

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Lippert)

**Charakterisierung einer inhibitor-insensitiven Trypsinaktivität
bei experimenteller Pankreatitis der Maus.**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Vorgelegt von Milada Butueva
aus Vladikavkaz

Magdeburg 2009

Dokumentationsblatt

Milada Butueva:

„Charakterisierung einer inhibitor-insensitiven Trypsinaktivität bei experimenteller Pankreatitis der Maus“, 2009. 88 Bl.: 23 Abb., 11 Tab.

Kurzreferat:

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine schwerwiegende Erkrankung des Pankreas, deren pathophysiologische Mechanismen auch bis heute noch nicht vollständig geklärt sind. Es ist bekannt, dass Proteasen für die Azinuszellschädigung mit verantwortlich sind. Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Pathogenese der frühen Stadien experimenteller Pankreatitis. Zur Untersuchung von initialen Vorgängen bei akuter Pankreatitis wurde die Caerulein-Hyperstimulation von NMRI-Mäusen benutzt. Es wurde festgestellt, dass der Hauptteil der Trypsinaktivität resistent gegen hohe Konzentrationen des proteinösen Inhibitors aus Sojabohnen (SBTI) ist. Sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus sind verschiedene Trypsinisoformen exprimiert. Ziel der Untersuchungen war es, zu prüfen, ob das Trypsin oder seine Modifikation diese inhibitor-insensitive Aktivität verursacht. Im Hinblick auf das Expressionsmuster der Maustrypsinogene schien es von besonderem Interesse zu klären, welche Trypsinisoform diese Aktivität hervor ruft. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Aufklärung der Eigenschaften der iiTA mittels Affinitätschromatographien, HPLC, Zymographien und Titrations gegen Trypsininhibitoren. Als Kontrolle dienten rekombinante Maustrypsine. Dabei stellen die Maustrypsine 4 und/oder 5 mögliche Kandidaten dar, welche die iiTA verursachen könnten. Die Expression von Maustrypsin 5 wurde bisher noch nicht eindeutig in vivo auf mRNA-Ebene oder als Protein nachgewiesen. Als mesotrypsin-ähnliche Isoform ist Trypsin 4 wahrscheinlich in der Lage, die iiTA hervorzurufen. Bei weiteren Forschungen sollte auf diese Isoform fokussiert werden. Die Eigenschaften des Enzyms können am rekombinant exprimierten Protein untersucht werden, wobei vor allem proteolytische Prozessierungen interessieren. Die pathobiologische Rolle bei AP wird letztendlich durch die Generierung einer transgenen Maus aufzuklären sein.

Schlüsselwörter

akute Pankreatitis, Azinuszellen, Caerulein, Hyperstimulationsmodell, inhibitor-insensitive Trypsinaktivität, NMRI-Maus, Proteasen, Trypsin, Trypsinogen

1 Einleitung	1
1.1 Die akute Pankreatitis	1
1.2 Physiologie des exokrinen Pankreas	3
1.3 Pathogenese akuter Pankreatitis	4
1.4 Experimentelle akute Pankreatitis	7
1.5 Die mögliche Rolle des Trypsins in der Pathogenese der akuten Pankreatitis	8
1.5.1 Humane Trypsin(ogen)-Isoformen	8
1.5.2 Humanes Mesotrypsin(ogen)	10
1.5.3 Extrapankreatisches Mesotrypsinogen und seine mögliche Rolle in der Aktivierung protease-aktivierter Rezeptoren (PAR)	10
1.5.4 Expressionspattern der Maustrypsinogene	11
1.6 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1. Verwendete Chemikalien und apparative Ausstattung	14
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2. Medien und Pufferlösungen	15
2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische Arbeiten	18
2.2 Tiermodell	20
2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung	20
2.2.2 Präparation und Inkubation pankreatischer Azini	20
2.2.3 In vitro Caerulein-Stimulation an isolierten Pankreasazini	22
2.2.4 Lichtmikroskopie	22
2.3 Proteinchemische Methoden	22
2.3.1 Präparation der Proteinextrakte aus Caerulein-behandelten Azini	22
2.3.2 Herstellung der Pankreashomogenate	22
2.3.3 Zymogengranula-Isolation aus Pankreas durch differentielle Zentrifugation	23
2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford	24
2.3.5 HPLC Analytik. Größenausschlusschromatographie an BioSep-SEC-S3000	24
2.3.6 Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von Trypsin, Trypsinogen und Chymotrypsinogen	24
2.3.7 Bestimmung der SBTI- und SPINK-Inhibitor-Resistenz muriner Trypsin-Isoenzyme	26
2.3.8 Bestimmung der endogenen Inhibitor Kapazität der Pankreashomogenate	26
2.4 Isolierung und Reinigung der Trypsin-Isoformen mittels Affinitätschromatographie	26

2.4.1	Benzamidin-Affinitätschromatographie	26
2.4.2	SBTI-Affinitätschromatographie	27
2.5	SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese	27
2.5.1	1D-SDS PAGE	28
2.5.2	2D-SDS PAGE	29
2.5.3	Auswertung der Elektropherogramme. Zymographie nach 1D- und 2D-SDS PAGE	30
2.5.4	Ultrafiltration	30
2.5.5	Coomassie-Färbung von Elektropherogrammen	31
2.5.6	Trocknung von Polyakrylamidgelen	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Untersuchungen zur Trypsinogenaktivierung im Pankreas und in isolierten pankreatischen Azini nach Caerulein-Hyperstimulation	32
3.2	Untersuchungen zur Bestimmung des Molekulargewichtes und des isoelektrischen Punktes der Trypsinaktivität aus Pankreashomogenaten	35
3.2.1	1D-SDS-PAGE und Zymographie	35
3.2.2	2D-SDS PAGE, Zymographie	37
3.3	Molekulargewichtsbestimmung mittels HPLC-Gelfiltration.	38
3.4	Untersuchungen zur Anreicherung der iiTA	40
3.4.1	Benzamidin-Affinitätschromatographie	41
3.4.2	SBTI-Agarose-Affinitätschromatographie	43
3.5	Untersuchungen zur Hemmbarkeit rekombinant exprimierter Trypsine der Maus	47
3.6	Untersuchungen zur Bestimmung der Rolle von freien intrazellulären Inhibitoren	49
3.6.1	Bestimmung der endogenen Inhibitorkapazität des Pankreashomogenats durch Hemmung von bovinen Trypsins	50
3.6.2	Interaktion von Maustrypsin 4 mit SPINK3 als mögliche Ursache für die Ausprägung der iiTA	51
3.7	Hemmbarkeit aktivierbarer endogener Trypsinogene aus ZG-angereicherten Fraktionen	54
4	Diskussion	56
4.1	Proteasenaktivierung als frühes Ereignis der akuten Pankreatitis und die pathophysiologische Rolle des Trypsins	56

4.2	Charakterisierung der frühen Trypsinogenaktivierung am Caerulein-Hyperstimulationsmodell der Maus	58
4.3	Methoden zum Nachweis der Trypsinaktivität	59
4.4	Die inhibitor-insensitive Trypsinaktivität (iiTA) als relevanter Faktor der frühen Zymogenaktivierung	60
4.4.1	Identifizierung der iiTA als Trypsinaktivität	60
4.4.2	Experimente zur Proteinanreicherung der iiTA	61
4.5	Expressionsmuster der Trypsinogen-Isoformen	61
4.6	Mögliche pathophysiologische Funktionen der iiTA	64
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	70
7	Anhang	78
7.1	Erklärung	78
7.2	Danksagung	79
7.3	Darstellung des Bildungsweges	80

Abkürzungsverzeichnis

AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AP	akute Pankreatitis
APS	Ammoniumpersulfat
Azini	Pankreasazini
ber. (calc.)	berechnet
Boc-QAR-AMC	N- <i>tert</i> -butoxycarbonyl-Glutamin-Alanin-Arginin-7-amino-4-methylcoumarin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA
CCK	Cholezystokinin
CDE	choline deficient ethionine supplemented
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	Homogenisationslösung
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IEF	isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
MG	Molekulargewicht
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
pH	potentia Hydrogenii
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SBTI	Soybean Trypsin Inhibitor, Soja-Bohnen-Trypsininhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	"Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis".
SPINK	Serinprotease-Inhibitor (KAZAL-Typ)
TAP	Trypsinogen activated peptide
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
UV/VIS	Ultraviolet-Visible-Spectroscopy

Die chemischen Elemente wurden mit den Symbolen des Periodensystems der Elemente abgekürzt. Die Aminosäuren wurden im Einzelbuchstaben-Code angegeben. Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini wie Spots, Dry Strips, SDS-PAGE usw. verwendet, deren Benutzung auch in der deutschsprachigen Fachliteratur etabliert ist.

1 Einleitung

1.1 Die akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis (AP) ist als eine akut auftretende, meist nicht infektiöse Entzündung der Bauchspeicheldrüse definiert. Ihre Inzidenz beträgt gegenwärtig 10-46 Fälle pro 100.000 Einwohner (Mayerle et al. 2003).

Die Häufigkeit der Pankreatitis variiert in verschiedenen Ländern und ist abhängig von solchen Faktoren wie Alkoholkonsum, Gallensteine, metabolische Einflussgrößen und Medikamentenkonsum. Unter den ätiologischen Faktoren dominieren Erkrankungen der Gallenwege (Gallensteine) und chronischer Alkoholabusus, die insgesamt mehr als 80% der Morbidität in den meisten westlichen Ländern verursachen. Für die Entstehung einer akuten Pankreatitis sind toxisch-metabolische, mechanische, vaskuläre und infektiöse Faktoren verantwortlich (Tabelle 1.1). Die Ursache bleibt in ca. 10-30% der Fälle jedoch unbekannt („idiopathische akute Pankreatitis“).

Tabelle 1.1: Ätiologie der akuten Pankreatitis (Büchler et al. 1996)

Toxische und metabolische Faktoren	
Alkohol	20 - 40 %
Hypertriglyzeridämie (endogen, exogen)	
Urämie, Hyperkalzämie (Hyperparathyreoidismus, exogen)	
Skorpiongift (Trinidad)	
Medikamente: sicher: Azathioprin, Sulfonamide, Thiazide, Furosemid, Pentamidin, DDI (Antiretrovirusmedikament), Tetracycline, Östrogene, L-Asparaginase, 6-Mercaptopurin, Methyldopa möglich: Chlorthalidon, Kortikosteroide, Etakrynsäure	
Vaskuläre Faktoren	
Zirkulationsstörungen (Herzchirurgie)	
Periarteriitis nodosa	
Embolus	
Hypothermie	
Maligne Hypertonie	
Mechanische Faktoren	
Gallensteine	50 - 60 %
Traumen (stumpfes Bauchtrauma, Operationen)	
ERCP	
Pankreastumor	
Duodenaldivertikel	
Infektionen	
Viren (Mumps, Coxsackie, Adenovirus)	

Mykoplasmen	
Würmer	
Idiopathische Pankreatitis	<i>10 - 30 %</i>

Der Begriff akute Pankreatitis beschreibt eine Vielzahl unterschiedlich ausgeprägter Entzündungen des exokrinen Pankreas, die sich hinsichtlich ihrer Ätiologie, Morphologie und im klinischen Bild unterscheiden. Während die Mortalität bei der ödematös-interstitiellen Pankreatitis unter 1% liegt, steigt sie bei der hämorrhagisch-nekrotisierenden Form auf 10 - 24% an (Mayerle et al. 2003).

Vor über einem Jahrhundert formulierte Chiari (1896) die Hypothese, dass die Pankreatitis Folge einer Selbstverdauung des Organs ist. Später wurde postuliert, dass eine übermäßige Trypsinaktivität im Pankreasparenchym mit konsekutiver Aktivierung anderer Enzyme für den Entzündungsprozess verantwortlich ist (Steer 1987).

Das klinische Bild ist bis zu 90% von heftigen gürtelförmigen und zum Rücken ausstrahlenden Oberbauchschmerzen geprägt. Bei der klinischen Untersuchung lassen sich die Schmerzen in 20% auch im linken phrenico-costalen Winkel (Mallet-Guy'sches Zeichen) oder am Rücken im linken costovertebralen Winkel (Mayo-Robson'sches Zeichen) lokalisieren. Übelkeit und Erbrechen sind mit Temperaturerhöhung, Tachykardie und Hypotonie verbunden. Im schlimmsten Fall kommt es zu einem hypovolämischen Schock durch den ausgeprägten Blutvolumenverlust und konsekutiv zu einem Multiorganversagen mit Hypoperfusion aller Organsysteme.

Das Abdomen ist palpatorisch meist nicht hart, sondern von gummiartiger Konsistenz („Gummibauch“) mit Abwehrspannung. Die Darmperistaltik ist reduziert. Ein klinisch frühes Zeichen hierfür ist das geblähte Abdomen der Patienten und der tympanische Klopfeschall über dem Colon transversum (Goblet-Guyot'sches Zeichen). Bräunlich-grüne Verfärbung der Haut vor allem im Nabelbereich (Cullen-Zeichen), in der Leiste (Fox-Zeichen) und in der Flankenregion (Grey-Turner-Zeichen) weisen auf eine subkutane Fettgewebs- und Pankreasnekrose hin, und kommt bei ca. 1-3% der Patienten mit einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis vor. Laborchemisch findet man eine Erhöhung der Pankreasenzyme Lipase und α -Amylase im Blut. Darüber hinaus, findet man häufig eine mittel- bis hochgradige Leukozytose, ein Abfall des Serumkalziums sowie eine Hyperglykämie. Morphologisch unterscheidet man zwischen zwei Verlaufsformen:

Milde interstitiell-ödematöse Form

Mit einer Häufigkeit von 75-80% (Ruthenbürger et al. 2006) ist sie die häufigste Verlaufsform. Kennzeichnend ist ein interstitielles Ödem, gefolgt von einer Infiltration von

Leukozyten aus Blutgefäßen. Fakultativ können Fettgewebsnekrosen auftreten. Diese Form nimmt in der Regel einen unkomplizierten Verlauf. Die Gesamletalität beträgt 0-1%. Sie führt zu einer Ausheilung, die meist als Restitutio ad integrum erfolgt.

Schwere hämorrhagisch-nekrotisierende Form

Mit einer Häufigkeit von 15-20% (Ruthenbürger et al. 2006) stellt sie die seltenere Verlaufsform dar. Man findet hier zusätzlich Parenchymnekrosen und Einblutungen in das Pankreasgewebe. Sie führt aber auch zu schweren extrapankreatischen Komplikationen (systemisches Multiorganversagen), die eine hohe Letalität (bis zu 30-50%) bedingen. Ein klinisch entscheidender Faktor für den Verlauf ist die Infektion der Nekrosen. Innerhalb von 6 Wochen kann es zur Ausbildung eines Pankreasabszesses oder zu einer postakuten Pankreaspseudozyste führen. Die Ausheilung erfolgt sowohl als Restitutio ad integrum, als auch Defektheilung.

1.2 Physiologie des exokrinen Pankreas

Zum Verständnis und für eine kausale Therapie der akuten Pankreatitis ist die detaillierte Kenntnis der Physiologie des exokrinen Pankreas unerlässlich. Die Funktion basiert auf zwei zellulären Komponenten, dem duktalem System, das Flüssigkeiten und Elektrolyte nach Sekretinstimulation freisetzt, und den Azinuszellen, die stimuliert durch Cholezystokinin (CCK) oder cholinerge Substanzen Verdauungsenzyme sezernieren (Steer, Meldolesi 1987). Beim Menschen werden die CCK-Effekte über neuronale Einflüsse vermittelt, wobei die CCK-Rezeptoren auf präsynaptischen cholinergen Neuronen lokalisiert sind (Owyang, Logsdon 2004). Das Pankreas produziert täglich 1 - 1,5 l Verdauungsekret, welches aus Wasser, Bikarbonat und ca. 20 verschiedenen Verdauungsenzymen besteht. Dabei weist es eine über 13-fach höhere Proteinsyntheserate als die Leber und das retikuloendotheliale System zusammen auf.

Hinsichtlich der potenziellen Schädigung exokriner Azinuszellen durch sezernierende Verdauungsenzyme, insbesondere gegenüber Proteasen, besitzt das Pankreas vielfältige Schutzmechanismen. Diese sind darauf gerichtet, deren vorzeitige intrazelluläre Aktivierung zu verhindern:

- 1 Sekretion der potenziell schädlichen Verdauungsenzyme als inaktive Vorstufen. Das Pankreas synthetisiert und sezerniert Trypsin als inaktives Trypsinogen. Erst im

Duodenum erfolgt die Umwandlung des Trypsinogens zu Trypsin durch Abspaltung des Aktivierungspeptides mit Hilfe des Enzyms Enteropeptidase (Enterokinase).

- 2 Kompartimentierung der Azinuszelle: Die Enzyme von der Synthese bis zu ihrer Sekretion sind durch membrangebundene Organellen, so genannte Zymogengranula, vom Zytoplasma der Azinuszellen getrennt. Außerdem liegt der pH-Wert der Zymogengranula im sauren Bereich weit unterhalb des pH-Optimums der meisten proteolytischen Enzyme.
- 3 Intrazelluläre Milieubedingungen: Eine niedrige intrapankreatische Kalziumkonzentration destabilisiert Trypsin und führt zur Autoinaktivierung.
- 4 Endogene Inhibitoren. Als zusätzliche Schutzmechanismen enthalten die Zymogengranula Trypsininhibitoren - PSTI (SPINK), die Spuren vorzeitig aktivierten Trypsins inaktivieren können. Gegebenfalls auftretendes extrazelluläres Trypsin kann durch Trypsininhibitoren des Serums, wie α 1-Antitrypsin und α 2-Makroglobulin, neutralisiert werden.
- 5 Proteolytische Inaktivierung. Eine kontrollierte Degradation der digestiven Enzyme durch lysosomale Enzyme, die Autodegradation von Trypsin bzw. durch Chymotrypsin C vermindert das proteolytische Potenzial.

1.3 Pathogenese akuter Pankreatitis

Obwohl die pathogenetischen Zusammenhänge in der frühen Phase der akuten Pankreatitis noch unzureichend verstanden werden, lassen sich die generellen Vorgänge und ihre zeitliche Abfolge beschreiben. Die Zusammenfassung wesentlicher Ereignisse ist in Abb. 1 dargestellt.

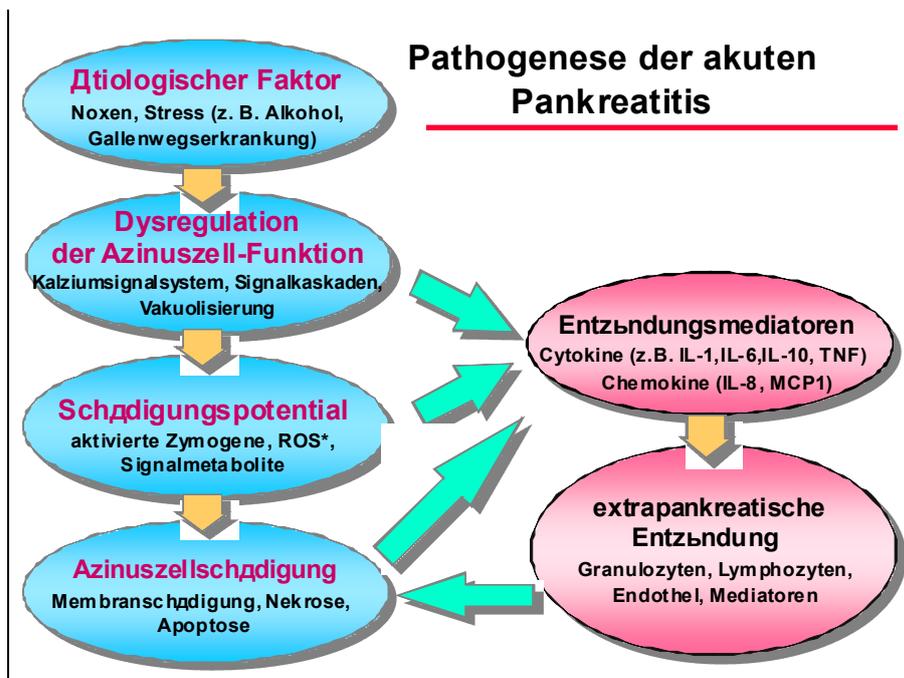


Abb.1: Intra- und extrapankreatische Ereignisse bei akuter Pankreatitis. Nach der Induktion einer AP initiieren die von der Azinuszelle (links) gebildeten Signalmetabolite extrapankreatische Entzündungsreaktionen (rechts). Diese Prozesse interagieren in verschiedenen Stadien der Erkrankung und bedingen die Verstärkung des pathologischen Prozesses (Halangk, Lerch, 2004).

***ROS** – Reaktive Oxygenradikale

In den letzten Jahren hat sich ein Konzept der Pathophysiologie akuter Pankreatitis etabliert, das drei wichtige Phänomene in der Frühphase der Erkrankung beinhaltet. Diese umfassen eine sekretorische Blockade, die frühzeitige intrazelluläre Trypsinogenaktivierung und die Bildung von Entzündungsmediatoren. Diese Daten beruhen vor allem auf Erkenntnissen des Caerulein-Hyperstimulationsmodells, sind aber auch bei anderen Formen der akuten Pankreatitis zu beobachten.

Sekretorische Blockade

Die normale apikale Sekretion des Granula-Inhaltes ist in der Frühphase der AP auf Grund einer gestörten Signaltransduktion blockiert. Eine Ursache ist die Zerstörung des Aktinzytoskeletts der Azinuszelle. Hierdurch wird die durch Exozytose vermittelte Translokation der Zymogene ins Pankreaslumen unterbrochen. Da trotz dieser Blockade Verdauungsenzyme weiterhin synthetisiert werden, kommt es zum Anstau der Zymogene in der Azinuszelle.

Frühzeitige intrazelluläre Trypsinogenaktivierung

Die Kolokalisationshypothese geht davon aus, dass nach sekretorischer Blockade die Aktivierung der Verdauungsenzyme durch lysosomale Hydrolasen, welche initial Trypsin nach Fusion der Zymogengranula mit Lysosomen aktivieren, erfolgt. Am Caerulein-Hyperstimulationsmodell der Maus konnte gezeigt werden, dass für die vorzeitige Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin, die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin B eine zentrale Rolle spielt (Hofbauer et al. 1998; Halangk et al. 2000). Allerdings wurde auch nach Ausschaltung von Cathepsin B in diesem Mausmodell die vorzeitige Aktivierung von Trypsinogen nicht vollständig gehemmt.

Bei sekretorischer Blockade ist die Kolokalisation von Verdauungsenzymen mit lysosomaler Hydrolase und anschließende Aktivierung der Zymogene charakteristisch. Einige Daten werfen allerdings noch Zweifel an der Bedeutsamkeit der Kolokalisationshypothese bei der vorzeitigen Trypsinogenaktivierung auf. So wurde zum einen eine Kolokalisation lysosomaler und sekretorischer Verdauungsenzyme auch nach Hyperstimulation mit Bombesin beschrieben, welches keine Pankreatitis auslöst (Grady et al. 1996). Außerdem konnte elektronenmikroskopisch und im humanen Pankreassaft gezeigt werden, dass Cathepsin B und Verdauungsenzyme auch bereits in gesundem Pankreasgewebe teilweise in den gleichen Organellen und später im Pankreasgang vorkommen (Willemer et al. 1990, Kukor et al. 2002).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der frühzeitigen intrazellulären Trypsinogenaktivierung eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Pankreatitis zukommt, wobei die Rolle der Kolokalisation hierbei noch nicht abschließend geklärt ist.

Bildung der Entzündungsmediatoren

Die Schädigung der Pankreaszellen nach Zymogenaktivierung stellt nur einen Teil des inflammatorischen Prozesses bei akuter Pankreatitis dar. Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren ist ein anderer wichtiger Mechanismus (Giroir 1999, Osman, Jensen 1999). Der Nachweis, dass die Azinuszelle zur Chemokin- und Zytokinexpression in der Lage ist, konnte in den letzten Jahren erbracht werden. Klinische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Azinarzellschädigung von einer proinflammatorischen Zytokinkaskade begleitet wird (Norman 1998), indem Entzündungsmediatoren, Chemokine und Zytokine schon sehr frühzeitig gebildet werden.

Eine Begrenzung und damit Kontrolle einer Entzündung ist eine initiale Schutzreaktion des Körpers. Bei Verlust der lokalen Kontrolle resultiert eine exzessive unkontrollierte Aktivierung der Inflammationszellen mit dem Auftreten hoher Spiegel von

Inflammediatoren, welche klinisch als SIRS definiert wird (Roumen et al. 1993, Davies, Hagen 1997). Häufige SIRS-Komplikation ist die Entwicklung der systemischen Organdysfunktion, z.B.: Lungen- und Nierenversagen, Schock, bis hin zum Multiorganversagen (Am. College of Chest Physicians 1992). Bei der intrazellulären Bildung von Entzündungsmediatoren nimmt der Transkriptionsfaktor NF κ -B eine zentrale Rolle ein. Dieser Faktor bindet an den Promotorregionen zahlreicher proinflammatorischen Gene und reguliert deren Expression. Auslöser der NF κ -B-Aktivierung sind einerseits Zytokine, Wachstumsfaktoren, Mitogene und Hormone, andererseits aber vor allem Stressfaktoren und -situationen wie Radikalbildung, oxidativer Stress und Hypoxie.

Eine bedeutende Rolle als Mediator für das Multiorganversagen wurde auch für den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) postuliert. PAF wird durch Phospholipase A2 aus Membranphospholipiden freigesetzt und wurde in experimentellen Pankreatitismodellen in erhöhten Konzentrationen im Serum, Pankreas und Lunge gefunden.

