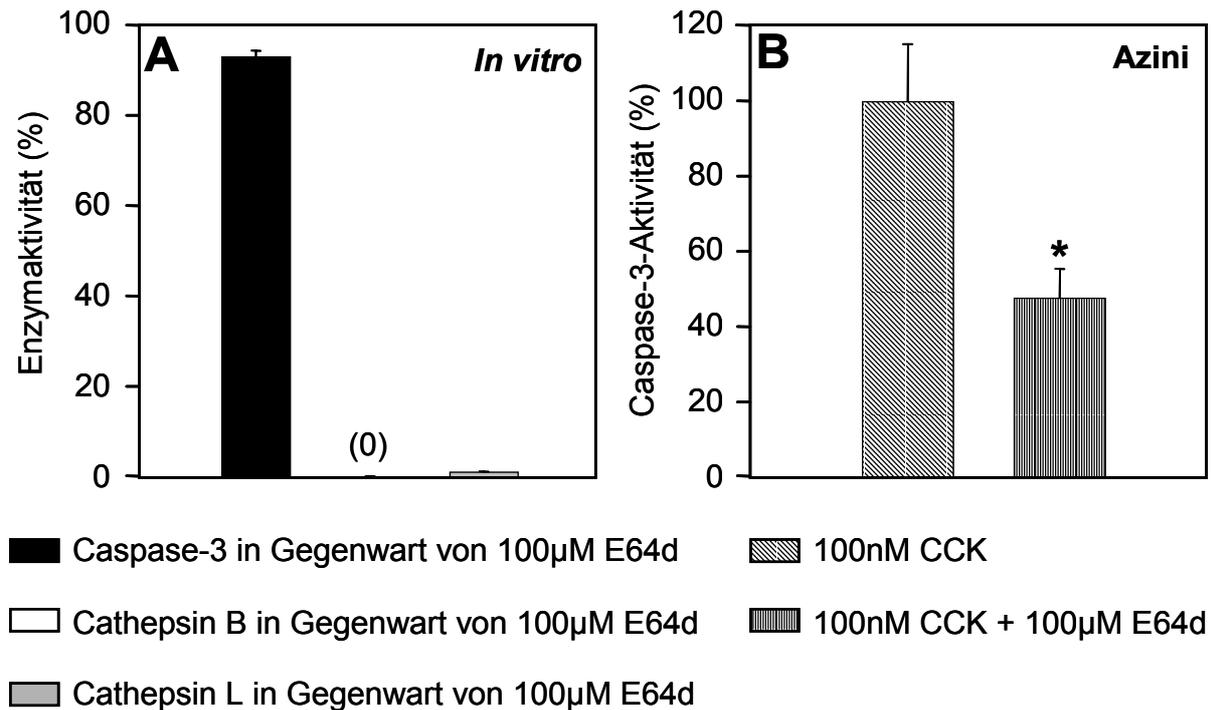


Abbildung 5.20: Einfluß der Inhibition von Cathepsinen auf Caspase-3

Diagramm (A) vermittelt den Einfluß von 100 µM E64d auf Caspase-3 (schwarzer Balken, gemessen mit PhiPhiLux-G₁D₂), Cathepsin B (weißer Balken, AMC-Arg₂-Substrat) und Cathepsin L (grauer Balken, R110-Phe-Arg-Substrat). Die Aktivitäten sind im Verhältnis zur Aktivität ohne Inhibitor wiedergegeben. (B) Prozentuale Caspase-3-Aktivität in Azini nach 60 Minuten CCK-Stimulation ohne Inhibitor (schräg schraffierter Balken) und in Anwesenheit von 100 µM E64d (längs schraffierter Balken).

Gelmatrix gebunden. Da *In vitro*, als auch *In vivo* gezeigt werden konnte, dass Caspase-8 Procaspase-3 aktiviert wurde die nach Inkubation mit Cathepsin B und L erhaltene Caspase-3-Aktivität in Relation zur Aktivierbarkeit durch Caspase-8 gesetzt.

Das in Abbildung 5.21 dargestellte Experiment belegt, dass Cathepsin B oder L im Vergleich zur Caspase-8 unter *In-vitro*-Bedingungen kein Procaspase-3 aktivierendes Potential besitzen. Jedoch lässt sich hieraus nicht schließen, ob diese Cathepsine über andere, nicht charakterisierte Wege, in Azinuszellen eine Procaspase-3-Aktivierung vermitteln können.

Zur Beantwortung dieser Annahme wurde die Caspase-3-Aktivität nach supramaximaler CCK-Stimulation in Azinuszellen aus Cathepsin B- und L-defizienten Mäusen mit denen von Kontrolltieren verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die

Caspase-3-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp sowohl in Cathepsin B, als auch in L defizienten Azinuszellen um 50 % reduziert war (Abb. 5.22 A, B).

Somit wird die Procaspase-3-Aktivierung in supramaximal CCK-stimulierten Azini neben den noch zu charakterisierenden Effektorcaspasen im wesentlichen auch von Cathepsin B und L vermittelt.

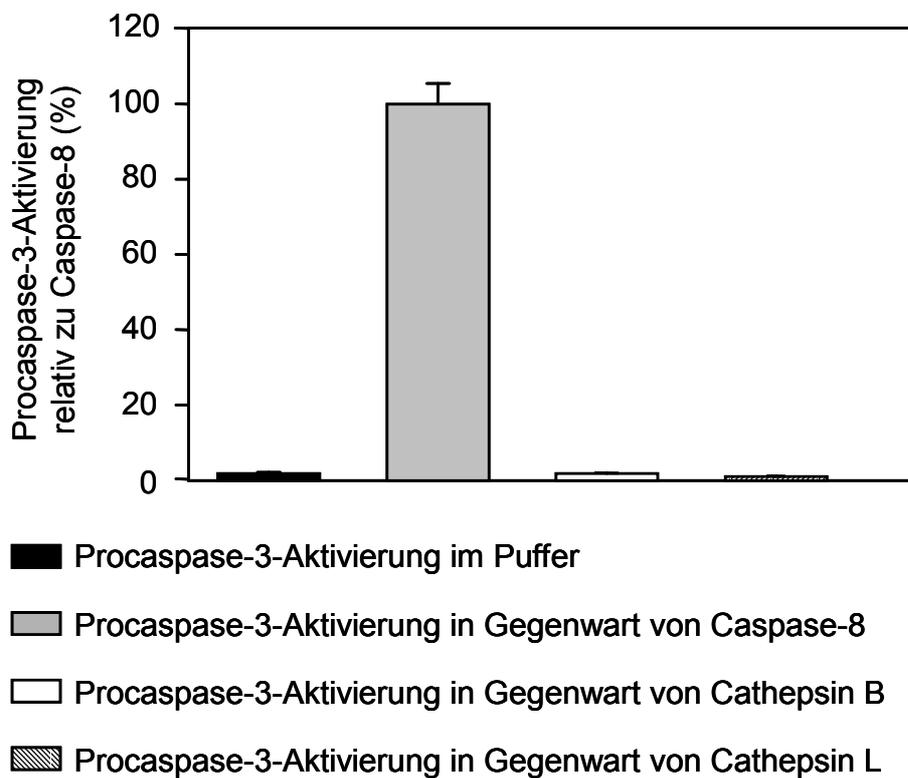


Abbildung 5.21: Aktivierung von Procaspase durch Caspase-8, Cathepsin B und Cathepsin L

Procaspase-3 in Rattenpankreas homogenat wurde durch Immunpräzipitation mit einem an Protein A+G-Sepharose gebundenen polyklonalen, Procaspase-3-Antikörper präzipitiert. Die an der Gelmatrix gebundene Procaspase-3 wurde anschliessend mit Caspase-8 in Caspasepuffer bei pH 7.4, Cathepsin B und L in Cathepsinpuffer bei pH 4 für 30 Minuten inkubiert und nach wegwaschen der Enzyme die Caspase-3-Aktivität der Sepharose durch 60 Minuten Inkubation in Gegenwart des PhiPhiLux-G₁D₂-Substrates in Caspasepuffer fluorometrisch bestimmt. Die erhaltene Caspase-3-Aktivität nach Inkubation mit den angegebenen Enzymen ist in Relation zur maximalen Aktivierung durch Caspase-8 dargestellt.