Hohe Spiegel der Entzündungsmarker, z.B. IL-6, IL-8 oder TNF- α , kennzeichnen den schweren Verlauf der Erkrankung (Pooran et al. 2003). Daher wurde auch eine pathogenetische Funktion der aktivierten Makrophagen, T-Zellen und Granulozyten diskutiert. Allerdings sind die entscheidenden Faktoren, die eine milde, unkomplizierte AP in eine schwere, zum Teil nicht mehr beherrschbare Entzündung umwandeln, bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es fehlen noch Optionen für die Prognose und Therapie einer schweren Pankreatitis.

1.4 Experimentelle akute Pankreatitis

Untersuchungen zur Pathogenese der Pankreatitis werden durch die Verfügbarkeit von humanen Gewebeproben limitiert. Mit Hilfe von Operationsmaterial gewonnene Ergebnisse können nur partiell zur Erkenntnis der komplexen Zusammenhänge bei Initiation einer AP beitragen. Da die frühen pathogenetischen Prozesse einer AP beim Menschen nicht zugänglich sind, war die Etablierung von experimentellen Tiermodellen unumgänglich. Es ist derzeit jedoch noch kein Pankreatitismodell bekannt, welches die humane Erkrankung umfassend widerspiegelt. Angesichts der großen Vielfalt der inzwischen publizierten Pankreatitismodelle (Lerch, Adler 1994) ist es sinnvoll, auf ein für eine bestimmte Fragestellung geeignetes Modell zurückzugreifen. So bewirken die retrograde Pankreasganginfusion von Taurocholat, die Gabe einer CDE-Diät oder die Obstruktion der gemeinsamen Endstrecke von Pankreas- und Gallengang die Auslösung einer hämorrhagisch-

nekrotisierenden Pankreatitis. Diese Modelle dienen vor allem der Erprobung therapeutischer Maßnahmen.

Das am häufigsten genutzte Modell, welches auch Grundlage dieser Arbeit ist, basiert auf der Hyperstimulation der Azinuszellen mit Caerulein bzw. Cholezystokinin (CCK). Es ist nicht invasiv und ermöglicht die gut reproduzierbare Induktion einer akuten Pankreatitis in verschiedenen Spezies, wie Hamster, Hund, Ratte und Maus. Bei den heute am häufigsten verwendeten Versuchstieren Ratte und Maus ist die Ausprägung der akuten Pankreatitis mild, ödematös und nicht letal (Grady et al. 1996).

Caerulein ist ein Polypeptid der Froschhaut, das in seiner C-terminalen Aminosäuresequenz dem CCK entspricht. Bei der Ratte induziert es in Dosierungen von 0,25 µg/kg/h eine maximale Stimulation des exokrinen Pankreas, wohingegen Dosierungen von 5-10 µg/kg/h, als supramaximal bezeichnet werden und völlig andere Effekte haben. Hier kommt es zum Sekretionsstopp in das pankreatische Gangsystem und zu einem signifikanten Anstieg pankreatischer Enzyme im Blut, verbunden mit interstitiellem Pankreasödem und Leukozytenimmigration, also dem Bild einer ödematös-interstitiellen akuten Pankreatitis. Unter der Stimulation wird die Exozytose an der luminalen Azinuszellmembran blockiert und es lassen sich zahlreiche intrazelluläre Vakuolen im Verlauf beobachten. In diesen Vakuolen sind Verdauungsenzyme und lysosomale Enzyme lokalisiert. Für die Blockade der Exozytose ist eine veränderte Zytoskelettstruktur verantwortlich (Lampel, Kern 1977).

Das Modell ist in vergleichbarer Weise an der Maus anwendbar. Das Hormon bewirkt hier gleichartige Effekte, wenn auch die Ausprägung der Pankreatitis, insbesondere eine beginnende Pankreasnekrose, etwas stärker ist. Das Hyperstimulationsmodell ist besonders gut für pathophysiologische Fragestellungen einsetzbar. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich auch isolierte Azini mit Caerulein bzw. CCK hyperstimulieren lassen, und auf diesem Wege vergleichende in vitro-Untersuchungen möglich werden.

1.5 Die mögliche Rolle des Trypsins in der Pathogenese der akuten Pankreatitis

1.5.1 Humane Trypsin(ogen)-Isoformen

Die Rolle des Trypsins als Schlüsselenzym der unphysiologischen Aktivierung pankreatischer Zymogene erfuhr eine starke Unterstützung nach der Entdeckung von hereditären Pankreatitiden, die mit Mutationen im PRSS1-Gen assoziiert sind. Bis heute sind weitere Mutationen für dieses Protein, jedoch auch im Gen des sekretorischen Trypsininhibitors (SPINK1), identifiziert worden, die mit Pankreatitis assoziiert sind. Dies deutet darauf hin,

dass die Störung des Gleichgewichtes Trypsin – SPINK eine pathophysiologische Relevanz bei chronischer, aber auch bei akuter Pankreatitis besitzt. Mutationen in entsprechenden DNA- und Proteinsequenzen lassen sich bei insgesamt 25% der Patienten mit chronischer Pankreatitis nachweisen (Keim 2005).

Das besondere Augenmerk, welches dem Trypsin in der Pathogenese akuter Pankreatitis zugemessen wird, ergibt sich aus seiner zentralen Stellung in der Aktivierungskaskade der pankreatischen Zymogene. Trypsin kann alle anderen Proenzyme aktivieren. Allerdings ist Trypsinogen kein einzelnes Enzym, sondern es existieren Isoformen. Im Pankreassaft des Menschen findet man drei Isoformen des Trypsinogens, die nach ihren Eigenschaften in der isoelektrischen Fokussierung als kationisches Trypsinogen (PRSS1), anionisches Trypsinogen (PRSS2) und Mesotrypsinogen (PRSS3) bezeichnet werden (Scheele et al. 1981). Dabei machen PRSS1 und PRSS2 unter physiologischen Bedingungen mehr als 90% des Trypsinogen-Gesamtpools aus. Beide Isoformen unterscheiden sich nicht nur strukturell, sondern weisen unterschiedliche enzymatische Eigenschaften auf.

Im Vergleich zu den anderen Isoenzymen, weist PRSS1 eine höhere Autoaktivierung und eine höhere Resistenz gegenüber Autolyse auf. Im Jahre 1996 wurde erstmals über eine Punktmutation im PRSS1-Gen, bei der Arginin durch Histidin an Position 122 (R122H) ersetzt wird und zu hereditärer Pankreatitis führt, berichtet (Withcomb et al. 1996). Inzwischen sind zahlreiche weitere Mutationen für das kationische Trypsinogen beschrieben worden (Keim 2005). Obwohl ein einheitliches pathobiochemisches Konzept, welches alle bisher erwähnten Mutationen beschreibt, bisher nicht möglich ist, scheinen jedoch die meisten PRSS1-Mutationen zu einer erhöhten intrapancreatischen Trypsinogenaktivierung und Trypsinstabilisierung zu führen. Für das anionische Trypsinogen-Gen wurde ein Polymorphismus beschrieben, der bei Pankreatitis-Patienten vermindert auftritt und als protektiver Faktor zu sehen ist (Witt et al. 2006, Santhosh et al. 2008).

Eine Unterstützung erfährt die Hypothese von der Rolle des Trypsins als Schlüsselenzym durch die Befunde zu Mutationen im Gen des pankreatischen Inhibitors SPINK1. Von Witt (2002), Chandak et al. (2004) wurde signifikante Korrelation zwischen der hereditären Pankreatitis und N34S Mutation in dem SPINK1-Gen gezeigt. Es wird postuliert, dass SPINK1-Mutationen zu einem Funktionsverlust bzw. zu einer Funktionseinschränkung des Protease-Inhibitors führen und dadurch eine erhöhte intrapancreatische Trypsinaktivität bedingen.

Obwohl die genauen Pathomechanismen nicht vollständig geklärt sind, gilt es als akzeptiertes Modell, dass eine übermäßige intrapankreatische Trypsinaktivität zu Autodigestion und Inflammation des Pankreas führt.

1.5.2 Humanes Mesotrypsin(ogen)

5-10% der exprimierten Trypsinogene des humanen Pankreas sind dem PRSS3 oder Mesotrypsinogen zuzuschreiben. Ursprünglich als inhibitor-resistente Form und mögliches Trypsin-inaktivierendes Enzym von Rinderknecht et al. (1984) beschrieben, wurde das Mesotrypsin von der Gruppe Sahin-Toth detailliert untersucht. Es weist eine Reihe von Unterschieden zu PRSS1 und PRSS2 auf:

-Es wird viel schwächer durch SPINK1 und SBTI gehemmt. (Nyaruhucha et al. 1997).

-Es ist jedoch in der Lage, beide Inhibitoren zu spalten (Sahin-Toth 2005, Salameh et al. 2008).

-Es besitzt nur marginale proteolytische Aktivität gegenüber Substraten mit Proteinstruktur und ist daher offensichtlich nicht das wesentliche Trypsin-inaktivierende Enzym des Pankreassekretes (Szepessy, Sahin-Toth 2006).

-Es kann effektiv durch Cathepsin B aktiviert werden (Szmola 2003).

Die physiologische bzw. die pathophysiologische Rolle des Mesotrypsins ist bisher nicht aufgeklärt.

1.5.3 Extrapankreatisches Mesotrypsinogen und seine mögliche Rolle in der Aktivierung protease-aktivierter Rezeptoren (PAR)

Interessanterweise wird eine, dem Mesotrypsin analoge Form, das Trypsinogen IV als extrapankreatisches Trypsin beschrieben. Es wird eine Funktion des extrapankreatischen Trypsins in der PAR (protease activated receptors)–Aktivierung diskutiert. Mesotrypsin (Trypsin IV) wurde auch als gehirnspezifische Trypsinisoform identifiziert, die selektiv PAR-1 in Rattenastrozyten aktiviert (Yingfei et al. 2006). In diesem Kontext wurde eine Beteiligung an multiplen physiologischen/pathologischen Verläufen im Gehirn, z.B. bei der Alzheimer-Krankheit, diskutiert. Sekretorische Epithelialzellen des Dünndarmes (Panethzellen) exprimieren ebenso Trypsinogen IV und anionisches Trypsinogen auf mRNA-

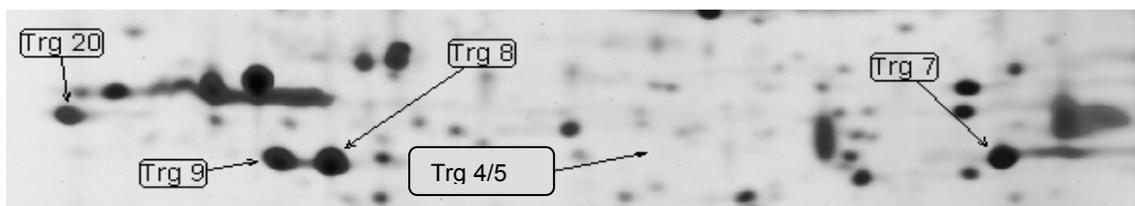
Ebene. Diese Trypsine nehmen offensichtlich an der Prozessierung des antimikrobiellen Peptides Defensin-5 teil (Ghosh et al. 2002).

Cottrell et al. (2004) bestätigten, dass humanes Mesotrypsin spezifisch PAR-2 und PAR-4 der Epithelialzellen aktiviert. Stimulation der PAR-2 der glatten Muskelzellen verursacht eine Vasokonstriktion und folgende Pankreasischämie (Moffatt, Cocks, 1998). Im Gegensatz dazu ruft die PAR-2-Aktivierung der Endothelialzellen eine anhaltende Vasodilatation hervor und erhöht die Gefäßpermeabilität (Kawabata et al. 1998), die ein Pankreasödem verursachen könnte. PAR-2-Aktivierung erhöht auch IL-6 Produktion in Endothelialzellen (Chi et al. 2001). Durch PAR-2-Stimulation der basolateralen Membran von pankreatischen Duktalzellen wird deren Sekretion erhöht (Nguyen et al. 1999). Stimulation von PAR-2 der Azinuszellen führt ebenso zur erhöhten exokrinen Pankreassekretion, die den vorliegenden Sekretionsblock vermindern könnte (Singh et al. 2007).

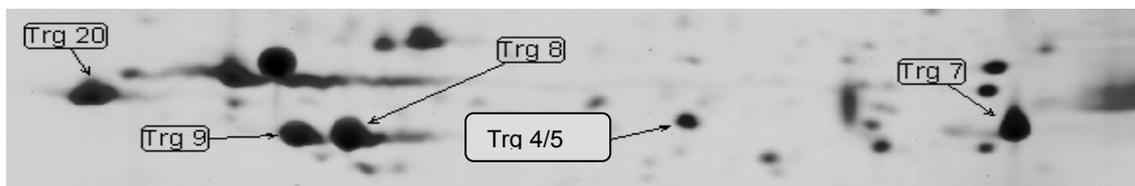
1.5.4 Expressionspattern der Maustrypsinogene

Wie in Abschnitt 1.4 gezeigt, stellt die Maus das bevorzugte Modelltier für Untersuchungen zu akuter Pankreatitis dar. Daher sind Kenntnisse über exprimierte Maustrypsinogen-Isoformen unerlässlich. Im Vergleich zu dem Menschen besitzt die Maus deutlich mehr Trypsinogen-Gene. Die Sequenzierung des Mausgenoms ergab, dass es 20 Trypsinogen-Gene enthält. Für 11 Isoformen ist eine Expression auf mRNA-Ebene bekannt (Li et al. 2006); es handelt sich um die Trypsinogene 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16 und 20. 7 Trypsinogene (1, 3, 13, 14, 17, 18, 19) stellen Pseudogene und die Trypsinogene 2 und 6 Reliktgene dar.

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. W. Halangk wurde das Expressionsmuster der Trypsinogene im Pankreas von verschiedenen Mausstämmen (NMRI, CD-1, FVB, C57BL/6J) untersucht. Die Trypsinogene 4/5, 7, 8, 9, 20 von NMRI-Maus wurden den humanen 3 Isoformen zugeordnet. Dabei wurde festgestellt, dass Trypsinogen 4/5 nach Caerulein-Hyperstimulation hochreguliert war (Makarov et al. 2004, Abstrakt). Sequenzanalogien lassen vermuten, dass diese Isoform zu dem humanen Mesotrypsin analog ist.



Kontrolle



Caerulein-Hyperstimulation

Abb. 2: 2D-Elektropherogramm der Zymogengranula-angereicherten subzellulären Fraktion der Kontroll- und der Caerulein-hyperstimulierten Maus (Makarov et al., unpublizierte Ergebnisse)

Tabelle 1.2: Identifizierte murine Trypsinogen-Isoenzyme und ihre Eigenschaften nach deren Aktivierung (Makarov et al. 2004)

Trypsinogen-Isoformen	TREMBL/Swiss-Prot Accession Nummer	Deskription	Theoretischer isoelektrischer Punkt (IP) Trypsinogen	Theoretischer isoelektrischer Punkt (IP) Trypsin	MG in kDa
Trypsinogen 4 (Mesoisoform)	Q9CPN7	1810009J06Rik	6.21	6.55	24.07
Trypsinogen 7 (kationisch)	Q9CPN9	2210010C04Rik protein	7.99	8.71	23.85
Trypsinogen 8 (anionisch)	Q9R0T7	pankreatisches Trypsin	5.24	6.06	23.84
Trypsinogen 9 (anionisch)	Q9QUK9	TESP4(0910001B1RIKprotein)	5.06	5.74	23.87
Trypsinogen 20 (anionisch)	P07146	Anionischer Prekursor, (Pretrypsinogen II)	4.40	4.57	23.88

1.6 Fragestellung

Initiale Vorgänge bei Caerulein-Hyperstimulation von NMRI-Mäusen werden üblicherweise im Zeitraum bis zu 24 Stunden untersucht. In diesem Zeitrahmen lässt sich ein Anstieg und späterer Abfall der Trypsinaktivität finden (Halangk et al. 2000). Bei detaillierter Betrachtung dieser Aktivität, indem durch Zusatz des Trypsininhibitors SBTI in den Trypsinaktivitätstest die Hemmbarkeit der Substratspaltung ermittelt wurde, wurde festgestellt, dass der Hauptteil der Trypsinaktivität gegen hohe Konzentrationen dieses proteinösen Inhibitors resistent ist. Diese Befunde sind in Literatur bisher nicht beschrieben und bedürfen der Aufklärung, da die enzymatischen Eigenschaften des pankreatitis-induzierten Trypsins einen wesentlichen Einfluss auf die nachfolgenden Aktivierungsvorgänge haben sollten

Es galt daher, folgende Fragestellungen experimentell zu bearbeiten:

Handelt es sich bei der inhibitor-resistenten Aktivität um eine tryptische Aktivität oder um ein anderes Enzym, welches sehr effektiv das Trypsinsubstrat spaltet?

Lässt sich diese Aktivität durch geeignete Chromatographieverfahren anreichern?

Lässt sich durch detaillierte Inhibitoruntersuchungen eine Abgrenzung zu anderen Enzymaktivitäten vornehmen, bzw. ist durch Vergleich zu Trypsinogenen der Maus eine Identifizierung möglich?

Die Fragestellung sollte durch 2D-Elektrophorese und Zymographie, durch Inhibitorexperimente, Proteinanreicherung mittels Affinitätschromatographien und dem Vergleich zu den Eigenschaften von Trypsin-Isoformen, die als rekombinante Enzyme vorlagen, untersucht werden.

Im Ergebnis der Untersuchungen sollte die Rolle des Trypsins, und dabei insbesondere die des inhibitor-resistenten Trypsins, in der Pathogenese einer akuten Pankreatitis besser verstanden werden. Die Analyse der relevanten Mechanismen kann möglicherweise zu neuen Ansätzen in der Therapie der akuten Pankreatitis führen.

2 Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien und apparative Ausstattung

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Reagenzien entsprachen der Kategorie „pro analysis“ und wurden, wenn nicht anders erwähnt, kommerziell bezogen.

Tabelle 1: Herkunft der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Quelle
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
ADV05 (5×Advanced Protein Assay Reagent)	Cytoskeleton Inc, Denver, USA
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Bicine	Fluka, Buchs/Schweiz
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
BSA (Albumin, bovine, Fraktion V)	Sigma, Steinheim
CHAPS	GE HealthCare/England
Coomassie Brilliant Blau	Fluka, Buchs/Schweiz
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Deisendorf
Enterokinase (Rind)	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Fluka, Buchs/Schweiz
Glycerin, 86 %	Riedel de Haen AG, Hannover
Glaskugeln, ø 0,75-1mm	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Fluka, Buchs/Schweiz
HEPES	Ferak, Berlin
Hi-Trap-Benzamidin-Säule (FF-High-Sub, Benzamidin-Sepharose)	Amersham Biosciences Biotech, Uppsala/Schweden
Immobilized pH Gradient Dry Strips pH 3-10	Biorad, GE Healthcare
IPG Buffer 3-10	Biorad, GE HealthCare
Kalziumchlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
MEM Amino acids solution 50x	Sigma, Steinheim

MOPS	Serva, Heidelberg
Natriumazid	Omnilab, Bremen
Natriumkarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
PageBlue Protein Staining Solution	Fermentas, Vilnius/Litauen
Precision Plus Protein™ Standards, unstained	Biorad, München
RPMI-Puffer 1640	Sigma, Steinheim
Salzsäure 37%	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Sigma, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	GE HealthCare/England
Trypanblau 0.4%	GE HealthCare/England

Substrate, Enzyme, Inhibitoren und Peptidanaloga

Boc-QAR-AMC	Bachem, San Carlos/USA
Caerulein (Takus)	Pfizer, Italien
Kollagenase CLSPA	Cell Systems Biotechnologie, St. Katharinen
Benzamidin	Sigma, Steinheim
CA-074	Bachem, San Carlos/USA
Immobilized soybean trypsin inhibitor	Pierce Biotechnology, Rockford/USA
Sojabohnentrypsininhibitor (SBTI)	Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis USA
Pefabloc TRY 1405 (S-124)	Pentapharm Ltd., Basel/Schweiz
bovines Trypsin	Sigma, Steinheim
bovines Trypsinogen	Sigma, Steinheim

2.1.2. Medien und Pufferlösungen

Die in der Arbeit eingesetzten Medien und Pufferlösungen wurden entsprechend der nachfolgenden Tabelle 2 angesetzt:

Tabelle 2: Zusammensetzung der Pufferlösungen

Pufferlösungen	Zusammensetzung
Äquilibrierungslösung	500 mM Tris 6M Harnstoff 6 M 2% SDS 30% Glyzerin Einstellung auf pH 8,8 mit 10M HCl
4×Bindungspuffer (Benzamidin-Affinitätschromatographie)	0,2M Tris 2M NaCl Einstellung auf pH 8,0 mit 3M HCl
Bindungspuffer (SBTI-Affinitätschromatographie)	50mM Tris/HCl 0,1M NaCl 10mM CaCl ₂ Einstellung auf pH 7,2 mit 3M HCl
Elutionslösung 1	1mM HCl pH 3,0 0,5M NaCl
Elutionslösung 2	10mM HCl pH 2,0 0,5M NaCl
Elutionslösung 3	CaCl ₂ 10mM, Essigsäure 0,1M
HEPES-Ringer-Puffer (HR-Puffer)	0,2% Glukose 2% essentieller Aminosäuremix (MEM) 2mM Glutamin 128mM NaCl 0,575 mM MgCl ₂ 4,7mM KCl 1mM Na ₂ HPO ₄ 10mM HEPES

	1,275mM CaCl ₂ pH-Einstellung auf 7,45 mit 1M NaOH
Homogenisierungspuffer (HS-Puffer) für die differentielle Zentrifugation	250mM Saccharose 10mM Zitronensäure 0,5mM EGTA 0,1mM MgSO ₄ pH-Einstellung auf 6.0 mit 1M NaOH
Krebs-Henseleit-Puffer (KH-Puffer)	0,2% Glukose 2% MEM Amino acids solution 2mM Glutamin 110mM NaCl 32,5mM NaHCO ₃ 1,15 mM MgCl ₂ 4,7mM KCl 1mM Na ₂ HPO ₄ pH-Einstellung auf ~7,4 durch Begasung mit 95%O ₂ /5% CO ₂
MOPS-Puffer	5mM MOPS 1mM MgSO ₄ 250mM Saccharose pH-Einstellung auf 6,5 mit 1M HCl
Zentrifuge-Lösung	0,5mM CaCl ₂ 4% BSA gelöst in KHP

Kollagenase-Lösung	0,1mM CaCl ₂ 0,1% BSA 300U/ml Kollagenase CSLPA gelöst in KHP
Rinse-Lösung	0,1mM CaCl ₂ 1% BSA gelöst in KHP
Trypsin-Messpuffer	50 mM Tris

	150 mM NaCl 1 mM CaCl ₂ 0,01% BSA pH-Einstellung auf pH 8,0 mit 1M HCl
4xProbenpuffer nach Laemmli	4% SDS, 40% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 40mM Tris/HCl, pH-Einstellung auf pH 6,8 mit 1M HCl
Rehydratisierungspuffer (Sample Solution-Puffer)	8M Harnstoff 2% CHAPS 0,5% bzw. 2% IPG Puffer

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische Arbeiten

Tabelle 3: Herkunft der verwendeten Geräte und Materialien

Mikroliterdosierspritze 100 N	VEB Werk für technisches Glas, Ilmenau
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Osterode
Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer	Varian Australia Pty Ltd, Victoria/ Australia
Durchlicht-Forschungsmikroskop JENAVAL	Carl Zeiss, Göttingen
UV-Geldokumentations- und Analyse- System, Multigenius	Syngene, Cambridge/England
Handee Micro Spin Columns (empty)	Pierce, Rockford
HiTrap-Benzamidin-FF, 1,6/2,5 cm	Amersham, Schweden
Hoefler MiniVe Complete, Vertical Electrophoresis System	GE HealthCare
Homogenisator Homgen 3200 011	Schütt Labortechnik GmbH Göttingen
Image Scanner, Umax, Power Look III Color Scanner	Amersham Biosciences, Freiburg

Immobiline DryStrip Reswelling Tray	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPGphor Isoelectric Focussing Unit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Magnetmixer IKAMAG RET-G	IKA Labortechnik, Staufen
Peristaltikpumpe Pump P-1	Biosystems GmbH, Freiburg
pH Meter MI 229	Mettler Toledo AG, Schwerzenbach/Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Saphire Fluoreszenzspektrophotometer	Tecan Austria GmbH, Grödig/Österreich
Schwinger- Schüttelgerät TPM-2	Sarstedt, Nümbrecht
SE 660 Dual Cooled Vertical Unit, Basic	Amersham Pharmacia Biotech, England
Semi-Mikrowaage, elektronische R-180D	Sartorius, Göttingen
Sonorex Super, Ultraschallreinigungs- Kompaktgerät USR-18	Bandelin electronic, Berlin
Speed Vac Bachofer	Reutlingen, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall Sonopuls Bandelin	Bandelin electronic, Berlin
Vacuum Einheit Savant UVS 400 (SpeedVac-Konzentrator, Geltrockner)	Live Sciences International, Frankfurt/Main
variabler HPLC-UV/VIS-Detector VWM 2141	Pharmacia LKB, Schweden
Vivaspin 500 10,000 MWCO	Vivascience AG, Hannover, Germany
Vortex Genie 2G 560 E	Scientific Industries Inc, Bohemia/USA
Wasserbad Medingen Typ W6	Windaus Labortechnik
96er Well-Platten	NUNC, Dänemark

Die eingesetzten rekombinanten Mastrypsinen 4, 5, 7, 8, 9, 11, 16, 20 wurden in der Arbeitsgruppe Experimentelle Operative Medizin in *Escherichia coli* exprimiert, isoliert und aufgereinigt.