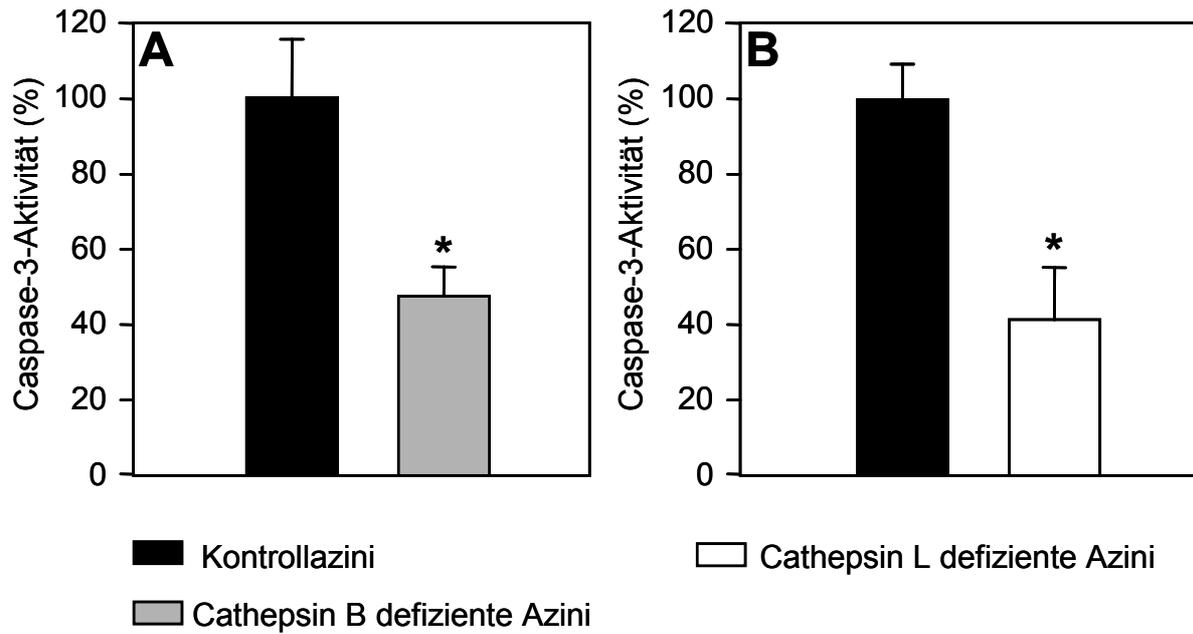


Abbildung 5.22: Cathepsin B und L abhängige Procaspase-3-Aktivierung in Azini

(A) In aus Kontrollmäusen (schwarze Balken) und Cathepsin B-defizienten Tieren (graue Balken) isolierten Azini wurde mit PhiPhiLux-G₁D₂ die Caspase-3-Aktivität nach 60 Minuten CCK-Stimulation gemessen. (B) Nach gleicher Methode gemessene Caspase-3-Aktivität in isolierten Azini aus Wildtypieren (schwarz-weiß schraffiert) und Cathepsin L-defizienten Mäusen (weiße Balken).

6. Diskussion

6.1 Amylasesekretion in CCK-stimulierten Azinuszellen

Im Blickpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung der in der Frühphase der Pankreatitis ablaufenden Zymogenaktivierung und deren Einfluß auf die Zellnekrose und Apoptose.

Die Beantwortung der in diesem Zusammenhang stehenden Fragestellungen erfolgte am Modell der isolierten Pankreasazinuszellen. Diese stellen die funktionelle Einheit des Pankreas dar. Zur Sicherung der physiologische Intaktheit des verwendeten Systems wurde die Amylasesekretionsleistung der Azini in Abhängigkeit von der CCK-Konzentration nach Isolierung durch Collagenaseverdau untersucht.

Vitale Azinuszellen zeigen bei Stimulation mit ansteigenden CCK-Konzentrationen eine Freisetzung von Amylase in Form einer hyperbolischen Kurve (Williams et al., 1978). Stimulationen mit physiologischen CCK-Konzentrationen führen hierbei zu einer maximalen Zellsekretionsleistung, wogegen supramaximale CCK-Konzentrationen zu einer Sekretionsblockade und einer intrazellulären Aktivierung der Verdauungsenzyme führen.

Die erhaltene Sekretionskurve der isolierten Azini zeigte bei physiologischer CCK-Stimulation eine maximale Amylasesekretion von 28%. Diese war mit den in der Literatur publizierten Werten von 22 % bis 30 % vergleichbar (Halangk et al., 1997; Saluja et al., 1997).

Somit konnte davon ausgegangen werden, dass durch die Präparationsmethode unter Verwendung der eingesetzten Collagenase vitale Azinuszellen isoliert werden konnten, die ein funktionell intaktes Modellsystem für die nachfolgenden Stimulationsexperimente garantierten.

6.2 Die Aktivierung von Trypsinogen und Proelastase findet in supramaximal stimulierten Azinuszellen unabhängig voneinander statt

Seit einem Jahrhundert wird der Zymogenaktivierung eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Pankreatitis zugeordnet (Chiari, 1896). (Kunitz und Northrop, 1935; Kassel und Kay, 1973). Man ist bisher davon ausgegangen, dass aktiviertes Trypsinogen in einem kaskadenartigen Zymogenaktivierungsprozess, ähnlich wie unter physiologischen Bedingungen im Dünndarm vorhanden, andere Zymogene in der Pankreatitis aktivieren könnte (Rinderknecht, 1986). Bisher wurde diese Vorstellung nur auf *In-vitro*-Beobachtungen gestützt (Kunitz und Northrop, 1935; Kassel und Kay, 1973). Es wurde jedoch bisher nicht beantwortet, ob das in der Aktivierungskaskade des Dünndarms am Anfang stehende Trypsin andere Zymogene, wie z. B. die Proelastase auch im Verlauf der Pankreatitis in der Azinuszelle aktiviert.

Zur Klärung dieser Frage wurden am Modell der isolierten Pankreasazinuszellen, die nach supramaximaler CCK-Stimulation stattfindende Zymogenaktivierung untersucht. Der Nachweis von Zymogenaktivierungen erfolgte unter Verwendung von zellgängigen, fluorogenen Substraten auf Basis von peptidgekoppelten Rhodaminen (Leytus et al., 1993; Rothe et al., 1992) und Coumarinen (Kawabata et al., 1988). Diese konnten *In vitro* als enzymespezifisch für die Messung von Trypsin- oder Elastaseaktivitäten charakterisiert werden.

Der zeitliche gemessene Verlauf der Enzymaktivitäten stellte sich in Azinuszellsuspensionen parabelförmig dar (Krüger et al., 1998). Die gemessene Aktivität setzte sich in der Anfangsphase aus einer überwiegenden Zymogenaktivierung zusammen, die allmählich aufgrund von Eigendegradation wieder rasch abfiel. Dieser Trypsineigendegradationsprozeß in Azinuszellen konnte von uns in vorausgegangen Arbeiten bewiesen werden (Halangk et al., 2002).

Durch Anwendung dieser Messtechnik war es möglich, die Aktivierung von verschiedenen Zymogenen simultan in Zellsuspensionen und auf Einzelzellniveau unter Realzeitbedingungen zu beobachten.

Stimulationsexperimente auf Einzelzellebene zeigten, daß nach wenigen Minuten supramaximaler CCK-Stimulation in sekretorischem Kompartiment der Azinuszelle eine zellindividuelle Aktivierung von Trypsinogen, Proelastase oder keiner Aktivierung nachweisbar war.

Somit ist die Zymogenaktivierung in jeder Zelle eines Azinus ein individueller Prozeß, der nach CCK-Stimulation nicht über Zell-Zell-Interaktionen, wie dies bei dem Calciumflux nachgewiesen, auf andere benachbarte Zellen innerhalb eines Azinus übertragen wird (Krüger et al., 2000).

Ergänzend zeigten die Messungen auf der Einzelzellebene, dass in Azinuszellen sich eine Proelastaseaktivierung ohne Trypsin entwickeln konnte. Durch spezifische Inhibition von Trypsin mit Nafamostat (Ramjee et al., 2000) konnte diese Beobachtung sowohl auf Einzelzellniveau, als auch in Zellsuspensionen bestätigt werden.

Auf Basis der gewonnenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Hypothese einer intraazinären Aktivierungskaskade in der Pankreatitis auf Trypsin und Elastase nicht zutrifft und Proelastase über einen bisher noch nicht näher charakterisierten Mediator aktiviert wird. Die zukünftigen Forschungen müssen zeigen, ob andere Zymogene in der duodenalen Aktivierungskaskade, wie z. B. das Chymotrypsinogen oder die Phospholipase A2 in der Pankreatitis ebenfalls unabhängig von Trypsin aktiviert werden.

6.3 Die Nekrose ist in Azinuszellen nicht mit der Aktivierung von Trypsinogen assoziiert

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass es in der Pankreatitis in Folge der Zymogenaktivierung neben anderen Prozessen zu einem Zelluntergang durch Nekrose kommt (Kloppel et al., 1986; Foulis, 1980). Es wurde daher angenommen, dass auch hierbei die Trypsinogenaktivierung eng mit der Nekrose im Verlauf der Pankreatitis assoziiert ist.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Azini unter Verwendung der charakterisierten Trypsin- und Elastasesubstrate in Gegenwart eines dritten Fluoreszenzfarbstoffes zum Nachweis einer Zellnekrose mit CCK supramaximal stimuliert. Hierzu wurde Propidium Iodid eingesetzt, das für vitale Zellen impermeabel ist, aber in nekrotische Zellen diffundieren kann und den Zellkern anfärbt.

Durch die simultane Quantifizierung der Zymogenaktivierung mit der Nekroserate konnte gezeigt werden, dass auf Einzelzellebene die alleinige

Trypsinogenaktivierung die Azinuszellnekroserate im Vergleich zu Kontrollzellen ohne eine Trypsinogen- oder Proelastaseaktivierung signifikant reduziert war. In Zellen mit alleiniger Proelastaseaktivierung war die Zellnekrose im Vergleich zu den Kontrollen ohne Aktivierung signifikant erhöht und konnte bei gleichzeitiger Anwesenheit von Trypsinaktivität auf Kontrollniveau reduziert werden. Inhibierte man Trypsin mit Nafamostat, so verdoppelte sich auf Einzelzellebene die Elastase assoziierte Nekrose im Vergleich zur Nekroserate ohne Trypsininhibitor.

In Messungen von Zellsuspensionen führte die Trypsininhibition weder zu einer Senkung, noch zu einer Erhöhung der CCK-induzierten Zellnekroserate. *In-vivo*-Studien (Manabe et al., 1992; Wisner et al., 1989) mit Nafamostat als Inhibitor zeigten, dass dieser eine protektive Funktion in der Entwicklung einer Caerulein-Pankreatitis hatte, jedoch wurden hierbei millimolare Konzentrationen eingesetzt, die nicht nur Trypsin, sondern auch andere Proteinasen inhibierten (Daten nicht gezeigt) und daher nicht repräsentativ für den Einfluß einer trypsinspezifischen Inhibierung auf die pankreatitisassoziierten Zelluntergang waren.

Diese Beobachtungen widersprechen der bisherigen Annahme von Trypsin als toxischer Faktor für den azinären Zelluntergang und deuten auf eine generelle protektive Funktion des Trypsins gegen die durch Proelastase- oder anderen Zymogenaktivierungen assoziierten Nekrose hin.

Weiterhin sollte die Rolle des Trypsins in der hereditären Pankreatitis (Whitcomb et al., 1996; Gorry et al., 1997; Teich et al., 1998; Simon et al., 2002) neu überdacht werden, bei dem man die Entwicklung einer Pankreatitis auf einer verstärkten Aktivierbarkeit (Varallyay et al., 1998; Teich et al., 2000; Sahin-Toth und Toth, 2000; Sahin-Toth, 2000) oder einer verminderten Degradation (Le Marechal et al., 2001; Pfutzer et al., 2002) des Trypsins durch Punktmutationen im Enzymmolekül diskutiert. Auf Basis der auf Einzelzellebene gezeigten Schutzfunktion des Trypsins könnten die Mutationen aber durch einen Funktionsverlust des Trypsins zur Krankheitsentwicklung führen.

Ergänzend kann aus den Einzelzelluntersuchungen geschlossen werden, dass andere Proteinasen, wie z. B. die Elastase in der Entwicklung einer Nekrose involviert sind. Eine neuere Studie an Guamerin (Kim et al., 2000) als elastasespezifischen Peptidinhibitor hatte gezeigt, dass die Elastaseinhibition den Schweregrad der experimentellen Caerulein-Pankreatitis verringert (Song et al., 1999). Jedoch konnte die Studie nicht zeigen, ob dieser Effekt auf einer

intrazellulären oder extrazellulären inhibition von Leukozytenelastase oder Pankreaselastase beruhte. Daher konnten die Ergebnisse nicht die Frage des alleinigen Einflusses von Pankreaselastase auf die azinäre Zellschädigung beantworten.

Experimente mit VPV-01, einem elastasespezifischen Inhibitor zeigten, dass die Elastaseinhibition die Nekroserate in Azinuszellsuspensionen um 40 % reduzierte. Nach vollständiger Inhibition der Serinproteinasenaktivierung mit Pefabloc SC, ließ sich die Nekroserate auf Kontrollebene reduzieren.

Damit kann zum ersten Mal bewiesen werden, dass die CCK-induzierte Azinuszellnekrose nicht durch Aktivierung von Trypsinogen, sondern über die Aktivierung von anderen Zymogenen, wie z. B. Elastase vermittelt induziert wird. Die Ergebnisse können aber nicht klären, ob der zellprotektive Einfluß von Trypsin oder die zur Nekrose führende Aktivierung von Serinproteinasen auf einer Aktivierung oder Degradation von anderen zellulären Proteinen beruht. Weiterhin müssen die in der Gruppe der Serinhydrolasen außer der Elastase zur Nekrose führen Enzyme näher charakterisiert werden.

6.4 Die Proelastaseaktivierung wird in Azinuszellen wesentlich durch Cathepsin B vermittelt

Die vorausgehenden Versuche haben gezeigt, dass in supramaximal stimulierten Azinuszellen Proelastase trypsinunabhängig aktiviert wird. Aus *In-vitro*-Experimenten ist bekannt, dass Trypsin in der Lage ist, Proelastase zu aktivieren (Grant und Robbins, 1956; Lamy und Tauber, 1964) und auch Cathepsin B ein Aktivierungspotential besitzt (Hakanson et al., 1991). Da wir bisher zeigen konnten, dass Trypsinogen in der Pankreatitis durch Cathepsin B aktiviert wird (Halangk et al., 2000), haben wir das Aktivierungspotential der Cathepsine B und L auf Proelastase untersucht. Die Cathepsin B vermittelte Proelastaseaktivierung konnte von uns, als auch von anderen (Dies, 1995) unter den in der Literatur angegebenen Bedingungen nicht nachvollzogen werden und musste deshalb unter Änderung der Versuchsbedingungen wiederholt werden.

Proelastase wurde hierzu aus einer Rattenzymogengranulafraktion immunpräzipitiert und damit Aktivierungsexperimente durchgeführt. Mit dieser Technik konnten gegenüber herkömmlichen Methoden nicht größere Proteinmengen isoliert werden, jedoch reichten die Mengen für Aktivierungsassays und Proteinanalytik aus.

Inkubierte man die präzipitierte Proelastase mit Trypsin, Cathepsin B und L unter verschiedenen Puffer- und pH-Bedingungen, so stellte sich heraus, dass Cathepsin B bei einem pH-Wert von 4 ein fast doppelt so hohes Aktivierungsvermögen, wie Trypsin besaß. Es kann daher postuliert werden, dass Proelastase in der Azinuszelle möglicherweise über Cathepsin B aktiviert wird.

Unter den publizierten Bedingungen eines pH-Wertes von 3.8 ohne das Reduktionsmittel Cystein war keine nennenswerte Aktivierung nachweisbar. Dieses Resultat kann auf den reduktiven Schutz des Cysteins im katalytischen Zentrum des Enzyms vor der Oxidation durch Luftsauerstoff zurückgeführt werden. Die zur Aufrechterhaltung der Enzymaktivität, insbesondere bei Einsatz von gereinigten Cathepsinen beobachtete Notwendigkeit von Reduktionsmitteln konnte bei der Umsetzung von fluorogenen (Lipperheide, 1982) oder proteinogenen (Otto und Schepers, 1967) Substraten belegt werden. Der nicht physiologische, niedrige pH-Wert von 4 für die Cathepsininkubation wurde gewählt, da Enzyme dieser Klasse unter den gegebenen Bedingungen eine optimale katalytische Aktivität in isolierten Systemen zeigen (Mason und Taylor, 1984; Otto, 1971). Dieser Effekt kann auf einer Wechselwirkung zwischen den Substrat und dem Enzym erklärt werden, dessen Zugang zu den Bindungstaschen im aktiven Zentrum durch den niedrigen pH-Wert erleichtert wird und die Bildung des Übergangszustandes stabilisiert.

Die Inkubation mit Cathepsin L führte unter den gleichen Versuchsbedingungen zu keiner Aktivierung von Proelastase. Die Analyse der immunpräzipitierten Elastase im Western-Blot zeigte das für anionische Rattenpankreaselastase charakteristische Bandenmuster der Proform bei 36 kDa und der aktiven Form bei 30 kDa (Szilagyi et al., 1995). In Gegenwart von Cathepsin L war weder eine Proform, noch aktive Elastase im Westen-Blot nachweisbar.

Zur Klärung, ob dieser Effekt auf Antigenizitätsverlust oder Degradation beruhte, wurde der zeitliche Verlauf der Elastaseaktivität, als Ausdruck der Degradation in Gegenwart der eingesetzten Enzyme untersucht.

Dabei hatte sich herausgestellt, dass Trypsin und Cathepsin B kein Elastase degradierendes Potential aufwiesen, jedoch Cathepsin L das Enzym schnell degradierte.

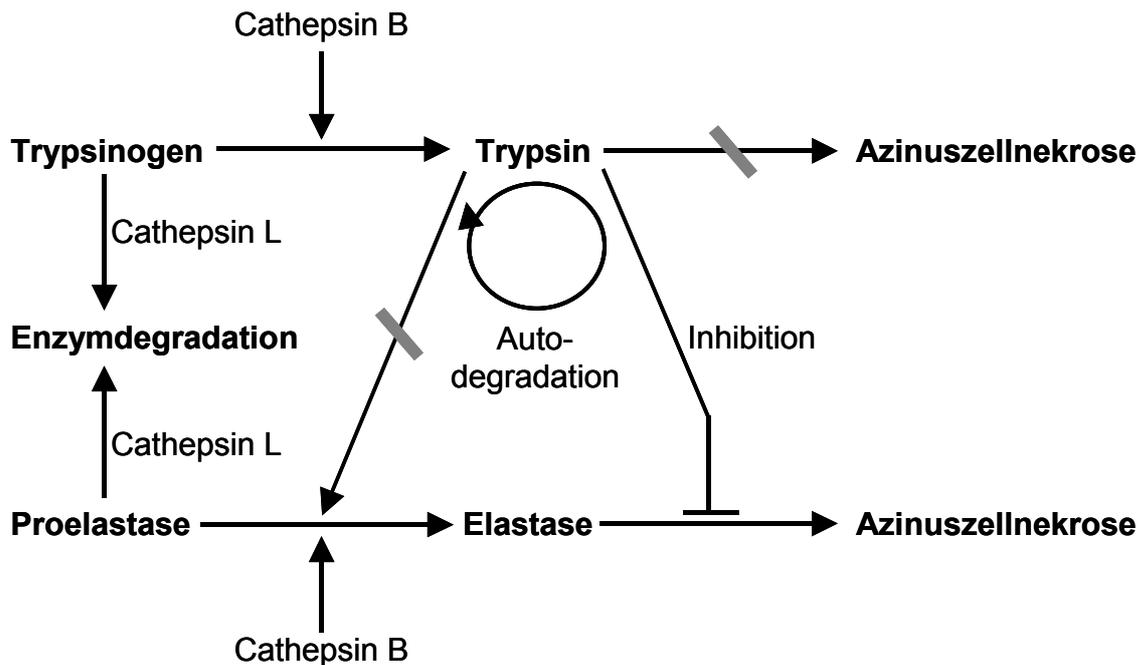
Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass Elastase im alkalischen Milieu bei pH 8 sehr stabil ist und bei pH-Werten von 4 wahrscheinlich aufgrund der Proteinhydrolyse im sauren pH-Bereich langsam an Aktivität verlor. Trypsin war unter diesen Bedingungen weit instabiler als Elastase und wurde ebenso nicht von Cathepsin B oder Elastase degradiert. Cathepsin L hingegen degradierte Trypsin ebenfalls sehr schnell.