Darüber hinaus wurde uns rekombinantes Maustrypsinogen 4 von Herrn Prof. M. Sahin-Toth (Department of Molecular and Cell Biology, Boston University, Goldman School of Dental Medicine, Boston) zur Verfügung gestellt.

2.2 Tiermodell

2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die im Tierversuchsantrag 42502-2-814 gemäß §8 des Tierschutzgesetzes "Identifizierung und Charakterisierung einer Inhibitor-insensitiven Trypsinaktivität im Caerulein-stimulierten Mäusepankreas" genehmigten Experimente wurden männliche NMRI-Mäuse von HARLAN Deutschland, Borcheln, eingesetzt. Die Haltung und Behandlung der Tiere erfolgte im Bereich Experimentelle Operative Medizin der Klinik für Chirurgie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter Einhaltung der Richtlinien der geltenden Tierschutzgesetze. Die Tiere wurden bei einer konstanten Temperatur (22° C) und Luftfeuchtigkeit (50%) in Gruppen von 3-4 in Standardkäfigen bei 12 h/12 h Hell/Dunkel-Zyklus gehalten. Gefüttert wurden sie mit Standardfutter und erhielten Trinkwasser ad libitum.

Eine Caerulein-Pankreatitis wurde durch wiederholte i.p. Injektionen von Caerulein (Ceruletid-Analogen max. 7x50 µg/h kg KG; i.p.) induziert. Die Kontrolltiere erhielten 0,9%ige sterile Kochsalzlösung i.p. appliziert. Vor Beginn der Caeruleinstimulation wurden die Versuchstiere für 16 h gefastet, hatten jedoch Trinkwasser ad libitum erhalten. Eine Stunde nach der letzten Injektion wurden die Tiere durch Dekapitation getötet.

Die Pankreata wurden entnommen, in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und das Organengewicht wurde bestimmt. Das Pankreas wurde anschließend entweder bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder als Ausgangsmaterial zur Azini-Präparation bzw. zur Herstellung von Proteinextrakten eingesetzt. Für die elektrophoretischen bzw. enzymatischen Bestimmungen wurden die Pankreasproben in Sample-Solution-Puffer bzw. in MOPS-Puffer entsprechend Punkt 2.3.2. homogenisiert.

2.2.2 Präparation und Inkubation pankreatischer Azini

Zur Untersuchung der frühzeitig in Azinuszellen auftretenden pathophysiologischen Vorgänge der Zymogenaktivierung bei experimenteller Caerulein-Pankreatitis wurden in vitro Caerulein-Hyperstimulationen an pankreatischen Azinipräparationen durchgeführt. Dazu wurden die Azini aus dem Pankreas von NMRI-Mäusen, die zum Zeitpunkt der Pankreasentnahme für 16h gefastet haben, wie folgt isoliert:

Tabelle 4: Präparation muriner pankreatischer Azini (Amsterdam et al. 1972)

1	Pankreasexplantation aus 3 Mäusepool, Entfernung von Fett, Lymphknoten und Bindegewebe und Spülen des Organs in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung
2	Interstitielle Injektion von 5ml Kollagenaselösung 300U/ml in das Pankreasparenchym
3	1. Digestion: Inkubation unter Schütteln im Kreisschüttel-Wasserbad bei 37°C für 10min bei 84-86 rpm
4	Dekantieren der Lösung und Zugabe von 5ml frischer Kollagenaselösung 300U/ml
5	2.Digestion: Inkubation unter Schütteln im Kreisschüttel-Wasserbad bei 37 °C für 40 min bei 84-86 rpm
6	Desintegration des Pankreas in Azini durch 5-8malige Passage der Zellsuspension in eine Plastikpipette (Öffnungsdurchmesser 2,4mm und 0,9mm)
7	Filtration der Azinisuspension durch ein Nylon-Netz (Porendurchmesser 150 µm), Nachspülen mit 10ml Rinse-Lösung
8	Azinisuspension auf 4 Röhrchen mit je 5ml Zentrifuge-Lösung schichten und bei 45g für 5min bei 4°C zentrifugieren
9	Zellpellets nachfolgend in 10ml bzw. 5ml Zentrifuge-Lösung resuspendieren und Zentrifugationsschritte wiederholen
10	Azini-Zellpellet in 12ml HR-Puffer resuspendieren und Zentrifugationsschritt wiederholen
11	Azini in 32ml HR-Puffer in 250ml Erlenmeyerkolben resuspendieren, Suspension für 15s mit Sauerstoff begasen und Präinkubation für 30 min im Kreisschüttel-Wasserbad (37°C) bei 80rpm
12	Suspension in 4 Röhrchen mit je 2,5ml Percoll-Lösung schichten und bei 4°C für 5 min bei 45g zentrifugieren.
13	Dekantieren der Lösung, Resuspendieren der Azini in 8-12ml HR-Lösung und Einstellen der Zelldichte auf 10 ⁷ Zellen/ml und Beginn des Versuchsablaufes.

2.2.3 In vitro Caerulein-Stimulation an isolierten Pankreasazini

Pankreatische Azini wurden durch Zugabe von 100 nM Caerulein für 0 bis 30 min stimuliert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5min bei 1000xg bei 4°C

pelletiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Homogenisation bei -80°C gelagert.

2.2.4 Lichtmikroskopie

Jeweils nach 0 bzw. 30minütiger Caerulein-Stimulation wurden je 50µl Probe aus der Azinuspension entnommen und mit 0,1% Trypanblau versetzt. Dieser Farbstoff ist nicht in der Lage durch intakte Zellmembranen zu diffundieren, während geschädigte Zellen blau gefärbt werden. Die Bestimmung des Anteils der geschädigten Azinuszellen erfolgte nach Applikation durch Auszählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer am Lichtmikroskop. Die Methodik wurde ausschließlich zur Intaktheitskontrolle bei Azini-Inkubationen verwendet.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Präparation der Proteinextrakte aus Caerulein-behandelten Azini

Nach der Inkubation wurden die Azini aus der Zellsuspension durch Zentrifugation analog Punkt 2.2.2 gewonnen und die Zellen in Sample Solution Puffer oder MOPS-Puffer mit 0,13% Triton X100 resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend nach Zugabe von je 2 Glaskugeln ø 3mm und ~100mg Glaskugeln ø 0,25-0,5mm durch Vortexen homogenisiert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 3000xg für 5min bei 4°C entfernt. Die im Überstand enthaltenen Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

2.3.2 Herstellung der Pankreashomogenate

Die Homogenisation des Pankreasgewebes erfolgte mit Hilfe des Ultra-Turax. Hierzu wurde ein definiertes Pankreasstück von 100-150 mg in einem Reagenzglas mit MOPS-Puffer pH 6,5 im Verhältnis 1:10 suspendiert und auf Eis in 3-4 Hüben mit 24000U/min homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend für 2x10s ultrabeschallt. Zur Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile wurden die Proben anschließend bei 4°C für 10 min bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, schockgefroren und bis zur späteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.3.3 Zymogengranula-Isolation aus Pankreas durch differentielle Zentrifugation

Tabelle 5: Fraktionierung durch differentielle Zentrifugation (nach modifizierter Methode von Tartakoff, Jamieson 1974)

- 1 In physiologischer Kochsalzlösung auf Eis gewaschenes Pankreas mit 0,7ml eiskaltem HS-Puffer versetzen und Zellen mit Hilfe des Elmar-Potters im Glasgefäß/Pistill Nr.20 bei 2000 rpm in 3 Hüben aufschließen.
 - 2 Zentrifugieren des Zellextraktes für 5min bei 500g bei 4°C, Überstände in ein Reaktionsgefäß dekantieren.
 - 3 Pellet in 0,7ml HS-Puffer resuspendieren, Zellaufschluss (siehe Punkt 1) wiederholen und in neues Reaktionsgefäß überführen.
 - 4 Zellaufschlüsse aus Punkt 2 und 3 analog zentrifugieren und Überstände in neuem Reaktionsgefäß vereinigen.
 - 5 Überstände aus Punkt 4 bei 1300g für 15min bei 4°C zentrifugieren und in neues Reaktionsgefäß überführen, Pellet in 0,3ml HS-Puffer resuspendieren.
 - 6 Pellet und Überstand wie unter Punkt 5 zentrifugieren und Überstände in neues Reaktionsgefäß vereinigen. Pellet in 360µl MOPS-Puffer+0,13% Triton X100 (bzw. Sample Solution Puffer) resuspendieren. Dies ist die Zymogengranula angereicherte Fraktion.
 - 7 Überstand bei 12.000g für 15min bei 4°C zentrifugieren und in ein neues Reaktionsgefäß überführen, Pellet in 360µl MOPS-Puffer+0,13% Triton X100 (bzw. Sample Solution Puffer) resuspendieren. Diese Fraktion enthält die Lysosomen und leichten Mitochondrien.
 - 8 Überstand bei 50.000g für 2h bei 4°C zentrifugieren und in ein neues Reaktionsgefäß überführen. Dies ist die zytoplasmatische Fraktion. Das Pellet in 360µl MOPS-Puffer+0,13% Triton X100 (bzw. Sample Solution Puffer) resuspendieren. Die Fraktion beinhaltet die mikrosomale Fraktion.
- Alle Fraktionen wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung der Zellextrakte erfolgte mittels eines Advanced Protein Assays der Firma Cytoskeleton Inc. nach einer modifizierten Methode von Bradford (1976). Die Absorptionsmessung wurde am Spektrophotometer Spectrofluor Plus/Tecan bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Anschließend wurden die Werte mit Hilfe einer Standardkurve mit bovinem Serumalbumin als Eichprotein berechnet.

2.3.5 HPLC Analytik. Größenausschlusschromatographie an BioSep-SEC-S3000

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes des tryptischen Enzyms mit der inhibitor-insensitiven Aktivität (iiTA) wurde eine Gelfiltration (HPLC) in der Abteilung für Experimentelle Innere Medizin am Gerät Agilent HP unter Einsatz der HPLC-Säule Biosec 3000 (0,78cm Durchmesser) mit einer Säulenlänge von 30cm durchgeführt. Als Säulenmaterial wurde ein Silikagel mit einem Trennbereich von 5 bis 700 kDa für native Proteine eingesetzt. Die Säule wurde zu Beginn mit 100mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert. Mit Hilfe der Standardproteine Thyreoglobulin (689 kDa), Ferritin (442 kDa), Catalase (206 kDa), Aldolase (177 kDa), Albumin (62,9 kDa), Ovalbumin (46,7 kDa), Chymotrypsinogen (20,3 kDa), Ribonuklease (14,6 kDa) wurde eine Kalibrationskurve erstellt, die als Bezugsgröße zur Berechnung des Molekulargewichts der iiTA herangezogen wurde.

Zur Bestimmung der molekularen Masse der iiTA wurde die äquilibrierte Säule mit 200 µl Pankreashomogenat (Proteingehalt 7,1 mg/ml) beladen. Die Größenfraktionierung der Probe erfolgte unter identischen Bedingungen mit einer Elutionsgeschwindigkeit von ca. 0,8 ml/min innerhalb 20 min. Der Elutionsverlauf wurde durch UV-Absorption bei 214 nm verfolgt. Die Elutionsfraktionen wurden in Abständen von 15 sec gesammelt und nachfolgend die enzymatischen Aktivitäten der iiTA sowie von Trypsinogen und Chymotrypsinogen nach deren Aktivierung analog Punkt 2.3.6 ermittelt.

2.3.6 Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von Trypsin, Trypsinogen und Chymotrypsinogen

Die proteolytischen Aktivitäten von Trypsin, bzw. von Trypsinogen und Chymotrypsinogen nach deren Aktivierung wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmessung am Fluoreszenzspektrophotometer Safire/Reader bzw. Eclipse/Varian unter Einsatz spezifischer 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) markierter Peptidsubstrate bestimmt. Der empfindliche Nachweis basierte auf das C-terminal durch proteolytische Spaltung freigesetzte Fluorochrom AMC, das zu einem drastischen Anstieg der Fluoreszenz mit einer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge von 360nm bzw. 440nm führt.

Zur Bestimmung der Aktivitäten von Trypsin(ogen) bzw. Chymotrypsin(ogen) wurden 5-10µl Proteinextrakt in 200µl bzw. 600µl Trypsin-Messpuffer (Trypsinpuffer+32µM Peptidsubstrat) in eine 96well Readerplatte bzw. UV-Küvette pipettiert und die Zunahme der Fluoreszenz je Sekunde bei 30°C am Reader Safire bzw. Eclipse gemessen. Die Aktivitätsbestimmung von

Trypsin bzw. Chymotrypsin erfolgte mit den Peptidsubstraten Boc-QAR-AMC bzw. Suc-AAPF-AMC.

Die inhibitor-insensitive Trypsinaktivität wurde in Gegenwart von 20 μ M SBTI unter identischen Messbedingungen bestimmt.

Zur Berechnung der enzymatischen Aktivität bzw. Enzymkonzentration in der Dimension mU/mg Protein bzw. pmol/mg Protein wurde eine Standardkurve an freiem AMC bzw. bovinem Trypsin bekannter Konzentration mitgeführt, die in Bezug auf eingesetztes Probenvolumen und der Proteinkonzentration als Berechnungsgrundlage diente.

Bestimmung von Trypsinogen und Chymotrypsinogen nach initialer Aktivierung durch Enterokinase

Das Trypsinogen in Pankreasproben wurde als aktives Trypsin nach Aktivierung durch Enterokinase bestimmt. Das durch Enterokinase freigesetzte Trypsin katalysiert die Aktivierung von Chymotrypsinogen, das in einem nachfolgenden Ansatz enzymatisch analog Punkt 2.3.6. gemessen, als interner Marker zur Bestimmung des Molekulargewichtes in den Fraktionen nach HPLC-Gelfiltration diente.

Das Trypsinogen in den Pankreashomogenaten und die rekombinant exprimierten Maus-Trypsinogene wurde wie folgt aktiviert.

Enterokinase-Aktivierungsansatz:

6 μ l Pankreashomogenat
6 μ l bovine Enterokinase (20 U/ml)
48 μ l Tris/NaCl/CaCl₂ Puffer pH 8,0
Inkubation 25' min bei 37⁰ C

oder

10 μ l rekombinantes Maustrypsinogen
3 μ l bovine Enterokinase (20 U/ml)
20 μ l Tris/NaCl/CaCl₂ Puffer pH 8,0
Inkubation 25min bei 37⁰ C

Nach der Inkubation wurde der Enterokinase-Aktivierungsansatz in Trypsinpuffer in seriellen 10fach Verdünnungen bis 10^{-4} verdünnt und die Trypsin- und Chymotrypsinaktivität analog 2.3.6. gemessen.

2.3.7 Bestimmung der SBTI- und SPINK-Inhibitor-Resistenz muriner Trypsin-Isoenzyme

Die Titration sowohl der in den Pankreashomogenaten enthaltenen endogenen als auch der rekombinanten Trypsin-Isoenzyme gegen SBTI und SPINK3 wurde, wie unter 2.3.6. beschrieben, am Cary Eclipse Fluorescence Spektrophotometer oder am Reader Safire durchgeführt. Dazu wurden 10 μ l Pankreashomogenat in einer UV-Küvette, in die 600 μ l bzw. 200 μ l Trypsin-Messpuffer vorgelegt wurden, pipettiert und zunächst wurde die Ausgangsaktivität ermittelt. Durch Zugabe steigender Mengen an SBTI bzw. SPINK3 wurde in parallelen Versuchsansätzen die erforderliche Inhibitorkonzentration ermittelt, die zu einer Hemmung um 90% der Ausgangstrypsinaktivität führt.

2.3.8 Bestimmung der endogenen Inhibitorkapazität der Pankreashomogenate

Zuerst wurde die Nulllinie des Meßpuffers bestimmt, dann wurden in jede Küvette 12 μ l des Pankreashomogenats zugegeben und Trypsinaktivität gemessen. Als Kontrolle wurde in jede Küvette 4,1 μ l 4mM SBTI-Lösung bis Endkonzentration 20 μ M zugegeben. In die Küvette mit Pankreashomogenat wurden steigende Konzentrationen des bovinen Trypsins/aktivierten rekombinanten Maustrypsins 4 zugegeben und die Trypsinaktivität wurde als Fluoreszenzanstieg registriert.

2.4 Isolierung und Reinigung der Trypsin-Isoformen mittels Affinitätschromatographie

2.4.1 Benzamidin-Affinitätschromatographie

Benzamidin ist ein Proteaseinhibitor mit einer Affinität zu tryptischen Enzymen, die zur Bindung und Aufreinigung dieser Enzyme mittels Affinitätschromatographie genutzt werden kann. Diese Methode wurde angewandt, um das in den caerulein-hyperstimulierten Pankreashomogenaten enthaltene Trypsin(ogen) mit Hilfe einer Benzamidin-Sepharose-Säule (Hi-Trap-Benzamidine FF High Sub-Säule) durch Affinitätschromatographie zu isolieren. Der

Elutionsverlauf der gebundenen Proteine wurde dabei spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm mit Hilfe des HPLC-UV/VIS Detektors (VWH 2141) erfasst.

Als Probenmaterial zur Aufreinigung der Trypsine wurde die Zymogengranula- und Lysosomenfraktion nach differentieller Zentrifugation (Siehe Punkt 2.3.3) eingesetzt und im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt. 750µl des entstandenen Proteingemisches wurden anschließend mit 250 µl 4×Bindungspuffer pH 8.0 (0,2 M Tris, 2M NaCl) äquilibriert und die unlöslichen Bestandteile durch Membranfiltration (Porengröße 0,45µm) entfernt. Das Filtrat wurde auf die zuvor mit Bindungspuffer äquilibrierte Säule appliziert und ungebundenes Probenmaterial wurde anschließend bei einer Durchflußrate von 1ml/min mit Bindungspuffer aus der Säule ausgewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte bei gleicher Durchflußrate über einen pH-Gradienten (pH 3,0 bis 2,0), der mit Hilfe eines Gradientenmischers (Pharmacia) durch Mischen der Elutionlösung 1 und 2 erzeugt wurde. Das Eluat wurde in 500µl Fraktionen gesammelt und das Absorptionsprofil bei einer Wellenlänge von 280nm mit Hilfe des Schreibers Mini 220N aufgezeichnet.

Die in den Eluatfraktionen enthaltene inhibitor-sensitive und insensitive Trypsinaktivität wurde anschließend enzymatisch bestimmt bzw. nach Entsalzung und Konzentrierung der Proben durch Membranfiltration mit Hilfe einer Vivaspin-Säule mit Hilfe der 2D-Zymographie charakterisiert.

2.4.2 SBTI-Affinitätschromatographie

Unter Verwendung von SBTI-Agarose ließen sich aktivierte SBTI-sensitive Trypsinogene aufreinigen. Hierzu wurden die Proben auf eine mit Bindungspuffer äquilibrierte SBTI-Agarosesäule aufgetragen und anschließend mit Elutionslösung 3 eluiert. Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe von Sample-Solution-Puffer neutralisiert und mittels Membranfiltration (Vivaspin 500, MWCO 10 kDa) entsalzen und eingengt. Die Trypsinaktivitäten der Eluat- und Filtrat-Fractionen wurden mit Hilfe der 1D- und 2D-Zymographie (siehe Punkt 2.5) nachgewiesen.

2.5 SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach dem Prinzip der SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970). Das Detergens SDS (engl.: sodiumdodecylsulfate, SDS) komplexiert Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur und versieht sie mit einer negativen Ladung, die ihre Wanderung im Gel entsprechend ihres Molekulargewichts bestimmt. Die Elektrophorese wurde nach einer Methode von Schägger und Jagow 1987 durchgeführt. Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe von 10% APS und TEMED initiiert. Zur Zymographie wurden 12%ige Polyakrylamidgele eingesetzt, die mit 100 µM

Boc-QAR-AMC kopolymerisiert wurden. Als Apparatur kam eine vertikale Gel-Elektrophorese vom Typ Hoefer miniVE complete System mit einer Gelabmessung von 100*120*1mm zum Einsatz.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Elektrophorese-Puffer (nach Schägger, Jagow 1987)

Puffer	Tris (M)	Tricine (M)	pH	SDS (%)
Anodenpuffer	0,2	-	8,9 ^a	-
Kathodenpuffer	0,1	0,1	8,25 ^b	0,1
Gelpuffer	3,0	-	8,45 ^a	0,3

^a – pH-Wert mit 10M HCl einstellen

^b – keine pH-Korrektur, pH-Wert ~8,25 .

Tabelle 7: Herstellung der Gele

Trenngel

Acrylamid/N-N'-Bisacrylamidlösung 32:1 (w/w)	1696,8 µl
Gel-Puffer	2332,4 µl
H ₂ O bidest	1948 µl
Glycerin	764,4 µl
Ammoniumperoxidisulfat 10% (w/v)	20 µl
TEMED	3,5 µl
Boc-QAR-AMC-Lösung 3mM in DMF	233µl

Sammelgel

Acrylamid/N-N'- Bisacrylamidlösung 32:1 (w/w).	0,6 ml
Gelpuffer	2,5 ml
H ₂ O _{bidest}	4,4 ml
Ammoniumperoxidisulfat 10% (w/v)	45 µl
TEMED	22,5 µl

2.5.1 1D-SDS PAGE

Nach Entfernung des Probenkammes wurde das Sammelgel mit Kathodenpuffer überschichtet. Für die Zymographie wurden je Probe 35-50µg Protein mit Laemmlipuffer ohne Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei RT inkubiert und nachfolgend auf die Probenaschen aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Proteinmarker Precision Plus Protein Standard Unstained (Biorad) in die erste Probenasche appliziert. Nach Auffüllen der unteren Elektrophorese-Kammer mit Anodenpuffer wurde die Elektrophorese

bei einer konstanten Stromstärke von 8mA/Gel über Nacht im Kühlschrank durchgeführt. Die Dauer der Elektrophorese betrug 16-18 h und war beendet sobald die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gels erreicht hat. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophorese-Kammer entnommen und die Proteine mit der gewünschten Methode nachgewiesen.

2.5.2 2D-SDS PAGE

Isoelektrische Fokussierung der Proteine für die 2D-Zymographie

Die Rehydratisierung der Gelstrips (Dry Strips mit immobilisierten linearen pH-Gradienten 3-10) erfolgte über Nacht in Rehydratisierungspuffer (Sample Solution-Puffer, 2% CHAPS, 0,5%-2% IPG Puffer) bei RT. Die rehydratisierten Gelstrips wurden anschließend in die vorgesehenen Strip-Holder gelegt, die Elektrodenpads wurden mit Rehydratisierungspuffer durchfeuchtet und auf die Gelstrips positioniert. Nach Überschichten der Gelstrips mit Cover Fluid wurden die Sample Cup zur Probenbeladung nahe der Anode platziert. Zur Probenbeladung wurden max. 12µl Pankreashomogenat (Proteinmenge 80-120µg) mit 20µl Rehydratisierungspuffer (siehe oben) äquilibriert und auf die Sample Cups appliziert. Die isoelektrische Fokussierung der Proteine wurde mit folgenden Parametern in der IEF-Apparatur Ettan IPGphor durchgeführt:

Spannung [V]	Zeit [h]
1 300	2:00 Step-n-hold
2 1000	0:30 Gradient
3 5000	1:20 Gradient
4 5000	3:00 Gradient

maximale Stromstärke: 50 µA/Strip

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstrips entnommen und in einer Äquilibrationslösung (300µM Acrylamid) für 30 min bei RT in einer Kammer äquilibriert. Nachfolgend wurden die Gelstrips mit der Gelseite nach vorn in einem 12%igen SDS-PAGE positioniert und mit Sammelgel fixiert. Nach dem Auftragen von 5 µl Proteinmarker und Auffüllen der Kammer mit 1 l Katodenpuffer wurde die Gelelektrophorese bei 200 V, 6,4 mA/Gel für 16-18 h bei +4⁰C durchgeführt. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel entnommen und die vorhandenen Trypsinaktivitäten mit Hilfe der Zymographie (siehe Punkt

2.5.3) nachgewiesen. Abschließend wurden die Proteine im Gel mit Hilfe einer Coomassie-Färbung angefärbt.

2.5.3 Auswertung der Elektropherogramme. Zymographie nach 1D- und 2D-SDS PAGE

Die Zymographie ist eine Methode zur Lokalisation enzymatischer Proteine in Elektropherogrammen und ermöglicht damit die Bestimmung des Molekulargewichtes dieser Enzyme. Diese Methode wurde zur Bestimmung des Migrationsverhaltens und des Molekulargewichtes der im Pankreas aktivierten Trypsine eingesetzt. Zum sensitiven Nachweis der Trypsinaktivität wurde das Trypsinsubstrat Boc-QAR-AMC verwendet, das durch Kopolymerisation im Polyakrylamidgel fixiert wurde. Das durch tryptische Spaltungsaktivität freigesetzte Fluorophor AMC erzeugt ein Fluoreszenzsignal zur Lokalisation von Trypsin, das bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm am Transilluminator detektiert werden kann.