Aus diesen *In-vitro*-Experimenten ergibt sich, dass Cathepsin B an der Zymogenaktivierung und Cathepsin L wesentlich am Abbau von Zymogenen und aktivierten Proteinase (Mason et al., 1985) in der Pankreatitis beteiligt ist.

Zur Klärung der Frage, ob die Ergebnisse der *In-vitro*-Versuche auch auf lebende Azinuszellen oder auf die Pankreatitis übertragbar sind, wurden aufgrund von für *In-vivo*-Bedingungen nicht verfügbaren spezifischen Inhibitoren Cathepsin B defiziente Mäuse (Halangk et al., 2000) eingesetzt.

Hierbei zeigte sich, dass die Elastaseaktivität in Azinuszellen aus Knock-Out-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe um 50 % reduziert war und somit Cathepsin B zu einem wesentlichen Teil für die Aktivierung von Proelastase verantwortlich ist. Die CCK-induzierte Nekrose in den Knock-out-Mausazini war nicht erniedrigt. Jedoch konnte in der Caerulein-Pankreatitis dieser Tiere eine 50 % reduzierte Nekroserate verzeichnet werden.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass in Azinuszellen neben noch nicht charakterisierten Enzymen Cathepsin B wesentlich an der Aktivierung von Proelastase beteiligt ist. Durch diesen Aktivierungsprozeß ist Cathepsin B auch an der Azinuszellnekrose beteiligt oder übt möglicherweise einen direkten Einfluß auf diesem Mechanismus des Zelluntergangs aus.



Schema 6.1: Modell der differenziellen Proteinaseaktivierung und der Assoziation mit einer Azinuszellnekrose nach supramaximaler CCK-Stimulation

Trypsinogen und Proelastase werden in der Azinuszelle über Cathepsin B vermittelt aktiviert. Die Zymogene oder aktivierten Enzyme können durch Cathepsin L degradiert werden. Aktiviertes Trypsinogen unterliegt Außerdem der Eigendegradation und hat eine protektive Funktion auf die durch Proelastaseaktivierung oder einer anderen Zymogenaktivierung verursachte Entwicklung einer Zellnekrose.

6.5 Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3 werden in Azinuszellen unabhängig voneinander aktiviert

Die vorausgehenden Zymogenaktivierungsexperimente haben gezeigt, dass die Aktivierung von Serinproteinasen zum Zelluntergang durch Nekrose führen kann. Ein anderer Mechanismus, der ebenfalls zum Zelltod führt, ist die Apoptose (Stennicke und Salvesen, 1998; Grutter, 2000), bei deren Entwicklung es auch zu einer Aktivierung von Procaspasen (Cohen, 1997) kommt. Es wurde daher untersucht, ob diese Zymogenaktivierungsmechanismen unterschiedlicher Proteinase miteinander verkoppelt sind oder sich gegenseitig beeinflussen.

Die Zeitkinetik von DNA-Strangbrüchen in Azinuszellen zeigte zwei bis vier Stunden nach Induktion einer experimentellen Caerulein-Pankreatitis ein Maximum. Da DNA-Strangbrüche auf einer Degradation von DNA-Schutzenzymen (Kuida et al., 1996) durch die Aktivierung von Procaspase-3 (Stennicke et al., 1998; Porter und Jannicke,

1999) beruhen, wurde die Caspase-3-Aktivität gemessen. Zum Nachweis der Caspase-3-Aktivität wurde ein über intramolekulare Komplexierung gequenschnittes, peptidgekoppeltes Rhodamin eingesetzt (Packard et al., 1997). Dieses als PhiPhiLux bezeichnete Substrat ermöglichte als membrangängiges Substrat die fluorometrische Messung von Caspase-3-Aktivität in lebenden Zellen (Komoriya et al., 2000).

Die Anwendung des *In-vitro* charakterisierten Substrates zeigte in Kombination mit einem entsprechenden Trypsin- oder Elastasesubstrat, das CCK in supramaximal stimulierten Azinuszellen zu einem zellindividuellen Aktivierungsmuster aller drei Zymogene führte. Betrachtete man die mit Trypsin- oder Elastaseaktivität assoziierte Proaspase-3-Aktivierung, so war diese im Vergleich zur Procaspase-3-Aktivierung ohne Aktivierung von Verdauungsproteinasen nicht reduziert.

Zur Bestätigung der Beobachtung wurden Inhibitorassays an Zellsuspensionen durchgeführt. Die spezifische Caspase-3-Inhibition durch DEVD-CHO hatte keinen Einfluß auf die Trypsinogen- oder Proelastaseaktivierung, noch auf deren Aktivität. Ein entsprechendes Ergebnis fand sich auch nach der spezifischen Inhibierung von Trypsin mit S124 oder Elastase mit VPV-01.

Somit werden die Zymogene Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3 unabhängig voneinander aktiviert. Experimente mit zVAD-FMK, einem Breitbandinhibitor für Pancaspasen konnten jedoch zeigen, dass die Trypsinaktivität in Gegenwart dieses Inhibitors anstieg (Gukovskaya et al., 2002). Dieses Resultat muß kritisch betrachtet werden, da nach meinen Untersuchungen zVAD-FMK nur zu einer teilweisen Reduktion der Caspase-3-Aktivität in Azinuszellen führt (Daten nicht gezeigt). Ergänzend wurde gezeigt, dass zVAD-FMK die Freisetzung von Laktatdehydrogenase senkt, was von den Autoren als Maß für den Zelltod durch Nekrose angesehen wird. Inhibierte man Caspase-3 spezifisch durch DEVD-CHO, so hatte das keine Auswirkungen auf die durch Propidiumioddinklusion detektierte Azinuszellnekrose.

Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass weder die Aktivierung der Zymogene Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3, noch die Aktivität dieser Enzyme sich gegenseitig beeinflusst. Weiterhin ist die durch Serinproteinasenaktivierung induzierte Azinuszellnekrose von der Procaspase-3 – Aktivierung entkoppelt.

6.6 Cathepsin B und L vermitteln die Aktivierung von Procaspase-3 in Azini

Die vorgestellten Ergebnisse deuten auf einen unabhängigen Aktivierungsmechanismus von den Serinproteinasen Trypsinogen und Proelastase, sowie der Procaspase-3 hin. Der Stand der Literatur legt nahe, dass die Procaspasenaktivierung ein kaskadenartiger Prozess ist, der über Effektorcaspasen, wie im Falle von Procaspase-3 über Caspase-8 erfolgt (Stennicke et al., 1998). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass es aber auch einen Effektorcaspasen unabhängigen Weg (Ishisaka et al., 1998; 2001) der Aktivierung gibt in dem lysosomale Proteine, wie die Gruppe der Cathepsine involviert sind. Da diese wie aus bisherigen Publikationen (Halangk et al., 2000) und in dieser Arbeit gezeigt auch an der Aktivierung sekretorischer Zymogene beteiligt sind, wurde deren Einfluß auf die Procaspase-3-Aktivierung untersucht.

Nachdem man Azinuszellsuspensionen in Gegenwart des Cathepsininhibitors E64d mit CCK stimulierte, reduzierte sich die Caspase-3-Aktivität im Vergleich zu Kontrollzellen um 50 %. Man kann also davon ausgehen, dass Cathepsine auch in dem Procaspase-3-Aktivierungsprozess des Pankreasazinuszelle beteiligt sind.

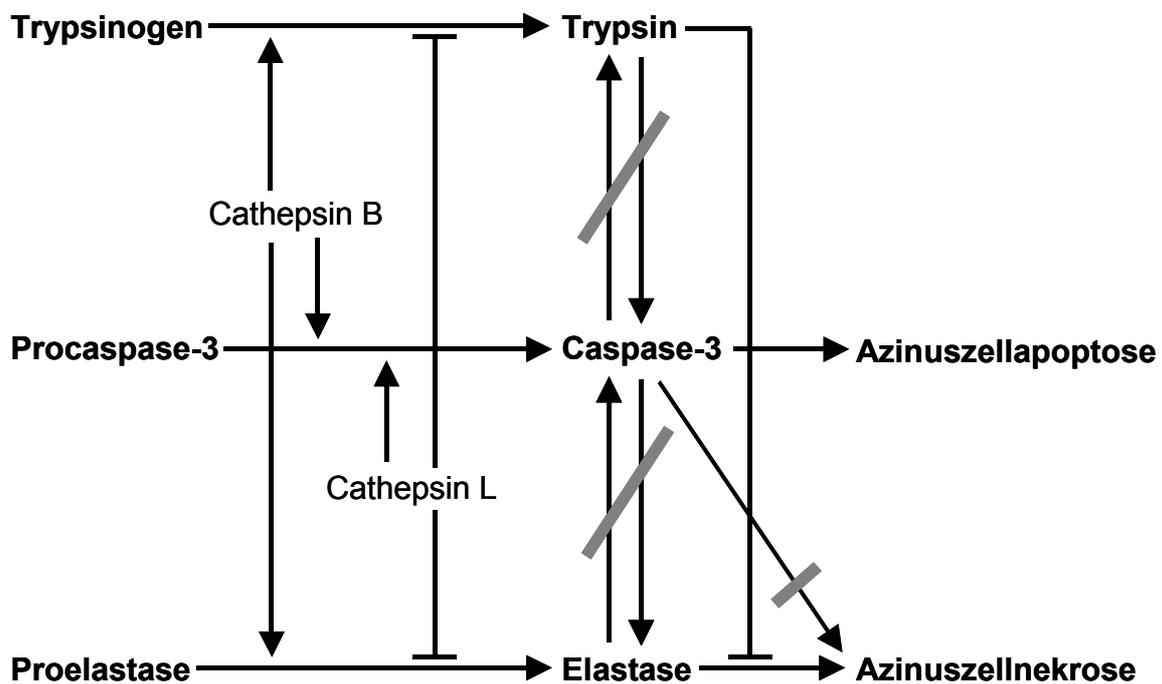
In anderen Organen identifizierte man als Procaspase-3 aktivierende Kandidaten das Cathepsin B (Foghsgaard et al., 2001; Guicciardi et al., 2001) oder das Cathepsin L (Ishisaka et al., 1999). Ein direkter Aktivierungsprozeß konnte über *In-vitro*-Experimente nicht belegt werden (Stoka et al., 2001). Die Ergebnisse der Experimente mussten jedoch kritisch betrachtet werden, da die Aktivierungsassays bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt wurden. Unter diesen Bedingungen weisen Cathepsin B und L keine katalytische Aktivität auf. Wir wissen, dass es in der Pankreatitis zu einer Umverteilung von lysosomalen Proteinen in das sekretorische Kompartiment kommt und pH-Verschiebungen stattfinden. Man kann daher annehmen, dass es in der Pankreatitis möglicherweise auch zu einer Kolo-kalisation von Caspasen und Cathepsinen unter lysosomalen pH-Wert-Bedingungen kommen könnte und somit, wie bei den Proelastaseaktivierungsassays gewählte pH-Wert von 4 für Untersuchungen von cathepsin induzierten Aktivierungen sinnvoll wäre.

Die Inkubation von Immunpräzipitierter Procaspase-3 aus einem Pankreashomogenat mit Cathepsin B und L konnte jedoch auch unter den obengenannten Pufferbedingungen keine cathepsinvermittelte Procaspase-3-Aktivierung nachweisen. Dem steht jedoch gegenüber, dass die zelluläre Caspase-3-

Aktivität in Cathepsin B oder L defizienten Mausazini im Vergleich zu den Wildtypzellen um 50 % reduziert ist.

Man kann deshalb annehmen, dass in Azinuszellen neben einer Effektorcaspasen vermittelten Aktivierung noch ein cathepsinvermittelter Procaspase-3-Aktivierungsprozess stattfindet. Katunuma et al. (2001) konnten in Leberzellen einen Mechanismus identifizieren bei dem Cathepsin L eine Pro-Lysoapoptase aktiviert, die nachfolgend Procaspase-3 aktiviert.

Ergänzend kann gefolgert werden, dass die Aktivierung von sekretorischen Zymogenen, wie Trypsinogen und Proelastase mit der von Procaspase-3 nicht direkt, sondern über das Cathepsin B als gemeinsamen Aktivator miteinander verkoppelt ist. Dem Cathepsin L kann hierbei eine bivalente Funktion zugeordnet werden, indem es Trypsin und Elastase degradiert und Procaspase-3 aktiviert. Es könnte daher eine Schlüsselrolle einnehmen, in welche Richtung der Zelltod verlaufen soll oder wie hoch der Anteil an Nekrose oder Apoptose in der Azinuszelle ist.



Schema 6.2: Modell der differenziellen Zymogenaktivierung und deren Assoziation mit einer Nekrose oder Apoptose in supramaximal CCK-stimulierten Azinuszellen

Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3 werden in der Azinuszelle durch Cathepsin B aktiviert. Cathepsin L aktiviert Procaspase-3, jedoch nicht Trypsinogen oder Proelastase. Die aktiven Enzyme beeinflussen sich nicht gegenseitig. Die durch Proelastaseaktivierung oder einer anderen Serinproteinaseaktivierung verursachte Zellnekrose wird durch Trypsin gehemmt. Caspase-3 hat keinen Einfluss auf die Nekrose, führt aber zu apoptotischen Prozessen.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte im Modellsystem der Pankreatitis mit supramaximal stimulierten Azinuszellen und unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren gezeigt werden, dass die Zymogene Trypsinogen und Proelastase in unterschiedlichen Zellen und unabhängig voneinander im sekretorischen Kompartiment aktiviert werden. Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass die Hypothese einer Zymogenaktivierungskaskade mit Trypsin als Startpunkt in der Pankreatitis auf Trypsin und Elastase nicht zutrifft.

In-vitro-Aktivierungsexperimente zeigten, dass Proelastase durch Cathepsin B aktivierbar ist. Dieses Aktivierungspotential konnte in Messungen mit Azinuszellen aus Cathepsin B-defizienten Tieren bestätigt werden. Außerdem belegten *In-vitro*-Versuche, dass Cathepsin L keine aktivierende, sondern ein Trypsin und Elastase degradierende Proteinase ist.

Die Annahme, die die Trypsinogenaktivierung in einem direktem Zusammenhang mit der Zellschädigung in der Pankreatitis brachte, muß jetzt als obsolet angesehen werden, da die Trypsinogenaktivierung nicht im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Nekrose steht. Stattdessen konnte Trypsin auf Einzelzellebene eine protektive Funktion auf die durch Aktivierung von Proelastase assoziierten Nekrose nachgewiesen werden. Messungen mit einem Serinproteinaseninhibitor zeigten außerdem, dass neben Elastase noch andere nicht näher charakterisierte Peptidasen zur Entwicklung einer Azinuszellnekrose beitragen.

Die Untersuchungen, inwieweit die Zelluntergangsmechanismen Apoptose und Nekrose miteinander gekoppelt sind, haben gezeigt, dass die hierbei beteiligten Zymogene Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3 unabhängig voneinander aktiviert werden. Die Enzyme beeinflussten sich außerdem nicht in ihrer Aktivität.

Weiterhin konnte an Azinuszellen aus Knock-Out-Tieren gezeigt werden, dass Cathepsin B an der Aktivierung von Procaspase-3 beteiligt ist. Somit sind die Zymogenaktivierungen von Trypsinogen, Proelastase und Procaspase-3 nicht direkt miteinander sondern über den gemeinsamen Aktivator Cathepsin B verkoppelt. Cathepsin L konnte ebenfalls auf Knock-out-Experimente gestützt ein Procaspase-3-Aktivierungspotential zugeordnet werden.

Die spezifische Inhibition von Caspase-3 zeigte, dass dieses Enzym in Azinuszellen nicht die Entwicklung einer Zellnekrose beeinflusst. Somit wird die Nekrose ausschließlich über Serinproteinasen vermittelt.

8. Literaturverzeichnis

Adler G, Beglinger C, Braun U, Reinshagen M, Koop I, Schafmayer A, Rovati L, Arnold R. (1991) Interaction of the cholinergic system and cholecystokinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* **100**:537-543.

Adler G, Hupp T, Kern HF. (1979) Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat. *Virchows Archiv Pathol Anat Histol* **382**: 31-47.

Adler G, Nelson DK, Katschinski M, Beglinger C. (1995) Neurohormonal control of human pancreatic exocrine secretion. *Pancreas* **10**: 1-13.

Aiba-Masago S, Masago R, Vela-Roch N, Talal N, Dang H. (2001) Fas-mediated apoptosis in a rat acinar cell line is dependent on caspase-1 activity. *Cell signal* **13**: 617-624.

Appelros S, Thim L, Borgstorm A. (1998) Activation peptide of carboxypeptidase B in serum and urine in acute pancreatitis. *Gut* **42**:97-102.

Bialek R, Willemer S, Arnold R, Adler G. (1991) Evidence of intracellular activation of serine proteases in acute Caerulein-induced pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* **26**:190-196.

Bieth JG. (1978) Elastases: structure, function and pathological role. In: *Frontiers of Matrix Biology*, vol. 6 (Robert L, Collin-Lapinet GM, Bieth JG, eds). Basel: Karger: 1-82.

Bode W, Schwager P. (1975) The refined crystal structure of bovine β -trypsin at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **98**: 693-717.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Büchler M, Malfertheiner P, Uhl W, Schölmerich J, Stockmann F, Adler G. (1993) Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German Pancreatitis Study Group. *Gastroenterology* **104**: 1165-70.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 269-290.

Carter K J, Rutledge PL., Steer ML, Silen W. (1987) Secretagogue-induced changes in intracellular pH and amylase release in mouse pancreatic acini. *Am J Physiol* **253**:G690-696.