Die Pankreashomogenatproben wurden in Laemmli-Probenpuffer ohne Mercaptoethanol bei RT für 5min äquilibriert und in einem mit 200µM Boc-QAR-AMC kopolymerisierten 12,5%igen SDS-Polyakrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das im Gel enthaltene SDS durch 5maliges Auswaschen durch ein nicht ionisches Detergens wie Triton X-100 (2.5%) ersetzt. Danach wurde das Gel in einer Pufferlösung (6.3 mM Bicine-Puffer mit 0,1M NaCl, pH 9,0) für 30 min inkubiert, die eine enzymatische Aktivität der aufgetrennten Proteasen ermöglicht. Während dieser Zeit kann das Enzym an seiner durch die Elektrophorese bedingten Position im Gel das im Gel eingebettete Substrat verdauen. An der Stelle, wo das Peptid verdaut wird, erscheint eine Fluoreszenzbande.

2.5.4 Ultrafiltration

Die Konzentrierung und Entsalzung der proteolytisch aktiven Fraktionen erfolgte mit Hilfe der Ultrafiltration. Hierfür wurde eine Ultrafiltrationssäule Vivaspin 500 cut off 10 kDa mit einer polyethersulfon-beschichteten Membran der Porengröße 10 kDa eingesetzt. Diese Methode ermöglichte, Salze sowie niedermolekulare Verbindungen abzutrennen.

2.5.5 Coomassie-Färbung von Elektropherogrammen

Die Anfärbung von Proteinen mit Coomassie (Brilliant) Blue R-250 ist eines der meist genutzten Verfahren zur Lokalisation von Proteinen im Polyakrylamid-Gel. Zur Entfernung des SDS wurden die Gele für 3x10min in entionisiertem Wasser durch Schütteln auf einem Kreisschüttler bei 46rpm gewaschen. Anschließend wurden die Gele mit PageBlue Staining

Solution überschichtet und innerhalb 1 Stunde unter Schütteln gefärbt. Die Entfärbung erfolgte nach Entfernung der Färbelösung in 100ml entionisiertem Wasser durch Schütteln für 1-2 Stunden. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode lag bei etwa 30 ng Protein/Bande. Abschließend erfolgte eine Fotodokumentation des Gels.

2.5.6 Trocknung von Polyakrylamidgelen

Zur Aufbewahrung und Dokumentation wurden Polyakrylamidgele in 5% Glyzerin-Wasser für 1h inkubiert und anschließend mit Hilfe der Vakuumgerätes Savant UVS 400 nach Angaben des Herstellers zwischen zwei Cellophanmembranen getrocknet.

2.5.7 Datenpräsentation und Statistik

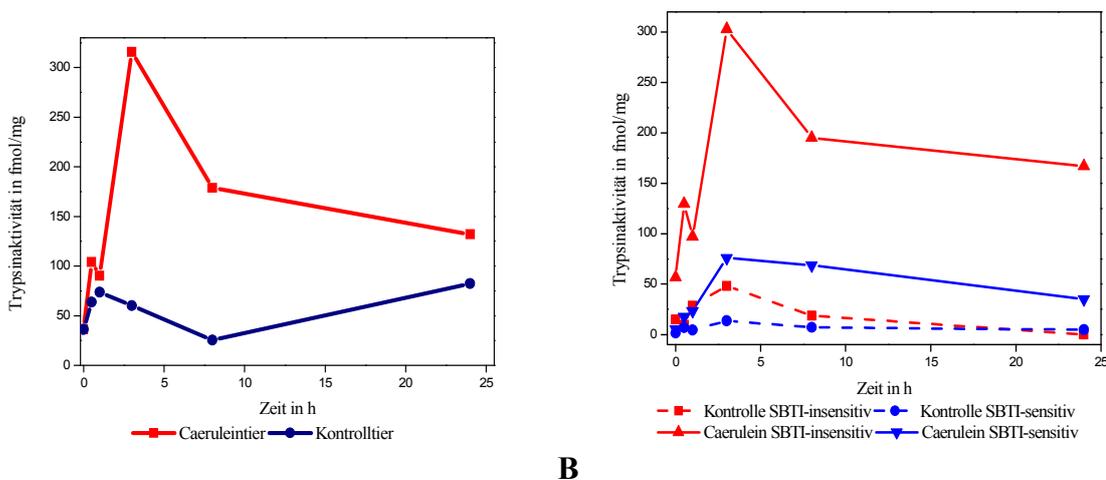
Die in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert einer Versuchsreihe aus jeweils 3-6 Einzelversuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Trypsinogenaktivierung im Pankreas und in isolierten pankreatischen Azini nach Caerulein-Hyperstimulation

Zur Charakterisierung der frühzeitig im Verlauf einer akuten Pankreatitis auftretenden Trypsinogenaktivierung wurde die Aktivität dieses Enzyms im Pankreashomogenat Caerulein-hyperstimulierter NMRI-Mäuse im Vergleich zu NaCl-Kontrolltieren bestimmt. Zur Untersuchung der TG-Aktivierung in pankreatischen Azinuszellen wurde die Trypsinaktivität nach Zellyse in vitro inkubierter Azinipräparationen unter gleichen Bedingungen erfasst.

Die wiederholte Gabe supraphysiologischer Mengen des Cholezystokinin-Analogons Caerulein in vivo bewirkt eine Aktivierung von Trypsinogen im Pankreas der Mäuse. In Abbildung 1A ist der Zeitverlauf der Trypsinaktivität über 24 Stunden dargestellt.



A

B

Abb. 1: Trypsinaktivität im Pankreasgewebe bei Caerulein-Pankreatitis

Abb. 1A zeigt die Gesamtrypsinaktivität in Pankreashomogenaten von Caerulein-hyperstimulierten NMRI-Mäusen und Kontrolltieren. In Abbildung 1B sind die entsprechenden SBTI-insensitiven und -sensitiven Anteile dieser Gesamtrypsinaktivität dargestellt.

Im Vergleich zu den Kontrollmäusen wiesen die Caerulein-hyperstimulierten Mäuse eine um bis zu 6fach höhere Trypsinaktivität im Pankreasgewebe mit einem Maximum nach drei Stunden auf. Zur Verifizierung der Spezifität der mit dem fluorogenen Substrat Boc-QAR-AMC gemessenen Gesamtrypsinaktivität wurde in parallelen Messansätzen die Bestimmung dahingehend erweitert, dass neben der Gesamtaktivität auch die Substratspaltung in

Gegenwart des spezifischen Trypsin-inhibitors aus Sojabohnen (SBTI) gemessen wurde. Es zeigte sich, dass die Trypsingesamtaktivität auch nach Zugabe von 20 μ M SBTI nur teilweise hemmbar war und neben einer inhibitor-sensitiven Aktivität (isTA) zu einem überwiegenden Anteil eine inhibitor-insensitive Aktivität (iiTA) enthielt (siehe Abbildung 1B). Dieser iiTA-Anteil betrug etwa 70-75% der gemessenen Gesamtaktivität, während das Verhältnis der iiTA an der Gesamtaktivität über den gesamten Zeitverlauf annähernd konstant blieb. Weitere Experimente bestätigten, dass der Anteil der iiTA stets 70 bis über 90% an der Gesamttrypsinaktivität betrug.

Das bestimmte Verhältnis der iiTA zur isTA spiegelt nicht die zu erwartenden Quantitäten wider, wenn man annimmt, dass bei gleicher Aktivierbarkeit auch im Mäusepankreas mehr als 90% des aktivierbaren Trypsinogenpools aus inhibitor-sensitiven Isoformen besteht. Auf der anderen Seite ist auch die spezifische Messung von Trypsin zunächst als kritisch einzuschätzen, da eine Hydrolyse des zur Messung eingesetzten Substrates auch durch andere C-terminal am Arginin-Rest spaltende Proteasen katalysiert werden kann. Solche Proteasen könnten im Homogenat aus Gesamtpankreas sowohl aus den zahlenmäßig dominierenden Azinuszellen stammen, als auch aus anderen Pankreaszellen, Entzündungszellen oder als Serumproteine in das Homogenat gelangen. Daher wurde zunächst geprüft, ob die beobachtete iiTA auch auftritt, wenn isolierte pankreatische Azini *in vitro* mit Caerulein hyperstimuliert werden.

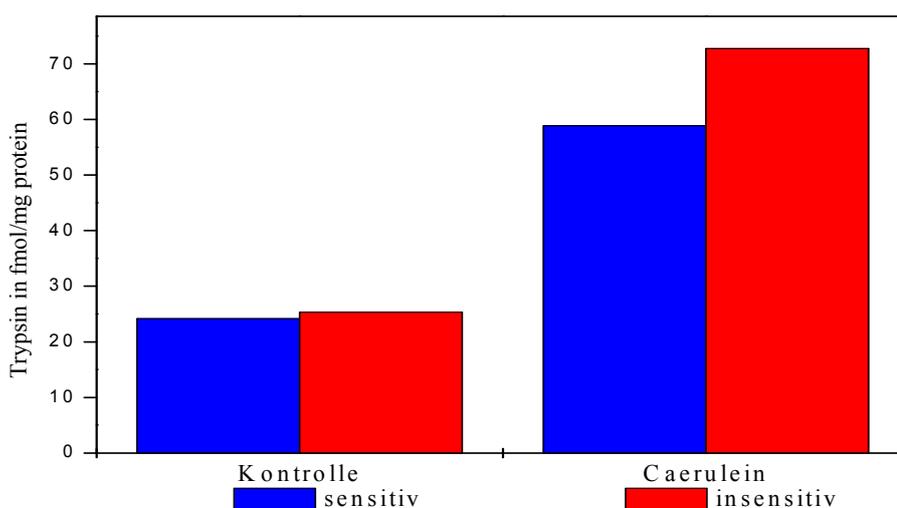


Abb. 2: Trypsinaktivität in pankreatischen Azini nach Caerulein-Hyperstimulation für 30 Minuten (*in vitro*); Substrat: 30 μ M Boc-QAR-AMC (vgl. 1A und B)

Abbildung 2 zeigt, dass die in den Azinuszellen nach Caerulein-Hyperstimulation auftretende Gesamttrypsinaktivität mit einem Anteil von 60-70% durch eine inhibitor-insensitive Trypsinaktivität (iiTA) determiniert wird. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der iiTA um eine intrazelluläre und durch Caerulein induzierbare Aktivität der exokrinen Pankreaszellen handelt.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Hemmbarkeit dieser Trypsinaktivität durch den Einsatz verschiedener Serinprotease-Inhibitoren bestimmt und zur Kontrolle mit der Inhibitorsensitivität eines mitgeführten kommerziell erhältlichen bovinen Trypsinpräparates verglichen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Wirkung verschiedener Serinprotease-Inhibitoren auf die tryptische Aktivität im Mäusepankreas nach Caerulein-Hyperstimulation (Zymogengranula-angereicherte Fraktionen der NMRI-Maus)

Inhibitoren	ZG-angereicherte Fraktion NMRI-Maus, 3h Caerulein	bovines Trypsin (Kontrolle)
10µM SBTI	-	+++
20µM SBTI	+	+++
1µM SPINK	-	+++
1.5µM Aprotinin	-	+++
2mM Benzamidin	+	+++
6mM Benzamidin	++	+++
50µM S124	+++	+++
40µM Leupeptin	+++	+++
10µM Futhan	++	+++
250µM Futhan	+++	+++

Inhibition:+++> 90% der Aktivität, ++ 51-90%, +11-50%, - -0-10%

Tabelle 1 zeigt, dass sich die Boc-QAR-AMC-spaltende Aktivität nur marginal durch proteinöse Inhibitoren, wie SBTI, SPINK oder Aprotinin hemmen ließ. Niedermolekulare synthetische Inhibitoren wirkten effektiver. Diese Substanzen konnten die iiTA hemmen, wenn auch ihr Potenzial im Vergleich zur Hemmung von bovinem Trypsin geringer war.

3.2 Untersuchungen zur Bestimmung des Molekulargewichtes und des isoelektrischen Punktes der Trypsinaktivität aus Pankreashomogenaten

Um die Trypsinaktivität näher zu charakterisieren wurde zunächst das Molekulargewicht und

der isoelektrische Punkt der zugeordneten Proteine mit Hilfe der ein- bzw. zweidimensionalen SDS-Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch anschließende Zymographie bestimmt. Die in den Pankreashomogenaten und subzellulären Fraktionen enthaltenen Trypsinaktivitäten wurden durch Fluoreszenz nach Substratspaltung und AMC-Freisetzung des in der Gelmatrix kopolymerisierten Trypsinsubstrats (Boc-QAR-AMC) detektiert.

3.2.1 1D-SDS-PAGE und Zymographie

Die Boc-QAR-AMC spaltende Aktivität wurde in zwei Aktivitätsbanden von 22,8 und 23,5 kDa nachgewiesen. Eine maximale Trypsinaktivität wurde in den Zymogengranulaangereicherten Fraktionen detektiert (siehe Abb. 3).

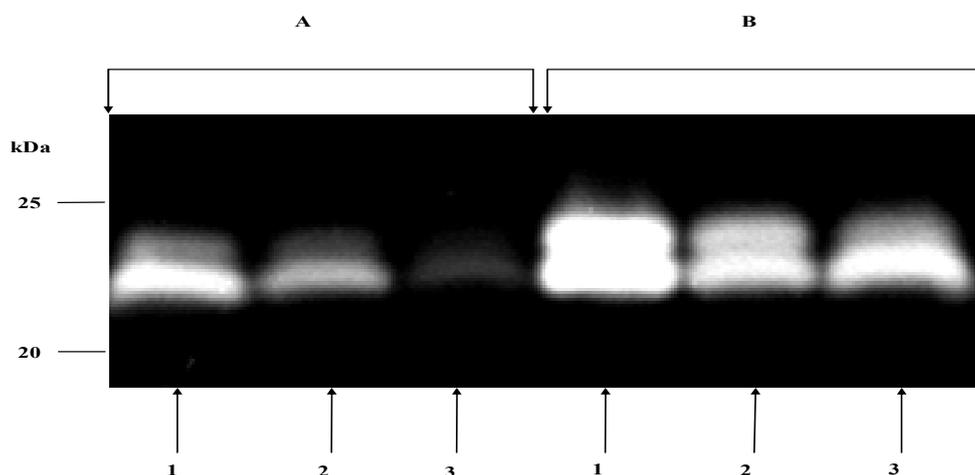


Abb. 3: Trypsin-Zymogramm aus Pankreasfraktionen nach differentieller Zentrifugation und 1D-SDS-Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen

A - Fraktionen des Kontrolltieres, B - Fraktionen der Caerulein-hyperstimulierten Maus.

A1, B1 – Zymogengranula-angereicherte Fraktion mit enthaltenen Lysosomen

A2, B2 – Vakuolen / schwere Mitochondrien

A3, B3 – Mikrosomenfraktion/ leichte Mitochondrien.

Die distinkten Banden im Molekulargewichtsbereich von 22 bis 24 kDa deuten stark auf Trypsin(e) als substratspaltende Aktivität hin. Die auftretenden Doppelbanden im Zymogramm (Abb. 3) könnten durch zusätzliche Prozessierung der Trypsine vor oder nach

ihrer Aktivierung erklärt werden. Daher wurde untersucht, ob die rekombinanten Maustrypsine 4, 8, 9, und 20 aus aufgereinigten Präparationen ebenfalls ein solches Verhalten aufweisen. Abbildung 4 zeigt die zugehörigen Zymogramme dieser rekombinanten Trypsin-Isoformen unter identischen Bedingungen.

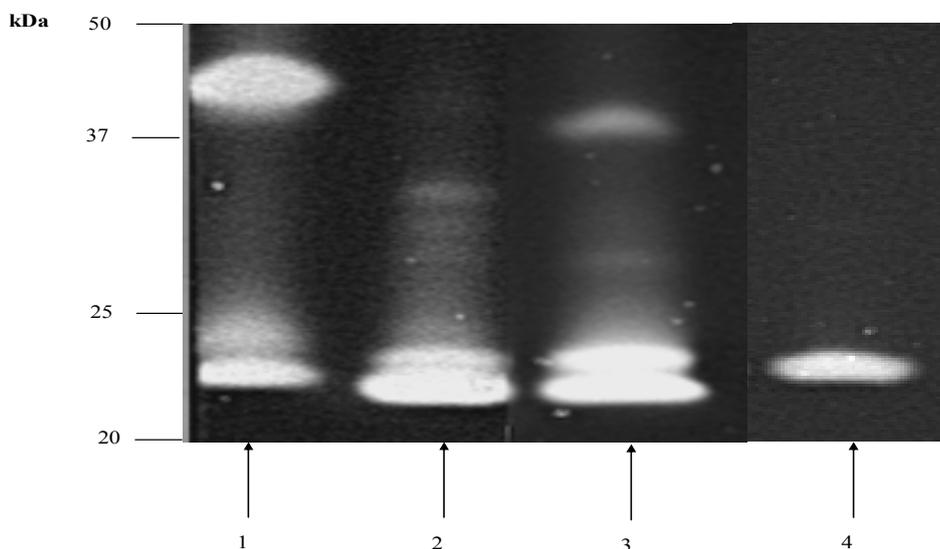


Abb. 4: Zymographie nach 1D-SDS PAGE der rekombinanten Maustrypsine 20, 9, 8, und 4

Die Maustrypsinogene wurden durch Enterokinase aktiviert.

- | | | | |
|----|----------------|----|---------------|
| 1- | Maustrypsin 20 | 2- | Maustrypsin 9 |
| 3- | Maustrypsin 8 | 4- | Maustrypsin 4 |

Die rekombinanten Maustrypsine 8, 9, 20, hatten ebenfalls eine Tendenz in 2 Banden im Gel zu laufen. Dagegen zeigte sich beim Maustrypsin 4 nur eine Bande der Aktivität im Zymographie-Gel. Da die Zymographie unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, war eine Dimerbildung der Trypsine nicht auszuschließen, die im MG-Bereich von 43 kDa zum Teil auch zu sehen war (Abb. 4).

3.2.2 2D-SDS PAGE, Zymographie

Mit Hilfe der zweidimensionalen Auftrennung der Proteine und anschließender Zymographie wurden die in ihrem Molekulargewicht sehr ähnlichen tryptischen Proteine zusätzlich entsprechend ihres unterschiedlichen isoelektrischen Punktes mit dem Ziel einer weiteren Differenzierung in anionische, kationische und mesotrypsinähnliche Isoformen aufgetrennt. Zur weiteren Charakterisierung wurde daher die Trypsinaktivität im Pankreas aus Zymogengranula-angereicherten Fraktionen im 2D-SDS- PAGE-Gel mit nachfolgender

Zymographie detektiert.

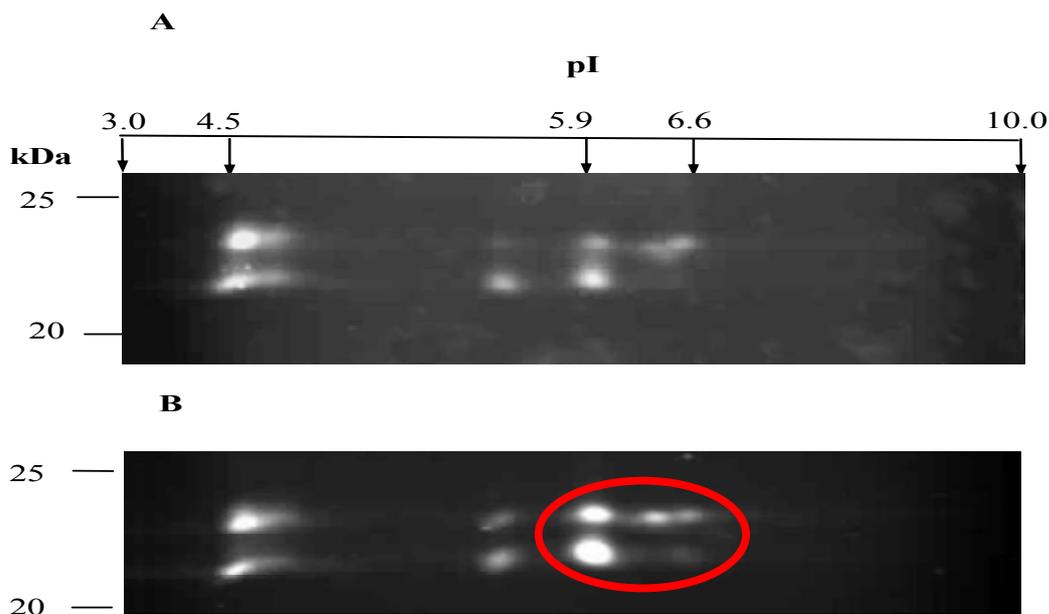


Abb. 5: Einfluss der Caerulein-Hyperstimulation auf die intrazelluläre Trypsinaktivität im Pankreas; Substrat: Boc-QAR-AMC (100 μ M)

A- 3h NaCl (Kontrolle),

B- 3h Caeruleinstimulation

Zur Vermeidung einer irreversiblen Hemmung von Trypsin wurde die isoelektrische Fokussierung der Proteine im linearen pH-Gradienten von pH 3 bis 10 sowie die anschließende Auftrennung im SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt (siehe Abb. 5). Im 2D-Trypsin-Zymogramm konnte die Gesamtrypsinaktivität in 5 Aktivitätsspot im pH-Bereich (pI) von 4,5 bis 6,6 mit einem Molekulargewicht von 22-23 kDa nachgewiesen werden.

Die Zymogramme der Kontroll- und Caeruleintiere zeigten ein ähnliches Muster, wobei nach der Hyperstimulation die Aktivitätsspot im mittleren pI-Bereich (pI 5,9; 6,6) stärker ausgeprägt waren (Markierung in B). Aufgrund des komplexen Spotmusters konnte eine Zuordnung der iiTA zu einem distinkten Aktivitätspot auf diese Weise nicht vorgenommen werden.

Zum Vergleich wurde daher eine 2D-Zymographie des rekombinanten Maustrypsins 4 durchgeführt. Das rekombinante Trypsin 4 wurde in mehreren Aktivitätsspot im isoelektrischen Bereich von 5,9 bis 7,0, nachgewiesen, die auf unterschiedliche Nettoladungen des Proteins unter nicht-reduzierenden Bedingungen zurückzuführen sind (Abb. 6).

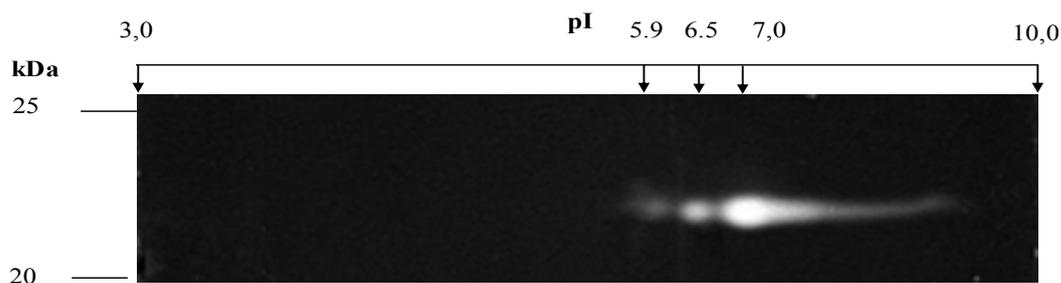


Abb. 6: 2D-Zymogramm nach Aktivierung von Maustrypsinogen 4 durch Enterokinase (linearer pI-Gradient 3-10).

Ein Vergleich der Spotmuster in Abbildungen 5 und 6 war nur bedingt möglich. Sollte die Aktivität von Trypsin 4 zur iiTA beitragen, könnten dafür die markanten Spots im mittleren pI-Bereich (siehe Abb. 5B) verantwortlich sein. Dafür spricht auch, dass Maustrypsin 4 als singuläre Bande bei 23,6 kDa auftritt, was auch in Abb. 5 A und B so interpretiert werden kann.

3.3 Molekulargewichtsbestimmung mittels HPLC-Gelfiltration.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der iiTA aus Gesamtpankreashomogenaten wurde eine Gelfiltration unter Einsatz einer Biosep Sec3000-Säule (siehe Abschnitt 2.3.5) durchgeführt und das Peakmaximum der iiTA in den Eluatfraktionen durch Aktivitätsmessung (siehe Abschnitt 2.3.6) bestimmt. Das Molekulargewicht der Proteine in den Eluatfraktionen wurde anhand einer mit Hilfe von Eichproteinen erstellten Kalibrationskurve durch Messung der Retentionszeit (siehe Tabelle 2) berechnet. Im Ergebnis dieser Größenfraktionierung konnte iiTA in den Trypsin(ogen) enthaltenden Fraktion 16 und damit im MG-Bereich von Trypsin bestimmt werden (Abb. 7). Demgegenüber konnte nach Enterokinase-Behandlung das in den Fraktionen nachfolgend durch Trypsin aktivierte Chymotrypsinogen nur in der Fraktion 18 bestimmt werden und entsprach damit in seiner Retentionszeit nicht den erwarteten Werten.

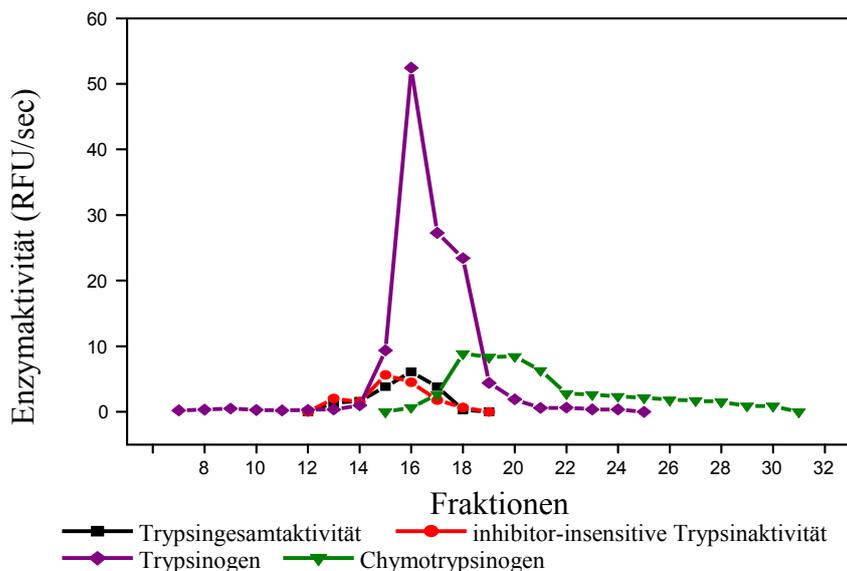


Abb. 7: Größenfraktionierung durch HPLC-Gelfiltration. Die Bestimmung der Peakmaxima von Trypsin bzw. von Trypsinogen und Chymotrypsinogen in den Elutionsfraktionen erfolgte durch Aktivitätsmessung vor bzw. nach Enterokinase-Behandlung.