Cavallini G, Tittobello A, Frulloni L, Masci E, Mariana A, Di Francesco V. (1996) Gabexate for the prevention of pancreatic damage related to endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *N Engl J Med* **335**:919-923.

Chiari H. Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. (1896) *Z Heilk* **17**:69-96.

Cohen GM. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326**: 1-16.

Colomb E, Figarella C. (1979) Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochim Biophys Acta* **571**:343-51.

Colomb E, Figarella C, Guy O. (1979) The two human trypsinogens. Evidence of complex formation with basic pancreatic trypsin inhibitor-proteolytic activity. *Biochim Biophys Acta* **570**: 397-405.

Crompton M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341**: 233-249.

Cygler M, Sivaraman J, Grochulski P, Coulombe R, Storer AC, Mort JS. (1996) Structure of rat procathepsin B. Modell for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure* **4**: 405-416.

Deis I. (1995) Dissertation. Universität Bonn.

Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P. (2001) Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* **58**: 356-370.

Deussing J, Roth W, Saftig P, Peters C, Ploegh HL, Villadangos JA. (1998) Cathepsin B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 4516-4521.

Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett A. (1988) Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens: activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen-1. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**:293-298.

Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jäättelä M. (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**: 999-1009.

Foulis AK. (1980) Histological evidence of initiating factors in acute necrotizing pancreatitis in man. *J Clin Path* **33**:1125-1131.

Fujimoto K, Hosotani R, Doi R, Wada M, Lee JU, Koshihara T, Miyamoto R, Imamura M. (1997) Role of neutrophils in Caerulein-induced pancreatitis in rats: possible involvement of apoptosis. *Digestion* **58**: 421-430.

Gorelick FS., Modlin IM, Leach SD, Carangelo R, Katz M. (1992) Intracellular proteolysis of pancreatic zymogens. *Yale J Biol Med* **65**: 407-420.

Gorelick F, Matovcik L. (1995) Lysosomal enzymes and pancreatitis. *Gastroenterology* **109**:620-625.

- Gorry MC , Gabbaizedeh D, Furey W, Gates LK, Preston RA, Aston CE. (1997) Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **113**:1063-1068.
- Graf L, Craik CS, Patthy A, Roczniak S, Fletterick RJ, Rutter WJ. (1987) Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-89 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry* **26**: 2616-2623.
- Grant NH, Robbins KC. (1956) Occurrence and activation of an elastase precursor in pancreas. *J Am Chem Soc* **78**: 264-265.
- Greenbaum LA, Hirshkowitz A. (1961) Endogenous cathepsin activities trypsinogen in extracts of dog pancreas. *Proc Soc Exp Biol Med* **107**:74-76.
- Grosfils K, Metioui M, Tiouli M, Dehaye JP. (1993) Isolation of rat pancreatic acini with collagenase and permeabilisation of these acini with streptolysin O. *res commun Chem Pathol Pharmacol* **79**: 99-115.
- Grutter MG. (2000) Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 649-655.
- Gudgeon AM, Heath DI, Hurley P, Jehanli A, Patel G, Wilson C. (1990) Trypsinogen activation peptides assay in the early prediction of severity of acute pancreatitis. *Lancet* **335**: 4-8.
- Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Gores GJ. (2001) Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor- α -mediated hepatocyte apoptosis and liver injury. *Am J Pathol* **159**: 2045-2054.
- Gukovskaya AS, Gukovsky I, Jung Y, Mouria M, Pandol SJ. (2002) Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **277**: 22595-22604.

- Gukovskaya AS, Vaquero E, Zaninovic V, Gorelick FS, Lulis AJ, Brennan ML, Holland S, Pandol SJ. (2002) Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* **122**:974-84.
- Hakansson HO, Borgström A, Ohlsson K. (1991) Porcine pancreatic cationic proelastase *Biol Chem Hoppe-Seyler* **372**: 465-472.
- Halangk W, Stürzebecher J, Matthias R, Schulz HU, Lippert H. (1997) Trypsinogen activation in rat pancreatic acinar cells hyperstimulated by caerulein. *Biochim Biophys acta* **1362**: 243-251.
- Halangk W., Lerch M.M., Brandt-Nedelev B., Roth W., Ruthenbuerger M., Reinheckel T., Perters C. (2000) Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* **106**:773-781.
- Halangk W, Krüger B, Ruthenbürger M, Stürzebecher J, Albrecht E, Lippert H. (2002) Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**:G367-74.
- Higaki JN, Light A. (1985) The identification of neotrypsinogens in samples of bovine trypsinogen. *Anal Biochem* **148**: 111-120.
- Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, Frossard JL, Adler G, Steer ML. (1998) Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol* **275** :G352-62.
- Hurley PR., Cook A, Jehanli A, Austen BM, Hermon-Taylor J. (1988) Development of radioimmunoassays for free tetra-L-aspartyl-L-lysine trypsinogen activation peptides (TAP). *J Immunol Methods* **111**: 195-203.
- Ishisaka R, Utsumi T, Kanno T, Arita K, Katunuma N, Akiyama J, Utsumi K. (1999) Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3. *Cell Struct funct* **24**: 465-470.

- Ishisaka R, Kanno T, Arita K, Akiyama J, Yoshioka T, Utsumi K, Utsumi T. (2001) Activation of caspase-3 by lysosomal cysteine proteases and its role in 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem J* **129**: 35-41.
- Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. (1995) Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* **269** (Cell Physiol **38**): C1295-C1304.
- Kassell B, Kay J. (1973) Zymogens of proteolytic enzymes. *Science* **180**: 1022-1027.
- Katunuma N, Matsui A, Le QT, Utsumi K, Salvesen G. (2001) Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis. *Advan Enzyme Regul* **41**: 237-250.
- Kawabata S, Miura T, Morita T, Kato H, Fujikawa K, Iwanaga S, Takada K, Kimura T, Sakakibara S. (1988) Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. *Eur j Biochem* **172**: 17-25.
- Kärgel HJ, Dettmer R, Etzold G, Kirschke H, Bohley P, Langner J. (1980) Action of cathepsin L on the oxidized B-chain of bovine insulin. *FEBS Lett* **114**: 257-260.
- Kärgel HJ, Dettmer R, Etzold G, Kirschke H, Bohley P, Langner J. (1981) Action of rat liver cathepsin L on glucagon. *Acta Biol Med Germ* **40**: 1139-1143.
- Kim KY, Lim HK, Lee KJ, Park DH, Kang KW, Chung SI, Jung KH. (2000) Production and characterisation of recombinant guamerin, an elastase-specific inhibitor, in the methylotrophic yeast *pichia pastoris*. *Protein Expression Purif* **20**: 1-9.
- Klonowski-Stumpe H, Luthen R, Han B, Sata N, Haussinger D, Niederau C. (1998) Inhibition of cathepsin B does not affect the intracellular activation of trypsinogen by Caerulein hyperstimulation in isolated rat pancreatic acinar cells. *Pancreas* **16**: 96-101.

Kloppel G, Dreyer T, Willemer S, Kern HF, Adler G. (1986) Human acute pancreatitis: its pathogenesis in the light of immunocytochemical and ultrastructural findings in acinar cells. *Virchows Arch A* **409**:791-803.

Komoriya BA, Packard BZ, Brown MJ, Wu ML, Henkart PA. (2000) Assessment of caspase activities in intact apoptotic thymocytes using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *J Exp Med* **191**: 1819-1828.

Kornmann M, Ishiwata T, Maruyama H, Beger HG, Korc M. (2000) Coexpression of FAS and FAS-ligand in chronic pancreatitis: correlation with apoptosis. *Pancreas* **20**: 123-128.

Kossaikoff AA, Spencer SA. (1981) Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: Neutron structure of trypsin. *Biochemistry* **20**: 6462-6474.

Kraut J. (1977) Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis. *Ann Rev Biochem* **46**: 331-358.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**: 619-642.

Krüger B., Albrecht E. and Lerch M. M. (2000) The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathol* **157**:43-50.

Krüger B, Lerch MM., Tessenow W. (1998) Direct detection of premature proteases activation in living pancreatic acinar cells. *Lab. Invest.* **78**:763-764.

Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* **384**: 368-372.

Kukor Z, Mayerle J, Kruger B, Toth M, Steed PM, Halangk W. (2002) Presence of cathepsin B in the human pancreatic secretory pathway and its role in trypsinogen activation during hereditary pancreatitis. *J Biol Chem* **277**:21389-2139.

Kunitz M, Northrop JH. (1935) Crystalline chymotrypsin and chymotrypsinogen. I. Isolation, crystallisation, and general properties of a new proteolytic enzyme and its precursor. *J Gen Physiol* **78**: 433-453.

Kühne WF. (1876) Über die Verdauung der Eiweissstoffe durch den Pankreassaft. *Virchows Arch* **39**: 130 (reproduced by Gutfreund H. (1976) *FEBS Lett* **62** (supl): E1-E12.

Laemly UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lampel M, Kern HF. (1977) Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch* **373**: 97-117.

Lamy F, Tauber S. (1963) Studies on elastase and elastin. *J Biol Chem* **238**: 939-944.

Lasson A. and Ohlsson K. (1984) Protease inhibitors in acute pancreatitis: correlation between biochemical changes and clinical course. *Scand J Gastroenterol* **19**:779-786.

Le Marechal C, Chen JM., Quere I, Raguene O, Ferec C, Auroux J. (2001) Discrimination of three mutational events that result in a disruption of the R122 primary autolysis site of the human cationic trypsinogen (PRSS1) by denaturing high performance liquid chromatography. *BMC Genet* **2**:19.

Lemmon MA, Schlessinger J. (1995) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerisation. *Trends Biochem Sci* **19**: 459-464.

Leach SD, Modlin IM, Scheele GA, Gorelick FS. (1991) Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin. *J Clin Invest* **87**:362-366.

Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, Ramarao P, Saluja M, Steer ML. (1992) Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology* **103**:205-213.

Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, Saluja M, Steer ML. (1993) The effect of chloroquine administration on two experimental models of acute pancreatitis. *Gastroenterology* **104**:1768-1779.

Leytus SP, Patterson WL, Mangel WF. (1983) New class of sensitive and selective fluorogenic substrates for serine proteinases. *Biochem J* **215**: 253-260.

Leytus SP, Melhado LL, Mangel WF. (1983) Rhodamine-based compounds as fluorogenic substrates for serine proteinases. *Biochem J* **209**: 299-307.

Li Y, Owyang C. (1994) Endogenous cholecystokinin stimulates pancreatic enzyme secretion via vagal afferent pathway in rats. *Gastroenterology* **107**: 525-531.

Lipperheide C. (1982) Dissertation, Universität Bonn.

Luthen R, Niederau C, Grendell JH. (1995) Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats. *Am J Physiol* **268**:G592-G604.

Mach L, Mort JS, Glössel J. (1994) Maturation of human cathepsin 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.

Manabe T, Hirano T, Imanishi K, Ando K, Yotsumoto F, Tobe T. (1992) Protective effect of nafamostat mesilate on cellular and lysosomal fragility of acinar cells in rat Caerulein pancreatitis. *Int j Pancreatol* **12**: 167-172.

Maroux S, Baratti J, Desnuelle P. (1971) Purification and specificity of porcine enterokinase. *J Biol Chem* **246**: 5031-5039.

Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Leonardo Mj. (1998) Membrane oligomerisation and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACH α 1) death signal. *J Biol Chem* **273**: 4345-4349.

Mason RW, Taylor MAJ, Etherington DJ. (1984) The purification and properties of cathepsin L from rabbit liver. *Biochem j* **217**: 209-217.

Mayerle J, Lerch MM. (2001) Krankheitsverlauf bei akuter Pankreatitis. *Dt Ges Chir (kongressband)*: 296-300.

Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Rattner D, Warshaw AL. (1998) Subcellular kinetic of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis. *Am J Physiol* **274**: G71-G79.

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**: 2926-2930.

Neoptolemos JP, Kemppainen EA, Mayer JM, Fitzpatrick JM, Raraty MG, Slavin J. (2000) A multicentre study of early prediction of severity in acute pancreatitis by urinary trypsinogen activation peptide. *Lancet* **355**:1955-1960.

Neurath H, Zwillig R. (1986) Willi Kühne und die Anfänge der Enzymologie. In: *Semper Apertus*. Berlin: Springer-Verlag: 361-374.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43.

Niederau C, Grendell JH. (1988) Intracellular vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment. *J Clin Invest* **81**: 229-236.

Niederau C, Grendell J. H. (1988) Intracellular vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment. *J Clin Invest* **81**: 229-236.

Northrop JH, Kunitz M, Herriott RM. (1939) *Crystalline Enzymes*. New York: Columbia University Press.

Orci L, Ravazzola M, Anderson R. (1987) The condensing vacuole of exocrine cells is more acidic than the mature secretory vesicle. *Nature* **326**: 77-79.

Otto K, Schepers P. (1967) Über die katheptische Inaktivierung einiger Enzyme der Rattenleber, insbesondere der Glucokinase. *Hoppe Seyler Z Physiol Chem* **348**: 482-490.

Otto K. (1971) Cathepsins B1 and B2. In: *Tissue Proteinases* (Barret AJ, Dingle JT., eds.), North-Holland Publishing Co., Amsterdam: 1-25.

Owyang C. (1993) Neurohormonal control of the exocrine pancreas. *Curr Opin Gastroenterol* **9**: 747-751.

Packard BZ, Toptygin DD, Komoriyama A, Brand L. (1997) Design of profluorescent protease substrates guided by excitation theory. *Methods Enzymol* **278**: 15-23.

Palade EG. (1975) Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* **189**: 347-358.

Patthy L. (1990) Evolutionary assembly of blood coagulation proteins. *Semin Thromb Hemost* **16**: 245-259.

Perona JJ, Craik CS. (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci* **4**: 337-360.

Pfützer RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J. (2000) SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **119**:615-623.

Pfutzer R, Myers E, Applebaum-Shapiro S, Finch R, Ellis I, Neoptolemos. (2002) Novel cationic trypsinogen (PRSS1) N29T and R122C mutations cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut*. **50**:271-2.

Porter G, Janicke RU. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**: 99-104.

Rau B, Baumgart K, Paszkowski AS, Mayer JM, Berger HG. (2001) Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: High correlation of serum interleukin-18 with pancreatic necrosis and systemic complications. *Crit Care Med* **29**: 1556-1562.

Ramadani M, Yang Y, Gansauge F, Gansauge S, Beger HG. (2001) Overexpression of caspase-1 (interleukin-1 β converting enzyme) in chronic pancreatitis and its participation in apoptosis and proliferation. *Pancreas* **22**: 383-387.

Ramjee MK, Henderson IMJ, McLoughlin SB, Padova A. (2000) The kinetic and structural characterisation of the reaction of nafamstat with bovine pancreatic trypsin. *Thromb Res* **98**: 559-569.

Reinheckel T, Deussing J, Roth W, Peters C. (2001) Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: Phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem* **382**: 735-741.

Rinderknecht H. (1986) Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci* **31**: 314-321.

Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauley-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, von Figura K, Paus R, Peters C. (2000) Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* **14**: 2075-2086.

Rothe G, Klingel S, Assflag-Machleidt I, Machleidt W, Zirkelbach C, Banati RB, Mangel W, Valet G. (1992) Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**: 547-554.

Rowan AD, Mason P, Mach I, Mort JS. (1992) Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form *In vitro*. *J Biol Chem* **267**: 15993-15999.

Rowan AD, Feng R, Konishi Y, Mort JS. (1993) Demonstration by electrospray mass spectrometry that the peptidyl dipeptidase activity of cathepsin B is capable of rat cathepsin B C-terminal processing. *Biochem J* **294**: 923-927.

Ruthernbürger M, Krüger B, Halangk W, Lerch MM. (2001) Intracellular trypsinogen activation is not involved in acinar cell necrosis but may have a protective role. *Pancreatology* **1**:176-177.

Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, Pandol SJ, Poucell-Hatton S. (1996) The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediated experimental pancreatitis. *Gastroenterology* **111**: 1081-1091.

Sahin-Tóth M, Tóth M. (2000) Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* **278**:286-289.

Sahin-Tóth M. (2000) Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *J Biol Chem* **275**:22750-22755.

Saluja AK, Saluja M, Printz H, Zaverčnik A, Sengupta A, Steer M. (1989) Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proc Nat Acad Sci USA* **86**: 8968-8971.

Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, Powers RE, Meldolesi J, Steer ML. (1987) Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *Am J Physiol* **253**: G508-G516.

Saluja AK, Donovan EA, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Hofbauer B, Steer ML. (1997) Caerulein-induced In vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology* **113**:304-310.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J* **17**: 1675-1687.

Schellenberger V, Braune K, Hofman HJ, Jakubke HD. (1991) The specificity of chymotrypsin. A statistical analysis of hydrolysis data. *Eur J Biochem* **199**: 623-636.

Steitz TA, Shulman RG. (1982) Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. *Ann Rev Biochem Biophys* **11**: 419-444.

Schmidt J, Fernandez-del Castillo C, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Warshaw AL. (1992) Trypsinogen-activation peptides in experimental rat pancreatitis: prognostic implications and histopathologic correlates. *Gastroenterology* **103**:1009-1016.

Simon P, Weiss FU, Zimmer KP, Rand S, Brinkmann B, Domschke W. (2002) Spontaneous and sporadic trypsinogen mutations in idiopathic pancreatitis. *JAMA* **288**:2122.

Simon P, Weiss FU, Sahin-Toth M, Parry M, Nayler O, Lenfers B. (2002) Hereditary pancreatitis caused by a novel PRSS1 mutation (Arg-122 --> Cys) that alters autoactivation and autodegradation of cationic trypsinogen. *J Biol Chem.* **277**:5404-5410.

Song M, Zaninovic V, Kim D, Gukovsky I, Gukovskaya A, Kang KW, Pandol S. (1999) Amelioration of rat Caerulein pancreatitis by guamerin-derived peptide, a novel elastase inhibitor. *Pancreas* **18**: 231-239.

Soudah HC, Lu Y, Hasler WL, Owyang C. (1992) Cholecystokinin at physiological level evokes pancreatic enzyme secretion via a cholinergic pathway. *Am J Physiol* **263**: G102-G107.

Steer ML, Meldolesi J. (1987) The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med* **316**: 144-50.

Steer ML, Saluja AK. (1993) Experimental acute pancreatitis: studies of the early events that lead to cell injury. In : *The pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*, pp 489-500, Go V.L.W., DiMagno E. P., Gardner J. D., Lebenthal E., Reber W.A. and Scheele G. A. (ed.) Raven Press, New York.

Stennicke HR, Jürgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby M, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed C, Froelich CJ, Salvesen GS. (1998) Procaspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* **273**: 27084-27090.