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der iiTA wurde zunächst eine Kalibrierung der Säule mit Hilfe von Eichproteinen durchgeführt und folgender Verteilungskoeffizient K_D gemäß der nachstehenden Gleichung (siehe Tabelle 2) ermittelt:

$$K_D = (V_e - V_o) / (V_m - V_o)$$

V_e - Elutionsvolumen der Probe, V_m - Volumen der mobilen Phase, V_o - Zwischenkornvolumen der Säule.

Name des Proteins	MG (Da)	Retentionszeit (min)	Elutionsvolumen (ml)	K_D	berechnetes MG (Da)
Aldolase	177000	10,147	8,1176	0,2889	
Albumin	62900	10,696	8,5568	0,3392	61154
Ovalbumin	46700	11,121	8,8968	0,3781	48959
Chymotrypsinogen	20300	12,104	9,6832	0,4680	20752
Ribonuklease	14600	12,352	9,8816	0,4907	13636
unbekanntes Protein - iiTA		11,9	9,52	0,4493	26606

Tabelle 2. Kalibrierung der HPLC-Säule mittels Eichproteine

Unter der Annahme, dass der Verteilungskoeffizient abhängig und umgekehrt proportional

zum dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes ist, wurde nachfolgend eine Kalibriergerade durch lineare Regression erstellt, auf deren Basis das Molekulargewicht der iiTA mit 26606Da berechnet wurde.

Aus den bisher angeführten Experimenten zur proteinchemischen Charakterisierung der iiTA lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

Das Molekulargewicht der Proteine unter nativen Bedingungen wurde für die iiTA, isTA und Trypsinogen mit einem mittleren MG von etwa 25-26kDa berechnet. Damit konnte das mit Hilfe der Zymographie ermittelte MG mit geringen Abweichungen für die iiTA bestätigt werden (siehe Abb. 3 und 5).

Bei quantitativer Betrachtungsweise der aus Abb. 7 ersichtlichen Trypsinaktivität zeigte sich jedoch, dass der Anteil der iiTA und isTA am gesamten Trypsinogenpool nur sehr gering ist.

Die sehr ähnliche Permeationskinetik der iiTA mit Trypsinogen bzw. Trypsin, und das Auffinden beider Proteine in denselben Elutionsfraktionen legt nahe, dass es sich bei der iiTA sehr wahrscheinlich, um eine von Trypsin ausgehende Aktivität und demnach nicht um eine Tryptase mit einem von Trypsin differierendem Molekulargewicht handelt. Vielmehr könnte für die vorgefundene iiTA eine inhibitor-resistente Trypsin-Isoform oder die tryptische Pseudoaktivität von Trypsinogen verantwortlich

3.4 Untersuchungen zur Anreicherung der iiTA

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung der iiTA wurde eine Anreicherung bzw. Aufreinigung der assoziierten Proteine aus Pankreashomogenaten unter Einsatz chromatographischer Trennmethode durchgeführt. Die Problematik dieser Prozedur bestand darin, die iiTA von der isTA sowie von den quantitativ dominierenden Trypsinogenen zu separieren und zugleich die artifizielle Aktivierung von Trypsinogen zu minimieren.

Wie in Abb. 7 gezeigt, war eine Abtrennung der iiTA auf Basis der Molekülmassen von der in den Homogenaten außerdem enthaltenen isTA und dem Trypsinogen mit der Hilfe der im HPLC-Verfahren eingesetzten Gelfiltrationssäule BioSep-SEC-S3000 nicht erfolgreich. Daher wurden weitere Versuche zur Anreicherung und Aufreinigung der iiTA mit Hilfe der Affinitätschromatographie durchgeführt.

3.4.1 Benzamidin-Affinitätschromatographie

Zunächst wurde bestimmt, ob die geringere Affinität der iiTA gegenüber Benz-amidin-Derivaten wie aus den Experimenten (siehe Tabelle 1) ersichtlich, genutzt werden kann, um die isTA von der iiTA mit Hilfe der Affinitätschromatographie durch Bindung an eine Benzamidin-Sepharose-Säule abzutrennen. An Sepharose gekoppelte Benzamide sind aufgrund ihrer hohen Affinität in der Lage sowohl Trypsin als auch Trypsinogen aus komplexen Proteingemischen zu binden.

Nach Probenapplikation, Säulenpassage und dem Sammeln der Filtratfraktionen konnte nach Waschung der Säule ein Protein-Peak bei pH 2,0 eluiert und fraktioniert werden. Anschließend wurde die Trypsinaktivität in den Filtrat- und Eluatfraktionen mit Hilfe des fluorogenen Substrates Boc-QAR-AMC bestimmt (Abb. 8).

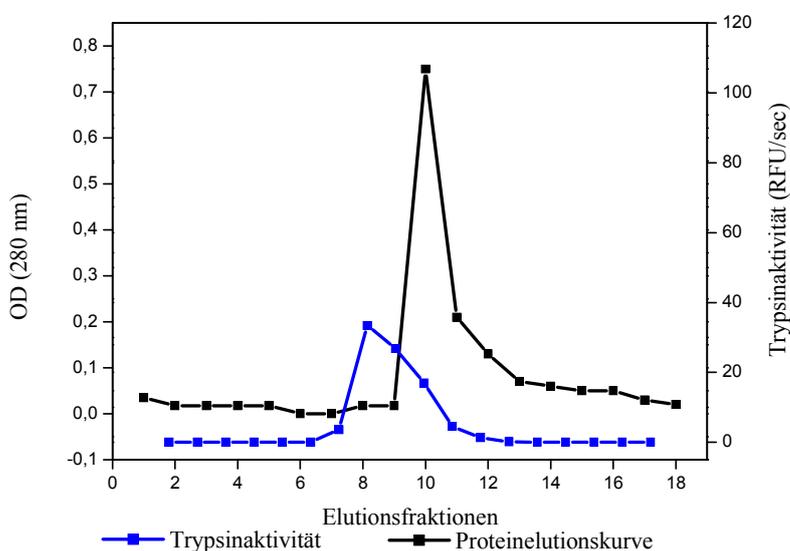


Abb. 8: Elutionsprofil der im Pankreashomogenat enthaltenen tryptischen Proteine nach Bindung an Benzamidin-Sepharose: Die Elution erfolgte mit Hilfe eines pH-Gradienten von pH 3,0 bis 2,0

Die Verhältnisse der sensitiven und insensitiven Trypsinaktivität der Ausgangsprobe sowie des Eluates und Filtrates sind im Säulendiagramm (Abb. 9) zusammengefasst.

Aufgrund der höheren Affinität gegenüber Benzamidin konnte mit Hilfe dieser chromatographischen Methode ausschließlich inhibitor-sensitives Trypsin eluiert werden. Dies äußerte sich dahingehend, dass die Trypsinaktivität im Eluat gegenüber der Ausgangsprobe 9fach erhöht und vollständig SBTI-hemmbar war. Demgegenüber reduzierte sich nach Säulenpassage der Anteil der noch messbaren iiTA im Filtrat von 92,5% auf 2,73% Restaktivität, während die sensitive Trypsinaktivität im Vergleich zur Ausgangsprobe kaum verändert war. Als Ursache hierfür könnte eine Verschiebung des Enzym-

Inhibitorgleichgewichtes zwischen Trypsin und endogenem Spink3 durch eine Benzamidin initiierte Verdrängungsreaktion und damit einer anteilmäßigen Erhöhung der SPINK3-Konzentration im Filtrat in Betracht kommen. Auch wäre eine artifizielle Inaktivierung der iiTA in den Filtratproben nicht auszuschließen.

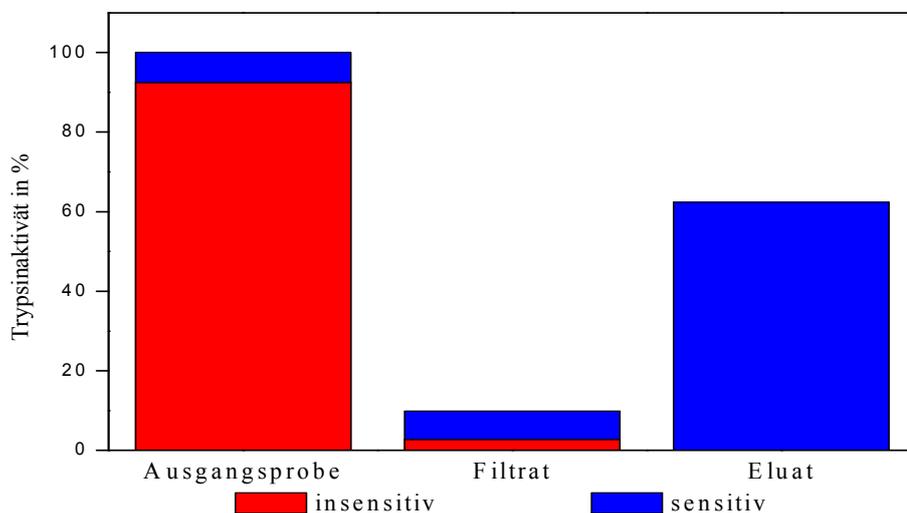


Abb. 9: Vergleich der Anteile der sensitiven und insensitiven Trypsinaktivität nach Aufreinigung an einer Benzamidin-Säule

Die Ergebnisse zeigten, dass die isTA erwartungsgemäß in den Eluatfraktionen enthalten war. Demgegenüber ließ sich die iiTA in diesen Fraktionen nicht nachweisen. Dies lässt vermuten, dass die iiTA nur eine unzureichende Bindungsaffinität gegenüber Benzamidin aufweist und damit nicht durch Benzamidin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann.

Zur Identifizierung der in der Eluatfraktion enthaltenen Trypsine wurde anschließend eine Trypsin-Zymographie nach zweidimensionaler Auftrennung der enthaltenen Proteine durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode konnte in der Eluatfraktion mit der isTA eine anionische Trypsin-Isoform mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 4,6 nachgewiesen werden (Abb. 10).

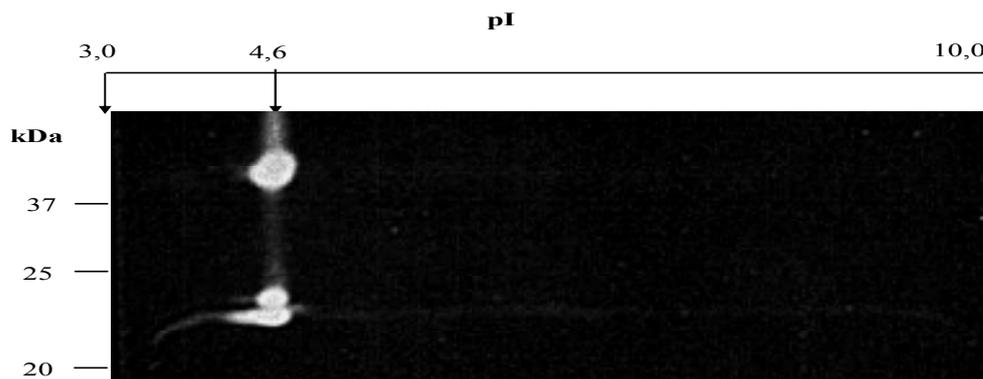


Abb. 10: Nachweis der im Eluat nach Benzamidin-Affinitätschromatographie enthaltenen isTA mittels Zymographie nach 2D-Elektrophorese

Aus dem Vergleich mit rekombinantem Maustrypsin 20 (siehe Abb.11) lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der in der Eluatfraktion enthaltenen isTA offensichtlich um das anionische Trypsin-Isoform 20 handeln könnte. Darüber hinaus wurde in den Zymographien (siehe Abb.10 und 11) ein Aktivitätspot im MG-Bereich 43,3 kDa detektiert, dessen Entstehung durch die Bildung von Trypsindimeren erklärbar wäre.

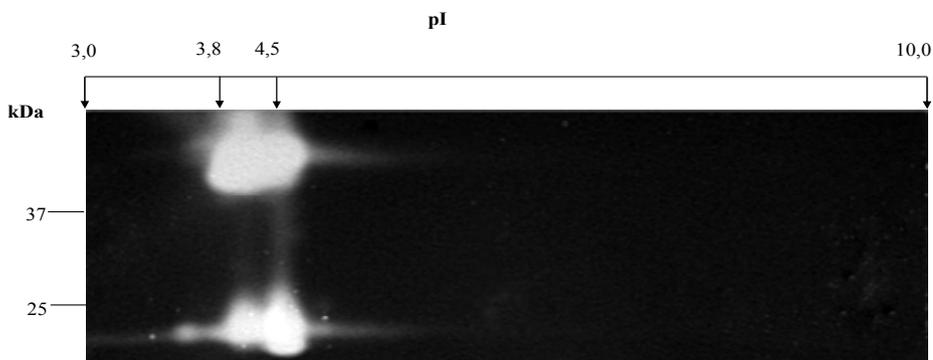


Abb. 11: 2D-SDS PAGE und Zymographie des Enterokinase-aktivierten rekombinanten Maustrypsinogens 20

Die isTA wird nach den Ergebnissen in Abb. 10 und 11 vermutlich durch das Maustrypsin 20 repräsentiert.

3.4.2 SBTI-Agarose-Affinitätschromatographie

Die SBTI-Agarose-Affinitätschromatographie wurde als eine weitere Methode eingesetzt, um

eine Anreicherung der insensitiven Aktivität oder eine Separation von den im Pankreashomogenat enthaltenen tryptischen inhibitor-sensitiven Proteinen zu erzielen. Nach Bindung und Elution der Proteine wurden die im Filtrat und Eluat enthaltene Trypsinaktivität auf ihre Sensitivität gegenüber SBTI untersucht und mit der Inhibitorresistenz der eingesetzten Ausgangsprobe verglichen (siehe Abb. 12).

Im Ergebnis der Chromatographie war die im Eluat enthaltene Trypsinaktivität vollständig hemmbar. Im Vergleich zur eingesetzten Ausgangsprobe war der Anteil der nach Säulenpassage im Filtrat vorhandenen iiTA um über 65% verringert.

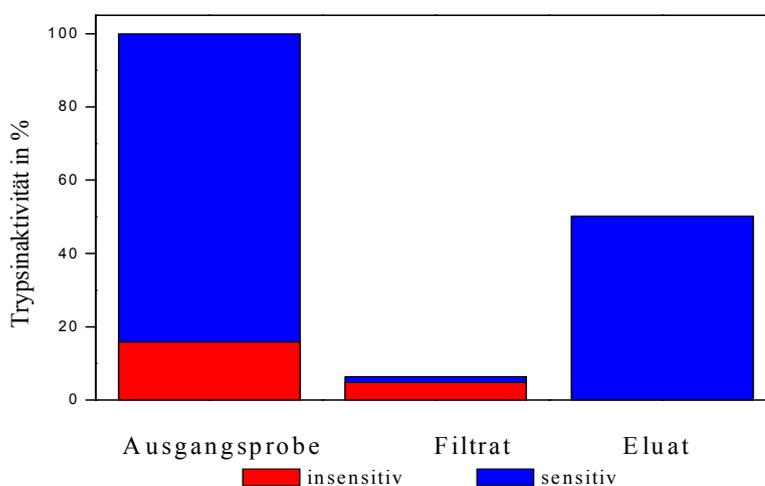


Abb. 12: Aufreinigung der inhibitor-insensitiven Trypsinaktivität durch SBTI-Affinitätschromatographie (Das Pankreas wurde in Gegenwart des reversiblen Trypsininhibitors S124 (10 μ M) homogenisiert).

Zum Nachweis der in den Filtrat- und Eluatfraktionen enthaltenen Trypsinaktivität und um eine von Trypsinogen ausgehende Pseudoaktivität auszuschließen, wurde eine Trypsin-Zymographie nach eindimensionaler Auftrennung der Proteine im SDS PAGE durchgeführt.

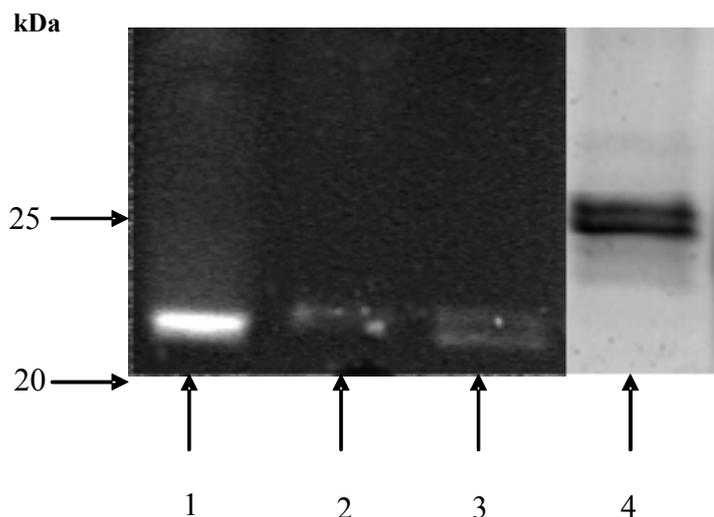


Abb. 13: Nachweis von Trypsin mittels Zymographie in Pankreashomogenat als Ausgangsprobe (1) sowie im Filtrat (2) und Eluat (3) nach SBTI-Affinitätschromatographie. Die im Eluat in (4) enthaltenen Trypsinogene erscheinen in der Coomassie-Färbung als Doppelbande.

Mit Hilfe der Zymographie wurden die aktiven Trypsine in 2 Banden mit einem Molekulargewicht von 22,8 und 23,5 kDa detektiert. Die ebenfalls an die Säule gebundenen Trypsinogene reagierten demgegenüber nach ihrer Bindung und Koelution mit den Trypsinen inert, da keine zusätzlichen Zymographie-Banden im MG-Bereich von 25kDa detektiert wurden. Die im Eluat enthaltenen Proteine Abb.13 (4) erschienen in der Coomassie-Proteinfärbung als Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 25kDa und entsprachen somit dem MG-Gewicht von Trypsinogenen. Hierdurch wurde gezeigt, dass von Trypsinogenen keine tryptische Pseudoaktivität ausging.

Durch die SBTI-Affinitätschromatographie war es möglich, die inhibitor-insensitive Trypsinaktivität im Filtrat indirekt durch Säulenbindung der isTA selektiv anzureichern (Abb. 12). Zur Identifizierung der enthaltenen Trypsin-Isoenzymmuster in den Fraktionen wurde nachfolgend eine Trypsin-Zymographie nach zweidimensionaler SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 14). Dabei zeigte das Filtrat ein vom Eluat abweichendes Spotmuster.

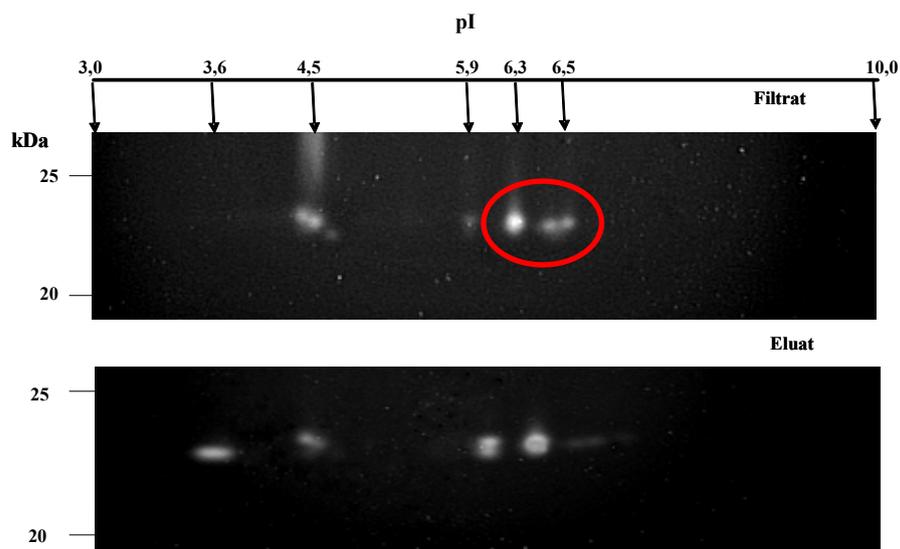


Abb. 14: 2D-Zymogramme von den SBTI-Agarose-Filtrat- und Eluat-Fractionen der Zymogengranula-angereicherten Fraktion, die den Fraktionen 2 und 3 (Abb. 13) entsprechen

Aus dem Vergleich der Verteilung der erhaltenen Spotmuster zeigte sich, dass der Aktivitätsspot in der Filtratprobe im pI-Bereich von Trypsin 4 (pI 6.5) deutlicher ausgeprägt war und demzufolge auf eine Bindung der mesotrypsinähnlichen Isoformen 4 bzw. 5 deuten kann.

Das Muster der Aktivitätsspots des Eluats in Abb. 14 ähnelte dem Muster in Abb. 5 B, jedoch unterscheidet sich deutlich vom Spotmuster des Eluats in Abb. 10 nach Benzamidin-Affinitätschromatographie.

Jedoch zeigen diese Experimente auch, dass eine effektive Aufreinigung der iiTA auf diesem Wege nicht zu erreichen ist, vor allem, wenn man berücksichtigt, dass im Filtrat andere nicht bindende Proteine enthalten sind.

Zur weiteren Charakterisierung der Eigenschaften der iiTA und einer potenziellen Zuordnung zu den rekombinanten Trypsin-Isoformen wurde die Hemmbarkeit der in den Eluat- und Filtratfraktionen nach Affinitätschromatographie enthaltenen Trypsine durch Trypsininhibitoren untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die Untersuchung auf eine Veränderung der SBTI-Inhibitionresistenz der iiTA und isTA infolge einer vorgeschalteten Trypsin-Affinitätschromatographie durch Titration gegen SBTI (siehe Abb. 15).

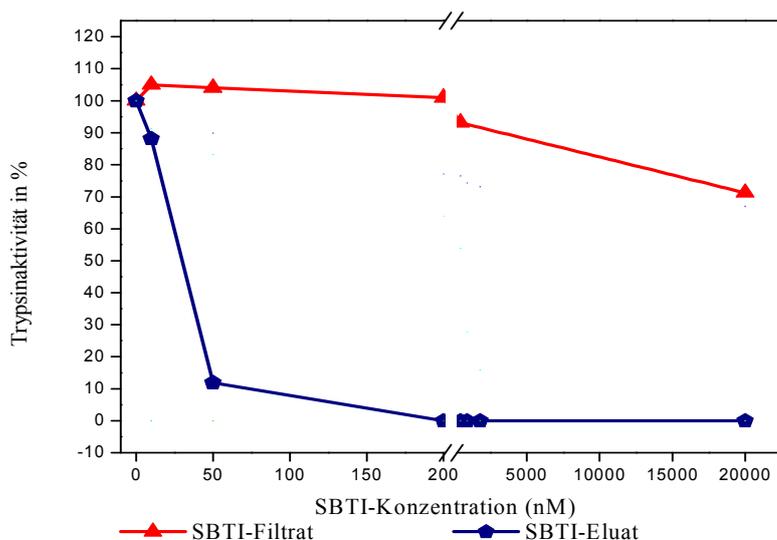


Abb. 15: Titration des in den Eluat- und Filtratfraktionen enthaltenen Trypsins nach SBTI-Affinitätschromatographie

Die in der Filtratfraktion nach Trypsin-Affinitätschromatographie nachgewiesene SBTI-Inhibitorresistenz (siehe Abb. 15) war der von rekombinanten Mesotrypsin 4 bzw. 5. sehr ähnlich (siehe Abb. 17). Es bestätigte sich, dass sich das Filtrat als inhibitor-insensitiv und das Eluat als SBTI-sensitiv darstellte.

Die Untersuchungen zur Anreicherung der iiTA mittels Affinitätschromatographie lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass weder über Benzamidin- noch SBTI-Bindung eine angereicherte iiTA-Probe zu gewinnen war, die zur weiteren Charakterisierung verwendbar ist. Im Filtrat nach SBTI-Affinitätschromatographie lässt sich eine relative Anreicherung der iiTA gegenüber der isTA bei deutlicher Abtrennung weiterer Proteine erreichen. Diese insensitive Trypsinaktivität des SBTI-Filtrats zeichnete sich, wie in der Ausgangsprobe durch folgende Eigenschaften: Die Aktivitätssots des Filtrats liegen bei Zymographie nach 2D-SDS-PAGE im Molekulargewicht- und pI-Bereich des Trypsins 4 und ist bei Titration nicht durch hohe SBTI- Konzentrationen (bis 20 μ M) hemmen.

3.5. Untersuchungen zur Hemmbarkeit rekombinant exprimierter Trypsine der Maus

Da die Anreicherung der iiTA nur bis zu einem bestimmten Grad möglich war und diese Methoden nur zur Zunahme der isTA führten, wurde ein zusätzlicher Weg zur weiteren

Charakterisierung und Identifizierung der iiTA besprochen. Durch Charakterisierung der Maustrypsin-Isoformen, die wir rekombinant exprimiert haben (unpublizierte Ergebnisse), sollte der Kreis der für die inhibitor-insensitive Aktivität in Frage kommenden Kandidaten eingegrenzt werden. Die rekombinante Maustrypsinase wurden gegen SPINK 3 (Maus-SPINK) und SBTI titriert. Wie in Abb. 17 und 18 dargestellt ist, sind die Maustrypsinase 4 und 5 im Vergleich zu anderen Isoformen schlecht hemmbar. Die anderen Isoformen ließen sich durch diese beiden Hemmstoffe effizient inhibieren.

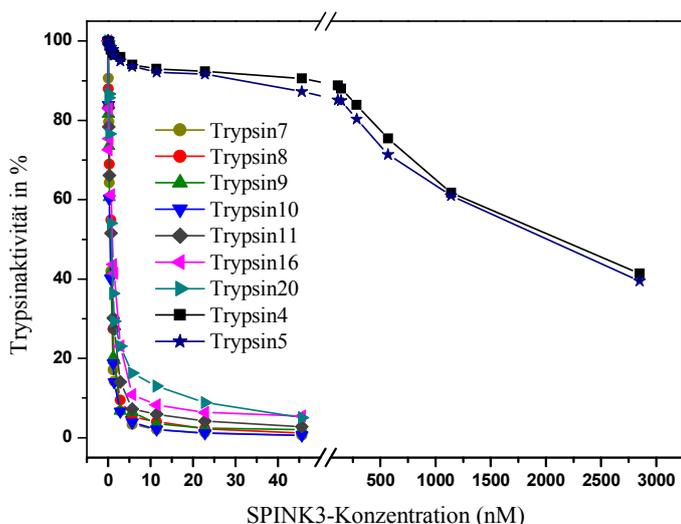


Abb. 16: Titration rekombinanter Maustrypsinase gegen rekombinantes SPINK 3.

Die Titration erfolgte nach kumulativer Zugabe von rekombinantem SPINK3 zu einer vorgelegten Trypsinmenge durch kinetische Fluoreszenzmessung der Trypsinaktivität mit dem Substrat Boc-QAR-AMC (siehe Abschnitt 2.3.6).

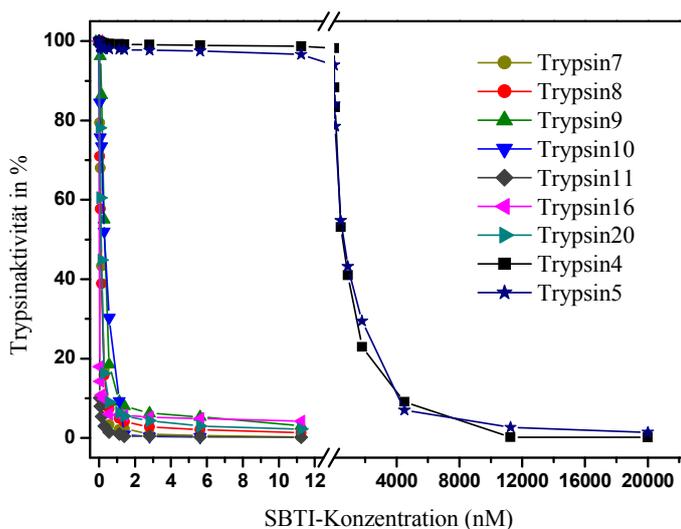


Abb. 17: Titration rekombinanter Maustrypsine gegen SBTI

Die Titration erfolgte nach kumulativer Zugabe von nativem SBTI zu einer vorgelegten Trypsinmenge durch kinetische Fluoreszenzmessung der Trypsinaktivität mit dem Substrat Boc-QAR-AMC. (siehe Abschnitt 2.3.6)

Aus den Ergebnissen in den Abbildungen 16 und 17 wurde gezeigt, dass von allen bisher bekannten Trypsin-Isoformen der Maus nur die mesotrypsin-ähnlichen Isoformen 4 und 5 eine deutlich erhöhte Inhibitor-Resistenz im Vergleich zu den anderen Isoformen aufweisen. Sie können daher als potenzielle Kandidaten zur Ausprägung der iiTA in Betracht gezogen werden. Ähnliche Rückschlüsse zeigten auch die Zymographie-Experimente (siehe Abbildungen 5, 6 und 14).

Die Trypsine 4 und 5 zeigten ein nahezu identisches Hemmverhalten auch bei höheren SBTI-Konzentrationen $>2\mu\text{M}$. Beide Isoformen wiesen in Gegenwart von $20\mu\text{M}$ SBTI nur noch 3-5% Restaktivität auf. Die aufgezeigten Unterschiede im Hemmverhalten zwischen der iiTA und den rekombinanten Isoformen deuten daraufhin, dass die Aktivität der Trypsin-Isoformen, und speziell von Trypsin 4 oder 5, in Gegenwart hoher (physiologisch durchaus relevanter) endogener Inhibitormengen modifiziert wird.

3.6 Untersuchungen zur Bestimmung der Rolle von freien intrazellulären Inhibitoren

Literaturdaten und die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich die messbare Trypsinaktivität nach Caerulein-Hyperstimulation in der Größenordnung von $< 1\%$ der

Gesamt-Trypsinogenmenge bewegt. Andererseits ist bekannt, dass die endogene Inhibitor Kapazität im exokrinen Pankreas 5 bis 20% des vorhandenen aktivierbaren Trypsinogenpools hemmen kann.

Neben der Existenz der von uns gezeigten iiTA besteht ein weiteres wesentliches Resultat der Untersuchungen darin, dass wir kaum eine isTA nach Caerulein-Hyperstimulation fanden. Eine Erklärung dafür wäre die sofortige Inaktivierung hemmbarer Trypsin-Isoformen durch im gleichen Kompartiment vorhandenes SPINK. Für die Frage, ob ein modifizierender Einfluss von SPINK auf die insensitiven Trypsine 4 oder 5 zu erwägen ist, ist es zunächst erforderlich zu prüfen, ob im Pankreashomogenat „freies“ SPINK nachzuweisen ist.

3.6.1 Bestimmung der endogenen Inhibitor Kapazität des Pankreashomogenats durch Hemmung von bovinen Trypsins

Im Homogenat des Pankreasgewebes sind vor allem SPINK und möglicherweise ein Bruchteil seröser Trypsininhibitoren als freie Inhibitoren enthalten, deren Hemmkapazität durch Titration gegen Trypsine quantitativ bestimmt werden kann und nachfolgend als „endogene Inhibitor Kapazität“ bezeichnet wurde.

Da bovines Trypsin im äquimolaren Verhältnis effizient durch Trypsin-Inhibitoren, wie Maus-SPINK gehemmt wird ist es daher möglich, die in den Pankreashomogenaten enthaltene Konzentration an „freien Trypsin-Inhibitoren (Inhibitor Kapazität) durch Titration gegen bovines Trypsin zu bestimmen.

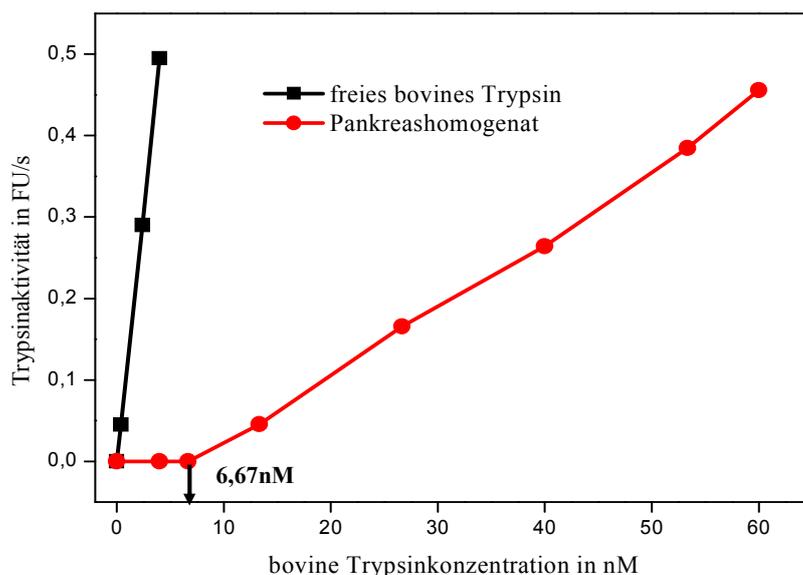


Abb. 18: Bestimmung der endogenen Inhibitorkapazität des Pankreashomogenates durch Zugabe des bovinen Trypsins

Durch diese Versuche wurde gezeigt, dass sich erst nach Zugabe von mehr als 266 fmol bovinem Trypsin zu 12 μ l Pankreashomogenatprobe die Trypsinaktivität signifikant erhöht und im weiteren Verlauf mit der zugesetzten Trypsinkonzentration proportional ansteigt (Abb.18). Auf der Grundlage dieser Experimente wurde eine zur eingesetzten Trypsinmenge adäquate Inhibitorkapazität im Pankreashomogenat, von 6,67 nM bzw. 953,43 fmol/mg Protein ermittelt. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass auch nach Induktion der experimentellen Pankreatitis noch überschüssiges und freies SPINK in den Pankreashomogenaten vorhanden ist.

3.6.2 Interaktion von Maustrypsin 4 mit SPINK3 als mögliche Ursache für die Ausprägung der iiTA

Als Ursache für die Ausprägung der inhibitor-insensitiven Trypsinaktivität (iiTA) könnte eine Interaktion zwischen Trypsin 4/5 und dem endogenen Inhibitor SPINK3 bzw. eine potenzielle Modifikationen innerhalb der Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes verantwortlich sein. Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese wurde versucht, die Aktivität an inhibitor-insensitivem Trypsin im Pankreashomogenat konditionell zu erhöhen, in dem rekombinantes

Trypsin 4 zu einer Pankreashomogenatprobe mit freiem SPINK3 hinzugesetzt wurde (Abb.19).

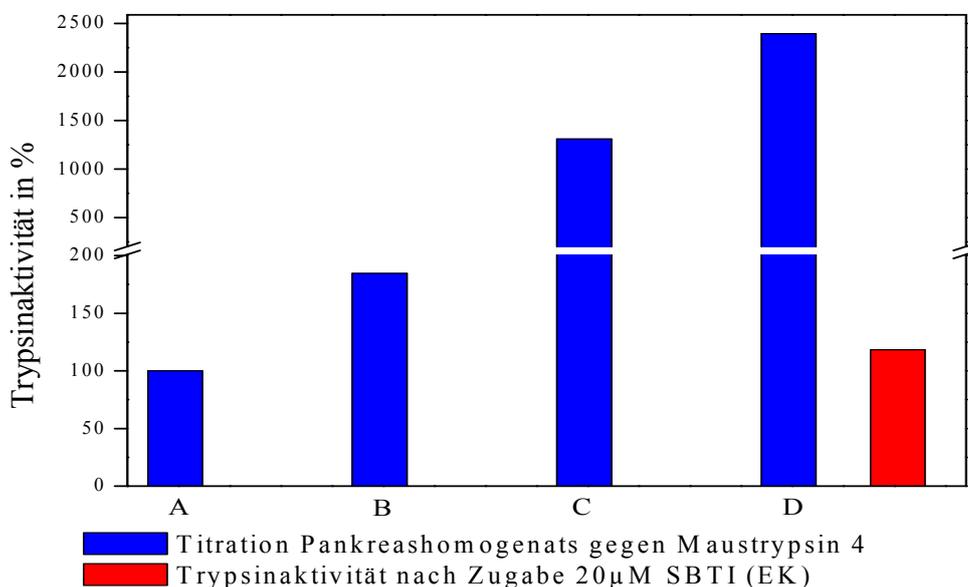


Abb. 19: Anstieg der Trypsinaktivität bei kumulativer Zugabe von Maustrypsin 4 in eine Pankreashomogenatprobe

A-D: Trypsinaktivität im Pankreashomogenat vor bzw. nach Zugabe von 269,5fmol; 3,6pmol; 5,4pmol rekombinantes Maustrypsin 4

Nach kumulativer Zugabe des Maustrypsins 4 zum Pankreashomogenat erhöhte sich die Gesamtrypsinaktivität in der Probe entsprechend. Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, dass die zugesetzte Aktivität an Maustrypsin 4 nach Zugabe von 20 μ M SBTI vollständig hemmbar war (Abb. 19). Wie aus diesem Experiment ersichtlich, beeinflusste die Zugabe des Maustrypsins 4 die Höhe der endogenen iiTA nicht. Zum Vergleich sind ebenso Gesamtrypsinaktivität und Hemmbarkeit des eingesetzten Pankreashomogenates gezeigt. Durch nachfolgende Versuche mit Zymogengranula-Fractionen als Ausgangsprobe konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. (Daten nicht gezeigt).

Im Abschnitt 3.6.1 wurde gezeigt, dass das Pankreashomogenat noch überschüssiges und freies SPINK besitzt. Möglicherweise kann SPINK3 des Homogenats durch Interaktion mit Maustrypsin 4 eine iiTA erzeugen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die Messung der Aktivität von Maustrypsin 4 bei kumulativer Zugabe von Pankreashomogenat vorgenommen (Abb. 20).

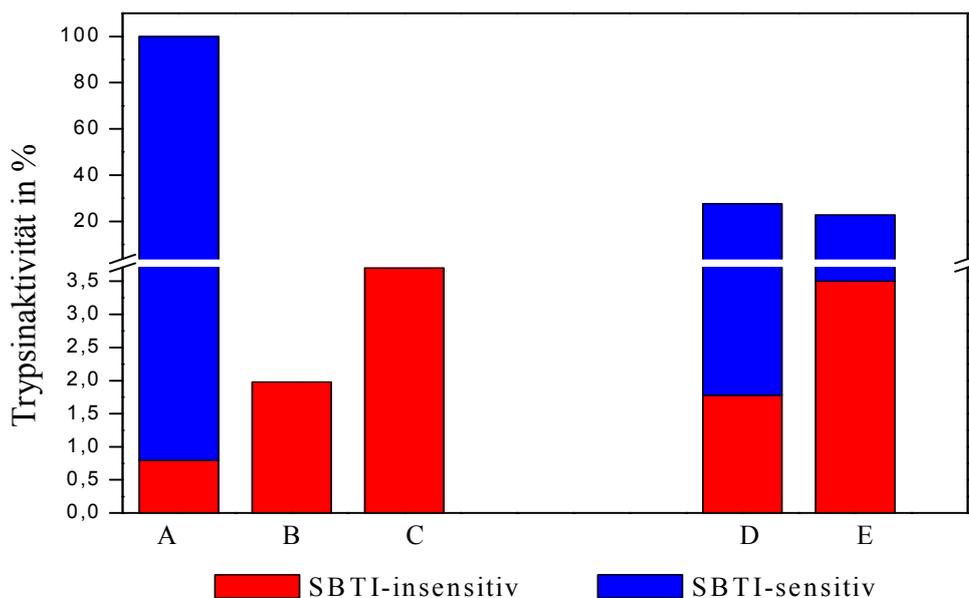


Abb. 20: Inhibition der Aktivität von Maustrypsin 4 bei kumulativer Zugabe von Pankreashomogenat

A - Ausgangsaktivität des Maustrypsins 4; B, C - Trypsinaktivität von 12 μ l bzw. 24 μ l Pankreashomogenat;

C, D - Aktivität des Maustrypsins 4 nach Zugabe 12 μ l bzw. 24 μ l Pankreashomogenats

Wie die Ergebnisse in Abb. 20 verdeutlichen, konnte rekombinantes Maustrypsin 4 durch die im Pankreashomogenat enthaltene Konzentration an freiem endogenen Trypsin-Inhibitor SPINK3 signifikant gehemmt werden. So wies dieses Enzym nach Zugabe von 24 μ l Pankreashomogenat nur noch eine Restaktivität von etwa 20% auf. Da jedoch das eingesetzte Maustrypsin 4 nach Zugabe von 20 μ M SBTI vollständig hemmbar war und die gemessene inhibitor-insensitive Aktivität nur mit der eingesetzten Pankreashomogenatmenge korrelierte (siehe Abb.20), war davon auszugehen, dass die in den Pankreashomogenaten auftretende inhibitor-insensitive Trypsinaktivität nicht spontan induziert bzw. auf eine kompetitive Hemmung des „inhibitor-resistenten“ Maustrypsins 4 zurückgeführt werden konnte. Es kann daher postuliert werden, dass die iiTA möglicherweise durch eine „gebundene“ Trypsinform hervorgerufen wird, die auf eine nachfolgende Modifikation des SPINK3-Trypsin-Inhibitorkomplexes basiert.

3.7 Hemmbarkeit aktivierbarer endogener Trypsinogene aus ZG-angereicherten Fraktionen

Wenn die iiTA auf die distinkte Eigenschaft einer bestimmten Trypsin-Isoform zurückzuführen ist, sollte sie auch im Trypsinogen-Pool einer nicht mit Caerulein stimulierten Maus enthalten und nach Enterokinase-Aktivierung nachweisbar sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde daher der endogene Trypsinogen-Pool aus einer Zymogengranula-angereicherten pankreatischen Fraktion mit Enterokinase aktiviert und nach zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen die Verteilung der Trypsinaktivität im Gel mittels Zymographie ohne bzw. mit vorheriger Beaufschlagung der Probe mit 20 μ M SBTI untersucht. Während in der SBTI-freien Probe die Trypsinaktivität in mehreren Spots nachgewiesen wurde, konnten in Gegenwart von 20 μ M SBTI keine Aktivitätsspotspots detektiert werden. Durch diesen Versuch zeigte sich, dass die nach Enterokinase-Aktivierung in der 2D-Zymographie detektierbaren Trypsinspotspots sensitiv auf eine Hemmung durch SBTI reagierten.

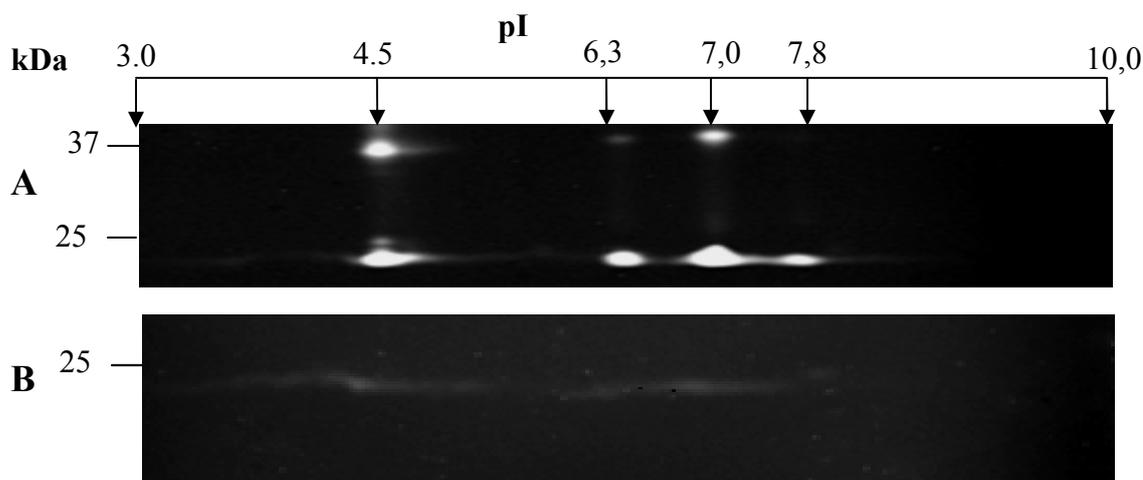


Abb. 21: In-Gel-Trypsinaktivitätsnachweis (2D-Zymogramm) der endogenen Trypsinogen-Isoformen aus der ZG-Fraktion nach Enterokinase-Aktivierung: (A) ohne SBTI-Zugabe, (B) in Gegenwart von 20 μ M SBTI .

Wie bereits in Abb. 5, 10 bzw. 14 gezeigt wurde, war das kationische Maus-Trypsin 7 im pI-Bereich von 8,7 aufgrund seiner hohen autolytischen Aktivität mit dieser Methode nicht nachweisbar. Demgegenüber konnte die Präsenz dieser Isoform als Trypsinogen im Elektropherogramm nach Silberfärbung mittels Massenspektrometrie identifiziert und bestätigt werden (Makarov et al, 2004, Abstrakt).

Die Ergebnisse in Abb. 21 geben keinen Hinweis auf die Existenz einer durch Enterokinase

aktivierbaren Proform der iiTA. Mögliche Erklärungen hierfür wären, dass die iiTA entweder nicht durch die Eigenschaften einer oder mehrere Trypsinogen-Isoformen determiniert wird oder die Proform bei Enterokinase-Aktivierung keine ausreichende proteolytische Stabilität aufweist.

Im Falle, dass die iiTA im Vergleich zu den anderen Trypsinogen-Isoformen von einer SPINK3-resistenten, geringer exprimierten Proform gebildet wird, deren Ausprägung auf eine zusätzliche Komplexierung mit endogenem Spink3 beruht, wäre bei einer Enterokinase-Aktivierung der gesamten Trypsinogene der endogene Spink3-Pool aufgrund der Hemmung sensitiver Trypsine schnell erschöpft. Unter diesen Bedingungen wäre das gesamte endogene SPINK mit sensitiven Isoformen assoziiert und nach Erschöpfung des endogenen SPINK nur sensitive Trypsine messbar. Wie durch Untersuchungen bestätigt wurde, war das nach Enterokinase-Aktivierung messbare Trypsin tatsächlich vollständig mit 20 μ M SBTI hemmbar.

Nicht zuletzt ist bei den durchgeführten Experimenten in Rechnung zu stellen, dass die in den Pankreashomogenaten nach Aktivierung des gesamten Trypsinogen-Pools gemessene Trypsinaktivität im Vergleich zur Trypsinogenaktivierung bei Pankreatitis um den Faktor 10^3 bis 10^4 ansteigt. Die Bestimmung der Aktivität der nur in geringer Konzentration vorhandene und die iiTA bestimmende Trypsinogen-Isoform wäre damit erheblich erschwert.

4 Diskussion

4.1 Proteasenaktivierung als frühes Ereignis der akuten Pankreatitis und die pathophysiologische Rolle des Trypsins

Vor über einem Jahrhundert formulierte Chiari (1896) die Hypothese, dass die Pankreatitis Folge einer Selbstverdauung des Organs ist. Diese Hypothese wurde durch nachfolgende Untersuchungen bestätigt, indem man bei humaner Pankreatitis aktivierte Pankreasenzyme fand. Ein weiterer Hinweis auf die Proteasenaktivierung ist das Auftreten des abgespaltenen Propeptids des Trypsinogens (TAP) (Gudgeon et al. 1990, Schmidt et al. 1992, Mithofer et al. 1998) im Pankreas, Blutserum und Urin. Da TAP spezifisch die intrapankreatische Konversion von Trypsinogen zu Trypsin widerspiegelt und äquimolar dem freigesetzten Trypsin entspricht, können durch die Bestimmung der TAP-Konzentration im Blut gleichzeitig Rückschlüsse auf die Schwere der Erkrankung gezogen werden (Neoptolemos et al. 2000).

Digestive Proteasen sind potenziell zellschädigend. Daher steht das therapeutische Konzept der Proteaseninhibierung nach wie vor im Mittelpunkt der experimentellen Pankreatitisforschung.

Die Umwandlung von Trypsinogen zu aktivem Trypsin ist dabei insofern ein zentrales und zugleich kritisches Ereignis, da Trypsin die gesamte Enzymkaskade der pankreatischen Verdauungsproteasen initiieren kann. Zum Schutz vor einem durch Trypsin ausgelösten proteolytischen Selbstverdau verfügt das Pankreas über eine Reihe von Schutzmechanismen. Einerseits wird Trypsinogen erst im Duodenum spezifisch durch die Enterokinase aktiviert. Andererseits erfolgt die Kompartimentierung der Zymogene in den Azinuszellen in sauren Organellen bei einer niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentration. Darüber hinaus wird durch weitere Schutzmechanismen einer unphysiologischen Trypsinogenaktivierung entgegen gewirkt, wie die Produktion endogener Inhibitoren z.B. von SPINK, die Autoinaktivierung durch Spaltung von Trypsin an Position R122 oder eine Inaktivierung durch Spaltung durch Chymotrypsin C (Szmola, Sahin-Toth 2007). Im Falle einer bei akuter Pankreatitis auftretenden vorzeitigen Trypsinogenaktivierung müssen diese „Schutzmechanismen“ versagt haben, d.h. die strikte Kompartimentierung bzw. das intraorganelle Milieu, welches einer Trypsinogenaktivierung entgegenwirkt, ist verändert. Wie gezeigt wurde, geht die intrazelluläre Trypsinogenaktivierung gleichzeitig mit einer zunehmenden Fragilität der

Zellorganellen einher, so dass nach deren Ruptur die aktivierten Verdauungsenzyme den freien zytoplasmatischen Raum erreichen und dort eine Zellschädigung verursachen können (Lerch, Halangk et al. 2000).

Für eine vorzeitige Trypsinogenaktivierung bei akuter Pankreatitis werden im Wesentlichen zwei Mechanismen diskutiert. Auf der einen Seite wird die Autoaktivierung unter schwach sauren Bedingungen - „Autoaktivierungshypothese“ diskutiert, auf der anderen Seite wird die Hypothese einer Aktivierung durch die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin B - „Kokolokalisationshypothese“ favorisiert. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die Erforschung der frühen pathophysiologischen Ereignisse an Patienten mit akuter Pankreatitis schwierig ist, weil Gewebeproben der Erkrankten in frühen Stadien der AP aus ethischen Gründen nicht gewonnen werden können (Dugernier et al. 2003). In klinischen Studien wurde dennoch das aktive Trypsin in mehr als 80% der Proben der Thorakallymphe und des Peritonealexsudates von Patienten mit frühen Stadien der AP gefunden (Dugernier et al. 2005).