Stennicke HR, Salvesen GS. (1998) Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* **1387**: 17-31.

Stennicke HR, Salvesen GS. (1999) Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 299-306.

Stennicke HR, Renatus M, Meldal M, Salvesen GS. (2000) Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem J* **350**: 563-568.

Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze h, Abrahamson M, Brömme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS. (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 3149-3157.

Su SB, Motoo Y, Xie MJ, Sawabu N. (2001) Apoptosis in rat spontaneous chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* **46**: 166-175.

Szilagyi CM, Sarfati P, Pradayrol L, Morisset J. (1995) Purification, characterisation and substrate specificity of rat pancreatic elastase II. *Biochim Biophys Acta* **1251**: 55-65.

Teich N, Mössner J, Keim V. (1998) Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis. *Hum Mutat* **12**:39-43.

Teich N, Ockenga J, Hoffmeister A, Manns M, Mossner J, Keim V. (2000) Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. *Gastroenterology* **119**:461-465.

Threadgold J, Greenhalf W, Ellis I, Howes N, Lerch MM, Simon P. (2002) The N34S mutation of SPINK1 (PSTI) is associated with a familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease. *Gut* **50**:675-81.

Tooze J, Hollinshead M, Hensel G, Kern HF, Hoflack B. (1991) Regulated secretion of mature cathepsin B from rat exocrine pancreatic cells. *Eur J Cell Biol* **56**:187-200.

Turk D, Podobnik M, Kuhelj R, Dolinar M, Turk V. (1996) Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett* **384**: 211-214.

Tympner F, Rosch W. (1982) Effect of secretin and gabexate-mesilate (synthetic protease inhibitor) on serum amylase level after ERCP. *Z Gastroenterol* **20**:688-693.

Varallyay E, Pal G, Patthy A, Szilagyi L, Graf L. (1998) Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **243**:56-60.

Wallrapp C, Hähnel S, Müller-Pillasch F, Burghardt B, Iwamura T, Ruthenbürger M, Lerch MM, Adler G, Gress TM. (2000) A novel transmembrane serine protease is overexpressed in pancreatic cancer. *Cancer Research* **60**: 2602-2626.

Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD. (1996) Hereditary pancreatitis is caused by a mutation on the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* **14**:141-145.

Whitcomb DC. (1999) Genes means pancreatitis. *Gut* **44**:150.

Willemer S, Bialek R, Adler G. (1990) Localization of lysosomal and digestive enzymes in cytoplasmic vacuoles in caerulein-pancreatitis. *Histochemistry* **94**:161-170.

Williams JA, Korc M, Dormer RL. (1978) Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am J Physiol* **235**: 517-524.

Wisner JR, Ozawa S, Renner IG, (1989) The effects of nafamostat mesilate (FUT-175) on caerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol* **4**: 383-390.

Witt H, Luck W, Becker M. (1999) A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **117**:7-10.

Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U. (2000) Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* **25**:213-216.

Yamaguchi H, Kumura T, Mimura K. (1989) Activation of proteases in caerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* **4**: 565-571.

Yang X, Chang HY, Baltimore D. (1998) Autoproteolytic activation of Procaspases by oligomerisation. *Molecular Cell* **1**: 319-325

9. Eigene Publikationen

Originalarbeiten

Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T. (2000) Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* **106**:773-781.

Halangk W, Krüger B, Ruthenbürger M, Sturzebecher J, Albrecht E, Lippert H. (2002) Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**:G367-74.

Lerch MM, Krüger B, Ruthenbürger M, Halangk W. (2003) Serine protease activation in acute pancreatitis. In: *Controversies in Pancreatology*, pp 68-73, Permert J, Herrington M and Adrian TE. (ed.) Carlsson Communication, Stockholm.

Lerch MM, Krüger B, Ruthenbürger M, Halangk W, Sahin-Toth M. (2003) Cellular and molecular mechanisms involved in pancreatitis. *Cell Mol Life Sci*. In Press.

Wallrapp C, Hähnel S, Müller-Pillasch F, Burghardt B, Iwamura T, Ruthenbürger M, Lerch MM, Adler G, Gress TM. (2000) A novel transmembrane serine protease is overexpressed in pancreatic cancer. *Cancer Research* **60**: 2602-2626.

Abstracts

Ceyhan GO, Hlouschek V, Ruthenbürger M, Domschke W, Lerch MM. (2002) Magnesium reduces the premature activation of digestive proteases in acute experimental pancreatitis and in isolated pancreatic acinar cells. *Pancreatology* **2**:22.

Halangk W, Krüger B, Ruthenbürger M, Stürzebecher J, Lippert H, Lerch MM. (2001) Die Rolle von Trypsin für die Trypsinogenaktivierung und die Inaktivierung der Trypsinaktivität im Pankreas. *Z Gastroenterol* **39**:656.

Lerch MM, Peters C, Brandt-Nedelev B, Deussing J, Ruthenbürger M, Domschke W, Halangk W. (1999) Onset, course and outcome of acute experimental pancreatitis in cathepsin B deficient mice. *Gastroenterology* **116**:A 1144.

Lerch MM, Krüger B, Halangk W, Domschke W, Ruthenbürger M. (2000) Premature intracellular trypsinogen activation prevents necrosis of pancreatic acinar cells. *Cell. Mol Biol* **46**:136.

Ruthenbürger M, Halangk W, Peters C, Brandt-Nedelev B, Deussing J, Domschke W, Lerch MM. (1999) Die Rolle von Cathepsin B bei der Entwicklung der experimentellen akuten Pankreatitis. *Z Gastroenterol* **37**:876.

Ruthenbürger M, Krüger B, Halangk W, Lerch MM. (2000) Intracellular Pro-Elastase but not trypsinogen activation is associated with acinar cell injury. *Pancreas* **21**:474.

Ruthenbürger M, Krüger B, Halangk W, Lerch MM. (2001) Differenzielle Proteinase-Aktivierung und differenzierter Zelltod in Pankreasazini. *Med Klin* **96**:177-178.

Ruthenbürger M, Krüger B, Halangk W, Lerch MM. (2001) Intracellular trypsinogen activation is not involved in acinar cell necrosis but may have a protective role. *Pancreatology* **1**:176-177.

Ruthenbürger M, Mayerle J, Brandt-Nedelev B, Matthias R, Peters C, Halangk W, Lerch MM. (2003). CCK-induced pro-caspase-3 activation in acinar cells is independent of zymogen activation but mediated by lysosomal cathepsin B. *Pancreatology* **3**:264.

Ruthenbürger M, Krüger B, Halangk W, Ceyhan G, Domschke W, Lerch MM. (2001) Einfluß der differentiellen Trypsinogen und Pro-Elastase Aktivierung auf die Nekrose in Rattenpankreasazini. *Z Gastroenterol* **39**:660.

Wartmann T, Mayerle J, Ruthenbürger M, Lerch MM, Halangk W. (2003). Degradation of pancreatic digestive enzymes by cathepsin L. *Pancreatology* **3**:257.

10. Abkürzungen

| | |
|-------|---|
| A | Alanin |
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| AMC | 4-amino-methylcoumarin |
| BSA | “Bovine Serum Albumin” |
| CMAC | 7-amino-4-chloromethylcoumarin |
| C | Cystein |
| °C | Temperatur in Grad-Celsius |
| D | Asparaginsäure |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-phenylindol |
| DMEM | “Dulbeccos Modified Eagle Medium“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| E | Glutaminsäure |
| Ex | Excitation |
| Em | Emission |
| g | Erdbeschleunigung |
| h | Stunde |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure |
| Ile | Isoleucin |
| l | Liter |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| Lsg. | Lösung |
| M | Molar |
| μ | Mikro |
| m | Milli |
| min | Minuten |
| n | nano |

| | |
|---------|--|
| Na-EDTA | Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-acetat |
| OD | Optische Dichte (Extinktion) |
| Pro | Prolin |
| PBS | “Phosphat buffered saline“ |
| R110 | Rhodamin 110 |
| rpm | “Rounds per minute“ |
| Arg | Arginin |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| TAP | Trypsinogenaktivierungpeptid |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan |
| U | vom Hersteller definierte Einheit der Enzymaktivität |
| ü.N. | über Nacht |
| w/v | Verhältnis Masse/Volumen |
| v/v | Verhältnis Volumen/Volumen |

11. Lebenslauf

Manuel Ruthenbürger;

geboren am 14. Mai 1968 in Soest;

ledig;

Heinz Ruthenbürger, geboren am 9. November 1934,

Angela Ruthenbürger, geboren am 11. Januar 1938;

Schulbildung:

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| Grundschule: | von 1975 bis 1979 in Werl-Westönnen |
| Realschule: | von 1979 bis 1985 in Werl |
| Gymnasium: | von 1985 bis 1988 in Werl |

Hochschulreife (Abitur): am 8. Juni 1988 in Werl

Studium: Chemie;
Universität Bielefeld: von 1988-1996

Promotionsstudiengang: Beginn 2002 in Münster

Prüfungen: Diplom im Fach Chemie am 11. Februar 1997 der
Universität Bielefeld;

Tätigkeiten: Wissenschaftlicher Mitarbeiter von 1997 bis 1998 an der
Universität Bielefeld;

Beginn der Dissertation: August 1998, Institut für Biochemie, Betreuer Prof. Dr. rer.
nat. Karlheinz Klempnauer und Mitbetreuer Prof. Dr. med.
Markus M. Lerch.