Aufgrund der unzugänglichen frühen pathophysiologischen Vorgänge beim Menschen wurden verschiedene tierexperimentelle Modelle zur Untersuchung der initialen Ereignisse der AP etabliert. Die Aktivierung des sekretorischen Zymogens Trypsinogen in der Frühphase der experimentellen Pankreatitis konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Bialek et al. 1991; Lüthen et al. 1995) und gilt heute als ein etabliertes Charakteristikum der AP.

Die zentrale Rolle des Trypsins in der Pathogenese der AP erhielt starke Unterstützung durch Befunde der letzten zwölf Jahre, bei denen eine Reihe von genetischen Veränderungen im Gen des kationischen Trypsinogens gefunden wurden (Withcomb et al. 1996), die mit humaner Pankreatitis assoziiert sind. Die proteinchemische und enzymatische Untersuchung solcher mutierten Trypsinogene ergab für die meisten Formen eine erleichterte Aktivierung und/oder eine verzögerte proteolytische Inaktivierung. Diese Befunde wurden als Argumente für die „Autoaktivierungshypothese“ der Trypsinogene bei akuter Pankreatitis herangezogen.

Bei Betrachtung des Vorganges der Autoaktivierung von Trypsinogen in pankreatischer Azinuszellen ist zu berücksichtigen, dass dem aktivierten Trypsin im gleichen Kompartiment ein beträchtliches Potenzial an endogenem Trypsin-Inhibitor SPINK gegenüber steht, was das entstehende Trypsin unmittelbar hemmen kann.

Alternativ zu dieser Autoaktivierung geht die Hypothese einer Cathepsin B-bedingten Trypsinogenaktivierung davon aus, dass diese Cysteinprotease auch in Gegenwart von SPINK zu einer wirksamen Trypsinogenaktivierung befähigt ist. Aktuelle Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass Cathepsin B zudem in der Lage ist, SPINK zu spalten und zu inaktivieren. Es ist daher davon auszugehen, dass in Folge einer Erschöpfung der

Inhibitor Kapazität durch eine proteolytische Inaktivierung von SPINK vermehrt aktives Trypsin durch Autoaktivierung freigesetzt wird (Wartmann et al. 2006).

Es sind heute eine Reihe überzeugender experimenteller Hinweise erarbeitet worden, die eine pathophysiologische Bedeutung von Cathepsin B in der Entstehung einer AP unterstreichen:

-die enzymatische Spaltung von Trypsinogenen durch Cathepsin B (Greenbaum et al. 1959, Figarella et al. 1988, Szilágyi et al. 2001, Lindkvist et al. 2006);

-in vitro Experimente an pankreatischen Azini mit Cathepsin B-Inhibitoren (Saluja et al. 1997);

-in vivo-Untersuchungen mit Hemmstoffen des Cathepsins B (Van Acker et al. 2002);

-in vivo-Untersuchungen an Cathepsin B knock-out-Mäusen (Halangk et al. 2000).

4.2 Charakterisierung der frühen Trypsinogenaktivierung am Caerulein-Hyperstimulationsmodell der Maus

Zur Untersuchung der pathophysiologischen Abläufe in der Frühphase einer AP wird gegenwärtig am häufigsten das Modell der hormonellen Hyperstimulation mit Caerulein eingesetzt. Es wurde ursprünglich von Lampel und Kern (1977) an der Ratte etabliert. Heute wird jedoch dafür hauptsächlich die Maus eingesetzt, da ihr Genom vollständig sequenziert und daher besser manipulierbar ist.

Hohe Dosen an Caerulein i.v. oder i.p. rufen im exokrinen Pankreas die typischen intrazellulären Veränderungen und das charakteristische Pankreasödem hervor. Das Bild korreliert weitgehend mit der Klinik der humanen ödematös-interstitiellen AP. Dieses Modell ist daher vor allem zur Untersuchung der frühen pathophysiologischen Vorgänge bei AP prädestiniert. Das in dieser Arbeit infolge Caerulein-Hyperstimulation gezeigte Auftreten einer inhibitor-insensitiven Trypsinaktivität (iiTA) ist somit ein Bestandteil dieser frühen intrazellulären Ereignisse.

Eine Caerulein-Hyperstimulation induziert intra- und extrazelluläre Ereignisse, die sich wie folgt beschreiben lassen: Bereits nach 10minütiger Caerulein-Hyperstimulation erscheint aktives Trypsin oder TAP als Folge einer initiierten proteolytischen Aktivierung von Trypsinogen; danach folgt die Aktivierung anderer proteolytischer Proenzyme (Leach et al. 1991, Grady et al. 1996, Saluja et al. 1997, Lüthen et al. 1998). Dies geht parallel mit einer Fusion der Zymogengranula mit lysosomalen Kompartimenten (Adler et al. 1982). Die Aktivität von Cathepsin B erhöht sich nach ca. 15 Minuten ebenfalls (Grady et al. 1996).

Wie in *in-vitro*-Experimenten gezeigt wurde, stieg die intrazelluläre Trypsinaktivität bis 30min deutlich an (Hofbauer et al. 1998). Dies trat auch in unseren Experimenten auf, in denen der Peak der iiTA nach 30-minütiger Caerulein-Stimulation pankreatischer Azini zu beobachten war. *In vivo* findet man die Maxima der Trypsinaktivität etwa nach 3 bis 8 Stunden (Lüthen et al. 1995, Halangk et al. 2000). Erste Anzeichen eines interstitiellen Ödems findet man nach 60 Minuten, das Maximum nach 8 bis 12 Stunden. Von Lüthen et al. 1995 wurde gezeigt, dass schwere Zellschäden nach etwa 4 Stunden auftreten. Im Zeitraum von 4 bis 8 Stunden findet man auch die höchsten Spiegel pankreatischer Enzyme, wie Amylase und Lipase im Serum. Nach 24 Stunden haben sich die meisten Parameter wieder normalisiert.

4.3 Methoden zum Nachweis der Trypsinaktivität

Herausgehobener Parameter und inzwischen auch allgemein akzeptiertes Charakteristikum einer experimentellen akuten Pankreatitis ist dabei das Auftreten aktiven Trypsins im exokrinen Pankreasgewebe. Die nach Caeruleinstimulation induzierte Trypsinaktivität ist gering und methodisch nicht einfach zu erfassen. Ihre Bestimmung erfordert ein spezifisches und empfindliches Substrat. Wesentliche Fortschritte wurden mit der Einführung fluorogener Substrate erzielt, wobei sich heute weitgehend Peptidsubstrate der Struktur Boc-X-X-Arg-AMC/Rho durchgesetzt haben (Kawabata et al. 1988). Da diese Substrate für das zu messende Trypsin nicht absolut spezifisch sind, war der Einfluss weiterer Proteasen durch Messung des Enzyms unter optimalen Bedingungen und dem Einsatz spezifischer Trypsin-Inhibitoren weitgehend auszuschließen.

Unter Berücksichtigung dieser Prämissen bestätigten die Publikationen zahlreicher Arbeitsgruppen, dass ein Anstieg der messbaren Trypsinaktivität im Pankreasgewebe typischerweise sehr frühzeitig nach Caeruleinstimulation nachweisbar war. Einige Arbeiten zeigten, dass auch das bei der Trypsinogenaktivierung abgespaltene Propeptid TAP einen vergleichbaren Anstieg aufwies und erhärteten damit die Befunde zur frühen Trypsinogenaktivierung bei AP. Diese Erkenntnisse wurden weiterhin durch zahlreiche Befunde an Caerulein-stimulierten isolierten Azini gestützt, wobei in diesen Untersuchungen membranpermeable fluorogene Substrate zur intrazellulären Lokalisierung von Trypsin eingesetzt wurden. Man kann somit feststellen, dass die frühe, jedoch transiente und damit limitierte Bildung aktiven Trypsins in den Azinuszellen des Mäuse- (sowie Ratten-) Pankreas ein Charakteristikum der Caerulein-Pankreatitis ist.

4.4 Die inhibitor-insensitive Trypsinaktivität (iiTA) als relevanter Faktor der frühen Zymogenaktivierung

4.4.1 Identifizierung der iiTA als Trypsinaktivität

Die oben erwähnte und bisher nicht abschätzbare Spezifität der verwendbaren fluorogenen Substrate zur Trypsinbestimmung veranlasste uns, die Trypsinmessung der Proben auch in der Gegenwart eines Trypsininhibitors vorzunehmen, um damit einen nicht-hemmbareren Anteil zu erkennen und zu berücksichtigen. Eine solche Vorgehensweise war in der Literatur bisher nicht beschrieben. Überraschenderweise fanden wir heraus, dass die Trypsinaktivität in allen Phasen einer über 24 Stunden verfolgten Caerulein-Pankreatitis der Maus zum überwiegenden Teil durch den Soja-Bohnen-Trypsininhibitor (SBTI) nicht hemmbar war. Da funktionell eine inhibitor-sensitive Trypsinaktivität als Schlüsselfaktor für die postulierte Aktivierung der Zymogenkaskade anzusehen ist, war dieses Postulat zu hinterfragen. Es war daher eine Aufgabe dieser Arbeit, eine erste Charakterisierung dieser induzierbaren inhibitor-insensitiven tryptischen Aktivität (iiTA) vorzunehmen und Wege zu einer möglichen Reinigung der Enzymaktivität aufzuzeigen.

Zunächst konnten wir zeigen, dass die iiTA auch in intakten Azini nach Isolierung messbar ist. Das schloss zunächst aus, dass es sich um Serinproteasen aus dem Blutserum, Immunzellen oder anderen pankreatischen Zellen handelte. Untersuchungen zur Molmasse der iiTA mittels Zymographie in 1D- und 2D-Gelen, sowie mittels Größenausschlusschromatographie (HPLC-Gelfiltration) zeigten, dass die iiTA in Molekulargewichtsbereich von 22-26 kDa zu finden war. Damit konnte eine Aktivität der anderen pankreatischen Serinproteasen und der Mastzelltryptase ausgeschlossen werden. Vielmehr sollte es sich um eine Trypsinaktivität handeln, was auch durch die Untersuchungen zur Hemmbarkeit mit Trypsininhibitoren gezeigt wurde. Obwohl gegenüber allen getesteten proteinösen Inhibitoren (SBTI, SPINK, Aprotinin) nur eine marginale Hemmbarkeit bestand, waren niedermolekulare Hemmstoffe wirksam.

4.4.2 Experimente zur Proteinanreicherung der iiTA

Es wurden daher Methoden zur Anreicherung der iiTA mit Hilfe der Affinitätschromatographie durch Kopplung der vorgefundenen Trypsinaktivität an Benzamidin bzw. SBTI genutzt. Nach Bindung an die Benzamidin-Säule wurde jedoch nur eine inhibitor-sensitive Trypsinaktivität eluiert, während die ursprüngliche iiTA nur noch in geringen Anteilen im Filtrat nachgewiesen wurde. Offensichtlich war die Affinität der iiTA zur Bindung an die im Säulenmaterial enthaltenen Trypsin-Inhibitoren zu gering und/oder wurde zusätzlich durch die im Überschuss in der Probe enthaltenen Trypsinogene bzw. die isTA aufgrund ihrer höheren Bindungsaffinität verdrängt. Da SBTI ein spezifischer Inhibitor des Trypsins ist, wurde außerdem versucht, die iiTA durch SBTI-Affinitätschromatographie aus den Pankreashomogenaten aufzureinigen. Zum Schutz der Trypsine wurde während der Homogenatpräparation ein spezifischer Trypsininhibitor (S124) zugegeben. Der höhere Anteil der isTA in der Ausgangsprobe könnte durch die gleichzeitige Anwesenheit dieses Inhibitors erklärt werden, die durch spezifische Hemmung von Trypsin zu einer Reduktion um etwa 80% der trypsinvermittelten Autodegradation im Pankreas führt (Halangk et al. 2001).

Elektropherogramme und Zymogramme der Eluat- und Filtratfraktionen nach SBTI-Affinitätschromatographie zeigten, dass die iiTA keine Pseudoaktivität des Trypsinogens ist, da keine Trypsinaktivität im Bereich der Trypsinogen-Banden sichtbar war. Es wird vermutet, dass das Maustrypsin 4 die iiTA repräsentiert, weil die Aktivitätsspot im mittleren pI-Bereich, etwa bei pH 6-7 am ehesten den Eigenschaften von Mesotrypsin zuzuordnen waren. Eine SBTI-Titration des Filtrats einerseits und des Maustrypsins 4 andererseits, zeigt für die iiTA eine dem Mesotrypsin ähnliche Inhibitorresistenz. Beim Vergleich der SBTI-Inhibitorresistenz der iiTA mit rekombinantem Trypsin 4 und Trypsin 5 fällt auf, dass die iiTA auch bei einer SBTI-Konzentration von 20µM nur wenig gehemmt wird. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Benzamidin- und SBTI-Affinitätschromatographien nicht zur Isolierung geeignet waren, jedoch zum Erkenntnisgewinn über die Eigenschaften der iiTA beitrugen.

4.5 Expressionsmuster der Trypsinogen-Isoformen

Es muss erwähnt werden, dass Trypsin(ogen) kein einzelnes Enzym ist, sondern sowohl beim Menschen, als auch bei Nagern in Isoformen existiert. Beim Menschen wurden drei verschiedene Isoenzyme des Trypsinogens identifiziert, die nach ihren elektrophoretischen Eigenschaften in der isoelektrischen Fokussierung als kationisches Trypsinogen (PRSS1), anionisches Trypsinogen (PRSS2) und Mesotrypsinogen (PRSS3) bezeichnet werden.

(Scheele et al. 1981). Bei der Maus wurde ein noch vielfältigeres Muster gefunden. Das Mausgenom enthält 20 Trypsinogen-Gene. Die Expression ist für die Trypsinogene 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20 auf mRNA-Ebene bekannt (Li et al. 2006), sieben weitere (1, 3, 13, 14, 17, 18, 19) gelten als Pseudogene, 2 und 6 als Reliktgene. Unter den angeführten Trypsin-Isoformen weisen jedoch nur die mesotrypsin-ähnlichen Isoformen 4 und 5 die Eigenschaften einer deutlich reduzierten Hemmbarkeit gegen proteinöse Inhibitoren auf.

Umfassender wurde bisher das humane Mesotrypsin (PRSS3) charakterisiert. Das Mesotrypsinogen wird im Vergleich zu den anderen Trypsinogen mit einem geringeren Anteil exprimiert und stellt 2% bis 10% des Gesamt-Trypsinogens dar (Rinderknecht et al. 1984). Es weist eine Resistenz gegenüber proteinöse Trypsininhibitoren wie SBTI und SPINK (Rinderknecht et al. 1984, Nyaruhucha et al. 1997, Katona et al. 2002) auf. Darüber hinaus besitzt das Mesotrypsin eine sehr niedrige Autoaktivierungsrate und aktiviert auch andere Trypsinogene nur sehr langsam. Seine Fähigkeit zur Spaltung von Proteinen ist begrenzt. Jedoch ist seine Rolle unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen bisher nicht eindeutig geklärt. Ursprünglich wurde postuliert, dass aktiviertes Mesotrypsin eine Schutzfunktion erfüllt, indem es andere Zymogene degradiert (Rinderknecht et al. 1984, Nyaruhucha et al. 1997). Szmola et al. (2003), Sahin-Toth (2005) haben gezeigt, dass Mesotrypsin SPINK und SBTI abbaut. Wenn dieser Mechanismus auch in der Azinuszelle stattfindet, könnte über eine Verminderung der endogenen Inhibitor Kapazität der Beginn der akuten Pankreatitis beeinflusst werden. Sie fanden auch eine höhere Aktivierungsrate des humanen Mesotrypsinogens durch Cathepsin B im Vergleich zu PRSS1 und PRSS2.

Obwohl bei der Maus eine zweifelsfreie Identifizierung einer mesotrypsin-ähnlichen Isoform noch nicht erfolgt ist, sprechen Sequenzvergleiche für Maustrypsin 4 und/oder 5 als Trypsine mit solchen Eigenschaften. Am Mausmodell wurde von Wartmann et al. (2003) bestätigt, dass die Proteinexpression einer mesotrypsin-ähnlicher Isoform - Maustrypsin 4/5 - durch Caerulein-Hyperstimulation hochreguliert wird. Diese Isoform könnte möglicherweise für die iiTA verantwortlich sein. Proteomic-Untersuchungen zur Proteinexpression im Mäusepankreas, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden (Wartmann et al. 2004, unpublizierte Ergebnisse), zeigten, dass vor allem die Trypsinogen-Isoformen 4, 7, 8, 9, 20 anwesend sind. Auf dieser Basis und nach Datenbankanalysen wurden alle potenziell exprimierbaren Isoformen rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Anschluss die Hemmeigenschaften dieser rekombinanten Isoformen untersucht. Dabei zeigten sich die Trypsine 7, 8, 9, 10, 11, 16, 20 als inhibitor-sensitiv, während die Trypsine 4 und 5 um Größenordnungen weniger sensitiv waren. Diese Ergebnisse bestätigen

die Ableitungen aus den Sequenzvergleichen, dass die Trypsinogene 4 und 5 mesotrypsin-ähnliche Eigenschaften aufweisen und damit die iiTA darstellen könnten.

Da sich jedoch die Hemmstofftitrationen der gereinigten Trypsine 4 und 5 im Detail von denen der iiTA-enthaltenen Fraktionen unterschieden, ergab sich die Frage, ob die enzymatische Eigenschaft zusätzlich durch die Wechselwirkung mit endogenen Inhibitoren modifiziert wurde. Da die Caerulein-Hyperstimulation eine relativ milde AP hervorruft und dabei nur wenig Trypsinogen in Trypsin umgewandelt wird, sollte noch freies SPINK anwesend sein. Die Existenz nicht gebundenen Hemmstoffs in Pankreashomogenaten wurde durch Titrationsversuche mit bovinem Trypsin und Maustrypsin 4 bestätigt. Die endogene Inhibitor Kapazität des Pankreashomogenats wurde mittels Zugabe des bovinen Trypsins bestimmt. Sie beträgt etwa 6,7 nM. Das bedeutet, dass nach Caerulein-Hyperstimulation in der Azinuszelle noch freie Inhibitor Kapazität vorhanden war. Eine überschüssige Menge an endogenen proteinösen Inhibitoren und eine vorliegende Komplexbildung von Trypsin mit SPINK könnten die fehlende Bindung der iiTA an der Benzamidin-Säule, aber auch die Eigenschaften der iiTA gegenüber Inhibitoren erklären. Die in Pankreashomogenaten in Gegenwart von 20 µM SBTI messbare inhibitor-insensitive Trypsinaktivität (iiTA) könnte auf eine Wechselwirkung oder Komplexbildung mit endogenem SPINK3, aber auch auf eine weitere proteolytische Prozessierung von Mesotrypsin oder SPINK3 zurückzuführen sein.

Deswegen führten wir eine Reihe von Experimenten durch, die die Auswirkung einer möglichen Interaktion von iiTA bzw. Trypsin 4 mit Maus-SPINK auf die enzymatischen Eigenschaften darstellen sollte. Dabei zeigte sich, dass die iiTA durch Zugabe von Pankreashomogenat zum Maustrypsin 4 oder umgekehrt nicht zunahm. Maustrypsin 4 erhöhte zwar die Gesamtrypsinaktivität der Probe, jedoch war diese Aktivität anschließend durch Zugabe von 20 µM SBTI hemmbar.

Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf der ursprünglichen Beobachtung basieren, dass eine tryptische Aktivität existiert, die auch durch hohe Konzentrationen des Sojabohnentrypsininhibitors (SBTI) nicht gehemmt wird. Dieser Inhibitor wurde als „klassischer“ proteinöser Trypsininhibitor beschrieben. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass über SBTI-Resistenzen bei den Trypsinen verschiedener Organismen berichtet wurde. Gumbmann et al. (1989) beschrieben eine höhere Resistenz der Maustrypsine im Vergleich zu denen der Ratte. Diese Erscheinung konnte man durch Fütterung der Tiere mit einer SBTI reichen Diät induzieren. Im Duodenalsaft des Menschen wurde ebenfalls von Holm et al. (1988) nach Infusion von SBTI eine neue Art der unidentifizierten inhibitor-resistenten Trypsinaktivität beschrieben, obwohl

diese Eigenschaft nach einer Inkubation des Duodenalsaftes bei 37°C verschwand. Nach Meinung der Autoren, konnte diese Aktivität durch Erscheinung der neuen Trypsinisoform oder durch eine Modifikation der schon bekannten „normalen“ Formen verursacht sein. In späteren Experimenten bestätigten Holm et al. 1991 diese Ergebnisse am Rattenmodell. Durch Fütterung von Ratten mit SBTI wurde die Enzymaktivität des Duodenalsaftes reduziert, die Restaktivität zeigte jedoch eine extensive Resistenz gegen Serinproteasen-Inhibitoren. Es wurde nicht definiert, ob diese Aktivität durch abnormale Aktivierung von normal präsenten Zymogenen oder durch die Erscheinung einer neuen Minor-Isoform bedingt wäre. Auf der Basis der Befunde von Szmola et al. (2003) könnte dieses Faktum durch Bindung von SBTI an Mesotrypsin mit folgender aktiven Degradation des Inhibitors erklärt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung der iiTA können folgendermaßen zusammengefasst werden:

1 Bei der iiTA handelt es sich um eine Aktivität einer Trypsinisoform, wahrscheinlich um das Trypsin 4, die jedoch durch endogene Faktoren in ihren enzymatischen Eigenschaften noch modifiziert ist.

2 Eine Anreicherung/Reinigung der iiTA aus Pankreashomogenat erscheint mit den bisher zur Verfügung stehenden Verfahren wenig aussichtsreich, vor allem vor dem Hintergrund der gleichzeitigen Anwesenheit von isTA und großer Mengen potenziell aktivierbaren Trypsinogens.

4.6 Mögliche pathophysiologische Funktionen der iiTA

Unter physiologischen bzw. pathophysiologischen Aspekten ist zunächst die Frage zu diskutieren: Welche proteolytischen Eigenschaften besitzt die iiTA als mesotrypsin-ähnliche Protease im Hinblick auf die Aktivierung der Zymogene, aber auch hinsichtlich von möglichen Schutzfunktionen? Aus diesem Grund ist eine mögliche Rolle der iiTA in der Aktivierung von PAR (protease activated receptors) zu betrachten.

Wie oben bereits erwähnt, besitzt Mesotrypsin keine signifikante Fähigkeit zur Digestion von Proteinen und ist durch seine relative Trypsininhibitor-Resistenz gekennzeichnet. Die begrenzte Fähigkeit zur endoproteolytischen Spaltung, die die iiTA als mesotrypsin-ähnliches Enzym aufweisen sollte, lässt bei der Suche nach potenziellen Substraten die Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) in das Blickfeld rücken (Olejár et al. 2001). Dies muss vor

allem deshalb diskutiert werden, weil für das humane Mesotrypsin eine PAR-2-Prozessierung gezeigt werden konnte (Grishina et al. 2005, Wang et al. 2006). PAR-2 ist auch auf Azinuszellen exprimiert und spielt somit möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der AP (Nguyen et al. 1999, Kawabata et al. 2002, Namkung 2008). Wenn auch die endgültige Rolle von PAR-2 nicht geklärt ist, konnte eine AP-attenuierende Funktion postuliert werden. Da über PAR-2 die Sekretion der Azinuszelle stimuliert wird, könnte dieser Effekt zur Abschwächung des Sekretionsblocks bei AP und damit zu einer Verminderung von intrazellulärer Zymogenaktivierung und Azinuszellschädigung beitragen (Singh et al. 2007). Darüber hinaus könnten weitere PAR-vermittelte Effekte den Verlauf der AP beeinflussen.

1 Eine Aktivierung von PAR-2 erhöht primär die Gefäßpermeabilität, womit die Ödembildung zu Beginn der AP betroffen sein kann (Kawabata et al. 1998).

2 PAR-2 sind auf inflammatorischen Zellen (Mari et al. 1996) ebenso präsent und beteiligen sich an der Ca^{2+} -Mobilisation in humanen Granulozyten, die ex vivo isoliert wurden (Howells et al. 1997). Beim Taurocholat-Rattenmodell der AP reicht das aktive Trypsin im Serum, um die Produktion des Stickstoffoxids (NO) und IL-8 durch Immunozyten zu stimulieren (Namkung et al. 2004).

3 Die mögliche protektive Rolle der PAR-2-Aktivierung wurde durch stärker ausgeprägte Azinuszellschäden bei PAR-2-defizienten Maus im Verlauf einer Caerulein-Pankreatitis bestätigt (Namkung et al. 2004).

Die bisher publizierten Befunde ergeben ein Bild, wonach die Funktion des Trypsin-aktivierten Rezeptors (PAR-2) in Verbindung mit unphysiologisch aktiviertem Trypsin in einer negativen Rückkopplung der exokrinen Pankreasfunktion und in der Kontrolle der Cytokinproduktion von Azinuszellen besteht (Hirota et al. 2006).

Die bisher diskutierten Eigenschaften der erstmals beschriebenen iiTA werfen jedoch eine weitere wichtige Frage auf: Warum findet man kaum isTA und damit anionische oder kationische Trypsinaktivität, obwohl sie mengenmäßig als Trypsinogene deutlich dominieren. Prinzipiell könnten dafür folgende Mechanismen verantwortlich sein.

1 Anionische oder kationische Trypsinogene werden in sehr geringem Maße aktiviert.

Es ist wenig wahrscheinlich, weil die Untersuchungen mit isolierten humanen Trypsin-Isoformen *in vitro* keine verminderte Aktivierung der anionischen und kationischen Form zeigten (Kukor et al. 2003). *In vitro*-Untersuchungen an Azini zeigten hohe Raten der TAP-Bildung (Halangk et al. 2002), was für eine Trypsinogenaktivierung spricht, die nicht nur den möglichen Anteil des inhibitor-insensitiven Trypsin(ogen)s entspricht.

2 Anionische und kationische Trypsinogene werden in gleichem Ausmaß aktiviert, jedoch unmittelbar durch endogene Inhibitoren (vor allem SPINK) gehemmt.

Quantitativ wäre dies prinzipiell möglich, weil die „SPINK-Kapazität“ bis zu 20% aktivierter Gesamt-Trypsinogene (Lerch, Gorelick 2000) hemmen kann, aber nur weniger als 1% des Gesamt-Trypsinogens als Trypsin zu messen ist. Weiterhin ist auch die Frage der „Kompartimentierung“ in der Azinuszelle zu beachten. Untersuchungen am Gesamtpankreashomogenat können wegen sekundärer Reaktionen von Trypsin mit SPINK zu einer geringeren Trypsinaktivität führen. Eine endgültige Lösung dieser Frage ist nur möglich, wenn die Trypsinaktivität nach Trennung einzelner intrazellulärer Organellen bestimmt wird.

3 Anionische und kationische Trypsinogene werden in gleichem Ausmaß aktiviert, jedoch unmittelbar danach proteolytisch inaktiviert.

Als proteolytische Inaktivatoren kommen Cathepsin L (Wartmann et al. 2003), Trypsin selbst oder z.B. Chymotrypsin C (Szmola, Sahin-Toth 2007) in Frage. Eine systematische Untersuchung des vergleichenden proteolytischen Abbaus der Trypsinisoformen liegt noch nicht vor. Versuche an isolierten Azini weisen auf einen proteolytischen Abbau von Trypsin nach Caeruleinstimulation hin, ohne dass in dieser Studie zwischen iiTA und isTA unterschieden wurde (Halangk et al. 2001).

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden:

Für die Beurteilung der Rolle des Trypsins für die bei akuter Pankreatitis auftretende Zellschädigung und die Ausprägung der Pankreatitis genügt es offensichtlich nicht, die „Über-alles“-Trypsinaktivität im Pankreasgewebe zu messen bzw. diese Aktivität zu manipulieren. Es muss berücksichtigt werden, dass die Trypsinaktivität von zahlreichen Isoformen mit deutlich unterschiedlichen Eigenschaften repräsentiert wird. Zudem ist zu beachten, dass endogene Inhibitoren modifizierend wirken können.

Bei der experimentellen AP der Maus stellen die Maustrypsine 4 und/oder 5 mögliche Kandidaten dar, welche die iiTA verursachen könnten. Die Expression von Maustrypsin 5

wurde bisher noch nicht eindeutig *in vivo* auf mRNA-Ebene oder als Protein nachgewiesen. Als mesotrypsin-ähnliche Isoform ist Trypsin 4 wahrscheinlich in der Lage, die iiTA hervorzurufen. Bei weiteren Forschungen sollte daher diese Isoform im Mittelpunkt stehen. Zunächst ist eine genaue Identifizierung erforderlich. Die Eigenschaften des Enzyms können an rekombinant exprimiertem Protein untersucht werden, wobei vor allem dessen proteolytische Prozessierung von besonderem Interesse ist. Die pathobiologische Rolle bei akuter Pankreatitis wird letztendlich durch die Generierung einer transgenen Maus aufzuklären sein.

5 Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der akuten Pankreatitis mit seiner meist unkompliziert verlaufenden interstitiell-ödematösen Form und der häufig letal endenden hämorrhagisch-nekrotischen Verlaufsform stellt bis heute, besonders im letztgenannten Fall, eine große Herausforderung für die klinische Medizin dar. Ein Grund hierfür sind die nur unzureichend geklärten pathogenetischen Vorgänge der initialen Phase und die nicht zuverlässig prognostizierbaren weiteren Verläufe der Erkrankung.

In vorausgegangenen Studien ergab sich der Hinweis, dass eine inhibitor-insensitive Trypsinaktivität bei der experimentellen Pankreatitis der Maus auftritt. Bei detaillierter Betrachtung dieser Aktivität, quantifizierbar durch den Zusatz des proteinösen Trypsininhibitors SBTI, wurde festgestellt, dass der Hauptteil der Trypsinaktivität resistent gegen hohe Konzentrationen des Hemmstoffs ist. Diese Befunde sind in der Literatur bisher nicht beschrieben und bedürfen der Aufklärung, da die enzymatische Eigenschaften des pankreatitis-induzierten Trypsins wesentlichen Einfluss auf die nachfolgenden Aktivierungsvorgänge haben sollten.

Gegenstand dieser Arbeit war es, die iiTA zu charakterisieren und die möglichen verursachenden Enzyme oder Enzymmodifikationen zu finden. Für die Experimente wurde das Mausmodell gewählt, welches inzwischen das meist verwendete Modell in der experimentellen Pankreatitisforschung darstellt. Auf Grund des vollständig sequenzierten Genoms stellt die Maus ein ideales Versuchstier dar, um die initialen Vorgänge der Zymogenaktivierung während Induktion einer akuten Pankreatitis zu untersuchen. Dabei kam ein etabliertes *in-vivo*- und *in-vitro*-Modell zum Einsatz, in dem die akute Pankreatitis mittels Caerulein-Hyperstimulation induziert wurde. Anschließend erfolgten die Untersuchungen der inhibitor-insensitiven Trypsinaktivität mittels Aktivitätsbestimmungen, Zymographien, Affinitätschromatographien, Titrationen gegen proteinöse Trypsininhibitoren und Kontrolluntersuchungen mit Referenz-Enzymen (bovines Trypsin, rekombinante Maustrypsin(ogen)e 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 16 und 20).

Es wurde gezeigt, dass die isTA in den Homogenaten bzw. Zymogengranula-Extrakten bei Vorhandensein einer freien SPINK-Kapazität nicht auf die Eigenschaft einer freien inhibitor-sensitiven Trypsin-Isoform (Maustrypsin 7, 8, 9, 20) zurückzuführen war, sondern eher der

Trypsin 4-Aktivität entsprach. Jedoch wurde auch deutlich, dass die ii-TA nicht vollkommen identisch mit freiem Trypsin 4 ist. Eher könnte eine Enzymkomplexierung von Trypsin 4 mit Inhibitoren vorliegen, zumal in den Homogenaten ein Überschuss an freier Inhibitorkapazität (SPINK3) nachzuweisen war.

Die Rolle der inhibitor-resistenten Trypsine in Pathogenese akuter Pankreatitis ist derzeit noch nicht vollständig verstanden. Die Aufklärung der relevanten Mechanismen kann möglicherweise zu neuen Ansätzen in der Therapie der akuten Pankreatitis führen.

6 Literaturverzeichnis

1. Adler G, Rohr G, Kern HF: Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat. *Dig Dis Sci*; 27(11):993-1002 (1982)
2. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.*; 20(6):864-74 (1992)
3. Amsterdam A, Jamieson JD: Structural and functional characterization of isolated pancreatic exocrine cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69(10), 3028-32 (1972)
4. Bialek R, Willemer S, Arnold R, Adler G: Evidence of intracellular activation of serine proteases in acute caerulein-induced pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 26:190-196 (1991)
5. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
6. Büchler MW, Uhl W, Malferteiner P: Ätiologie. Pankreaserkrankungen. Akute Pankreatitis. Chronische Pankreatitis. Tumor des Pankreas. Pp. 14-19. Karger. Basel 1996
7. Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, Mani KR, Bhaskar S, Rao GV, Singh L: Absence of PRSS1 mutations and association of SPINK1 trypsin inhibitor mutations in hereditary and non-hereditary chronic pancreatitis. *Gut.* 53(5):723-8 (2004)
8. Chi L, Li Y, Stehno-Bittel L, Gao J, Morrison DC, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res.* Apr;21(4): 231-40 (2001)
9. Chiari H: Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde*: 17; 69-96 (1896)
10. Cottrell GS, Amadesi S, Grady EF, Bunnett NW: Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem*;279:13532–13539 (2004)
11. Davies MG, Hagen PO: Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg*;84(7):920-35 (1997)

12. Dugernier T, Laterre PF, Reynaert M, Deby-Dupont G.: Compartmentalization of the protease-antiprotease balance in early severe acute pancreatitis. *Pancreas*;31(2):168-7 (2005)
13. Dugernier T, Reynaert M, Laterre PF: Early multi-system organ failure associated with acute pancreatitis: a plea for a conservative therapeutic strategy. *Acta Gastroenterol Belg.* 66, 177-183 (2003)
14. Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett AJ: Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid. Activation of human trypsinogen. *Biol Chem Hoppe Seyler.*;369 Suppl:293-8 (1988)
15. Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Drazba J, Yadav SP, Crabb JW, Ganz T, Bevins CL: Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol*; 3: 583–590 (2002)
16. Giroir BP. Pancreatitis, cytokines, and SIRS: déjà vu all over again? *Crit Care Med.* Apr; 27(4):680-1 (1999)
17. Grady T, Dabrowski A: Stress-activated protein kinase activation is the earliest direct correlate to the induction of secretagogue-induced pancreatitis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 227(1): 1-7 (1996)
18. Greenbaum LM, Hirshkowitz A, Shoichet I.: The activation of trypsinogen by cathepsin B. *J Biol Chem.*;234:2885-90 (1959)
19. Grishina Z, Ostrowska E, Halangk W, Sahin-Tóth M, Reiser G: Activity of recombinant trypsin isoforms on human proteinase-activated receptors (PAR): mesotrypsin cannot activate epithelial PAR-1, -2, but weakly activates brain PAR-1 *Br J Pharmacol*; 146(7): 990–999 (2005)
20. Gudgeon AM, Heath DI, Hurley P, Jehanli A, Patel G, Wilson C: Trypsinogen activation peptides assay in the early prediction of severity of acute pancreatitis. *Lancet* 335: 4-8 (1990)
21. Gumbmann MR, Dugan GM, Spangler WL, Bakker EC, Rackis JJ: Pancreatic response in rats and mice to trypsin inhibitors from soy and potato after short- and long-term dietary exposure. *J Nutr* 119(11), 1598-1609 (1989)
22. Halangk W, Kruger B, Ruthenbürger, Sturzebecher J, Albrecht E, Lippert H, Lerch MM: Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*;282:367-374 (2001)

23. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbürger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J.: Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 106:773-81 (2000)
24. Halangk W, Lerch MM.: Early events in acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am*;33(4):717-31 (2004)
25. Hirota M, Ohmuraya M., Baba H: The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. *J Gastroenterol*; 41:832–836 (2006)
26. Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, Frossard JL, Adler G, Steer ML. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol.* Aug;275(2 Pt 1):G352-62 (1998)
27. Holm H, Jorgensen A, Haussen AE: Raw soy and purified proteinase inhibitors induce the appearance of inhibitor-resistant trypsin and chymotrypsin activities in Wistar Rat duodenal juice, *J. Nutr.* 121: 532-538 (1991)
28. Holm H, Krogdahl A, Hanssew AE: High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vitro comparison of proteinase inhibition *J. Nutr.* 118: 521-525 (1988)
29. Howells GL, Macey MG, Chinni C, Hou L, Fox MT, Harriott P, Stone SR.: Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *J Cell Sci.*;110 (Pt 7):881-7 (1997)
30. Katona G, Berglund G I, Hajdu J, Graf L and Szilagy L: Crystal structure reveals basis for the inhibitor resistance of human brain trypsin. *J. Mol. Biol.* 315: 1209– 1218 (2002)
31. Kawabata A, Kuroda R, Minami T, Kataoka K, Taneda M: Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. *Br J Pharmacol* 125: 419-422 (1998)
32. Kawabata A, Kuroda R, Nishida M, Nagata N, Sakaguchi Y, Kawao N, Nishikawa H, Arizono N, Kawai K.: Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in the pancreas and parotid gland: Immunolocalization and involvement of nitric oxide in the evoked amylase secretion. *Life Sci.* 4;71(20):2435-46 (2002)
33. Kawabata S, Miura T, Morita T, Kato H, Fujikawa K, Iwanaga S, Takada K, Kimura T, Sakakibara S: Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. *Eur J Biochem.* Feb; 172(1): 17-25 (1988)
34. Keim V: Genetics of pancreatitis. *Scand J Surg.*;94(2):103-7. Review (2005)

35. Kukor Z, Mayerle J, Krüger B, Tóth M, Steed PM, Halangk W, Lerch MM, Sahin-Tóth M.: Presence of cathepsin B in the human pancreatic secretory pathway and its role in trypsinogen activation during hereditary pancreatitis. *J Biol Chem.* 14; 277(24):21389-96 (2002)
36. Kukor Z, Tóth M, Sahin-Tóth M.: Human anionic trypsinogen: properties of autocatalytic activation and degradation and implications in pancreatic diseases. *Eur J Biochem.*;270(9):2047-58 (2003)
37. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685 (1970)
38. Lampel M and Kern HF: Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 11;373(2):97-117 (1977)
39. Leach SD, Modlin IM, Scheele GA, Gorelick FS: Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin. *J Clin Invest.*;87(1):362-6 (1991)
40. Lerch MM, Adler G.: Experimental animal models of acute pancreatitis. *Int J Pancreatol.*;15(3):159-70 (1994)
41. Lerch MM, Gorelick FS. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Med Clin North Am.*;84(3):549-563 (2000)
42. Lerch MM, Halangk W: "The role of cysteine proteases in intracellular pancreatic serine protease activation." *Adv Exp Med Biol* 477: 403-11 (2000)
43. Li W, Nakagawa T, Koyama N, Wang X, Jin J, Mizuno-Horikawa Y, Gu J, Miyoshi E, Kato I, Honke K, Taniguchi N, Kondo A: Down-regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in a 1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity. *Glycobiology* 16 (10), 1007–1019 (2006)
44. Lindkvist B., Fajardo I., Pejler G., Borgström A: Cathepsin B activates human trypsinogen 1 but not proelastase 2 or procarboxypeptidase B. *Pancreatology*, 6, 3, Pp. 224-231 (2006)
45. Logsdon C: Phosphatidylinositol 3-kinase and trypsin activation in pancreatitis *J. Clin. Invest.* 108:1267-1268 (2001)

46. Lüthen R, Niederau C, Grendell JH: Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 268:G592-G604 (1995)
47. Lüthen R, Owen RL, Sarbia M, Grendell JH, Niederau C: Premature trypsinogen activation during cerulein pancreatitis in rats occurs inside pancreatic acinar cells. *Pancreas*;17(1):38-43 (1998)
- Mari B, Guerin S, Far DF, Breitmayer JP, Belhacene N, Peyron JF, Rossi B, Auberger P: Thrombin and trypsin-induced Ca²⁺ mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors. *FASEB J*.;10(2):309-16 (1996)
48. Mayerle J, Simon P, Kraft M, Meister T, Lerch MM: Internistische Therapie der akuten Pankreatitis. *Med Klin* 98: 744-749 Munich (2003)
49. Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Rattner D, Warshaw AL: Subcellular kinetic of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis. *Am J Physiol* 274: G71-G79 (1998)
50. Moffatt JD, Cocks TM: Endothelium-dependent and -independent responses to protease-activated receptor-2 (PAR-2) activation in mouse isolated renal arteries. *Br J Pharmacol* 125: 591-594 (1998)
51. Namkung W, Han W, Luo X, Muallem S, Cho KH, Kim KH, Lee MG: Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 126: 1844-1859 (2004)
52. Namkung W, Yoon JS, Kim KH, Lee MG: PAR2 exerts local protection against acute pancreatitis via modulation of MAP kinase and MAP kinase phosphatase signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.;295(5):G886-94 (2008)
53. Neoptolemos JP, Kemppainen EA, Mayer JM, Fitzpatrick JM, Raraty MG, Slavin J: A multicentre study of early prediction of severity in acute pancreatitis by urinary trypsinogen activation peptide. *Lancet* 355:1955-1960 (2000)
54. Nguyen TD, Moody MW, Steinhoff M, Okolo C, Koh DS, Bunnett NW: Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase-activated receptor-2. *J Clin Invest* 103: 261-269 (1999)
55. Norman J: The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg*.;175(1):76-83 (1998)

56. Nyaruhucha CNM, Kito M, Fukuoka SI: Identification and expression of the cDNA-encoding human mesotrypsin(ogen), an isoform of trypsin with inhibitor resistance. *J Biol Chem* 272(16), 18, 10573–10578 (1997)
57. Olejár T, Matej R, Zadinová M, Poucková P.: Expression of proteinase-activated receptor 2 during taurocholate-induced acute pancreatic lesion development in Wistar rats. *Int J Gastrointest Cancer.*;30(3):113-21 (2001)
58. Osman MO, Jensen SL.: Acute pancreatitis: the pathophysiological role of cytokines and integrins. New trends for treatment? *Dig Surg.*;16(5):347-62 (1999)
59. Owyang C, Logsdon CD: New insights into neurohormonal regulation of pancreatic secretion, *Gastroenterology*;127: 957–969 (2004)
60. Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S: Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol.*;37(3):263-6 (2003)
61. Rinderknecht H, Renner IG, Abramson SB, Carmack C. Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology*; 86:681–692 (1984)
62. Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, Goris RJ: Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure *Ann Surg.*;218(6):769-76 (1993)
63. Ruthenbürger M, Mayerle J, Lerch MM: Cell Biology of Pancreatic Proteases. *Endocrinol Metab Clin North Am* 35(2), June, 313-331 (2006)
64. Sahin-Tóth M: Human mesotrypsin defies natural trypsin inhibitors. From passive resistance to active destruction. *Protein Pept Lett.* July ; 12(5): 457–464 (2005)
65. Salameh MA, Soares AS, Hockla A, Radisky ES : Structural basis for accelerated cleavage of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) by human mesotrypsin. *J Biol Chem.* 15;283(7):4115-23 (2008)
66. Saluja AK, Donovan EA, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Hofbauer B, Steer ML: Caerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology*; 113(1):304-10 (1997)
67. Santhosh S, Witt H, te Morsche RH, Nemoda Z, Molnár T, Pap A, Jansen JB, Drenth JP: A loss of function polymorphism (G191R) of anionic trypsinogen (PRSS2) confers protection against chronic pancreatitis. *Pancreas.*;36(3):317-20 (2008)

68. Schägger H, Jagow G: Tricine-sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDA. *Anal. Biochem.* 166, 368-379 (1987)
69. Scheele G, Bartelt D, Bieger W: Characterization of human exocrine pancreatic proteins by twodimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology*; 80:461–473 (1981)
70. Schmidt J, Fernandez-del Castillo C, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Warshaw AL: Trypsinogen-activation peptides in experimental rat pancreatitis: prognostic implications and histopathologic correlates. *Gastroenterology* 103:1009-1016, (1992)
71. Singh VP, Bhagat L, Navina S, Sharif R, Dawra RK, Saluja AK. Protease-activated receptor-2 protects against pancreatitis by stimulating exocrine secretion. *Gut.*;56(7):958-64 (2007)
72. Steer ML, Meldolesi J: The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med*:316; 144-150 (1987)
73. Szepessy E, Sahin-Tóth M. Human mesotrypsin exhibits restricted S1' subsite specificity with a strong preference for small polar side chains. *FEBS J.*;273(13):2942-54 (2006)
74. Szilágyi L, Kénesi E, Katona G, Kaslik G, Juhász G, Gráf L.: Comparative in vitro studies on native and recombinant human cationic trypsins. Cathepsin B is a possible pathological activator of trypsinogen in pancreatitis. *J Biol Chem.* 6;276(27):24574-80 (2001)
75. Szmola R, Kukor Z, Sahin-Tóth M.: Human mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors. *J Biol Chem.* 5;278(49):48580-9 (2003)
76. Szmola R, Sahin-Tóth M: Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104(27):11227-32 (2007)
77. Tartakoff AM, Jamieson JD: Subcellular fractionation of the pancreas. *Methods Enzymol.*;31(Pt A):41-59 (1974)
78. Van Acker GJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML: Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 283(3):794-800 (2002)

79. Wang Y, Luo W, Wartmann T, Halangk W, Sahin-Tóth M, Reiser G: Mesotrypsin, a brain trypsin, activates selectively proteinase-activated receptor-1, but not proteinase-activated receptor-2, in rat astrocytes. *J Neurochem.*;99(3):759-69 (2006)
80. Wartmann T, Kähne T, Schulz HU, Sahin-Tóth M, Lerch MM, Halangk W: Proteolytische Spaltung und Inaktivierung des humanen pankreatischen Trypsin-Inhibitors Spink1 durch Cathepsin B und L, Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub 2006, Greifswald, Deutschland
81. Wartmann T, Mayerle J, Ruthenbürger M, Lerch MM, Halangk W: Degradation of pancreatic digestive enzymes by cathepsin L. *Pancreatology* 3:257 (2003)
82. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD: Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*;14(2):141-5 (1996)
83. Willemer S, Bialek R, Adler G: Localization of lysosomal and digestive enzymes in cytoplasmic vacuoles in caerulein-pancreatitis. *Histochem Cell Biol.* 94(2):161-70 (1990)
84. Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, Chen JM, Kähne T, Drenth JP, Kukor Z, Szepessy E, Halangk W, Dahm S, Rohde K, Schulz HU, Le Maréchal C, Akar N, Ammann RW, Truninger K, Bargetzi M, Bhatia E, Castellani C, Cavestro GM, Cerny M, Destro-Bisol G, Spedini G, Eiberg H, Jansen JB, Koudova M, Rausova E, Macek M Jr, Malats N, Real FX, Menzel HJ, Moral P, Galavotti R, Pignatti PF, Rickards O, Spicak J, Zarnescu NO, Böck W, Gress TM, Friess H, Ockenga J, Schmidt H, Pfützer R, Löhr M, Simon P, Weiss FU, Lerch MM, Teich N, Keim V, Berg T, Wiedenmann B, Luck W, Groneberg DA, Becker M, Keil T, Kage A, Bernardova J, Braun M, Güldner C, Halangk J, Rosendahl J, Witt U, Treiber M, Nickel R, Férec C: A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet.*;38(6):668-73 (2006)
85. Witt H. The SPINK in chronic pancreatitis: similar finds, different minds. *Gut.*; 50(5):590-1 (2002)
86. Yingfei W, Weibo L, Wartmann T, Halangk W, Sahin-Tóth M, Reiser G: Mesotrypsin, a brain trypsin, activates selectively proteinase-activated receptor-1, but not proteinase-activated receptor-2, in rat astrocytes *J Neurochem*, 99(3), 759-769 (2006)

7 Anhang

7.1 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung einer inhibitor-insensitiven Trypsinaktivität bei experimenteller akuter Pankreatitis der Maus“

im Bereich für Experimentelle Operative Medizin der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie mit Unterstützung Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Halangk und Herrn Dr. rer. nat. Thomas Wartmann selbstständig und ohne sonstige Hilfe angefertigt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation zu erstellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Milada Butueva

7.2 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei den Wegbereitern meiner Promotionsarbeit, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Halangk und Herrn Dr. rer. nat. Thomas Wartmann, bedanken, die mir die vorliegende Dissertation nicht nur ermöglicht, sondern auch stets mit wertvollen Hinweisen und Ratschlägen mein Verständnis der akuten Pankreatitis maßgebend geprägt haben.

Gedankt sei ebenso allen weiteren Mitarbeitern der Experimentellen Operativen Medizin der Universität Magdeburg, die mir immer mit offenem Ohr und helfender Hand bei Problemen zur Seite standen. Besonderer Dank gilt hierbei Frau Bärbel Brauns, die mich in ihrer Tätigkeit als MTA mit vielen wertvollen praktischen Tipps und Erfahrungen unterstützt und bereichert hat.

Weiterhin danke ich der Abteilung für Experimentelle Innere Medizin der Universität Magdeburg (Direktor Prof. Dr. Michael Naumann) für die Unterstützung bei Durchführung der HPLC-Analysen.

Insbesondere dem DAAD danke ich für die Gewährung des Stipendiums zur Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und all meinen Freunden für den Beistand und die Ermutigungen, ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

7.3 Darstellung des Bildungsweges

Persönliche Daten:

Name: Milada Butueva

Geburtsdatum: 11.01.1981

Geburtsort: Vladikavkaz, Russland

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: Russisch

Schulbildung:

1987-1990: Grundschule in Beslan, Russland

1990-1992: Allgemeinbildende Schule N2, Beslan Russland

1992-1997: Allgemeinbildende Schule N27, Vladikavkaz Russland

06/1997: Allgemeine Hochschulreife, Zeugnis „mit Auszeichnung“

Hochschulbildung:

09/1997 - 06/2003: Studium der Humanmedizin an der Nord-Ossetischen Staatlichen Medizinischen Akademie, Vladikavkaz Russland

06/2003: 2. interdisziplinäre Abschlussstaatsprüfung, ausgezeichnet

06/2001: 1. Abschlussstaatsprüfung, Soziale Medizin und Gesundheitswesen, ausgezeichnet.

Facharztausbildung:

08/2003-07/2004: Internatur in Geburtshilfe und Gynäkologie, am Republikanischen Krankenhaus, Vladikavkaz Russland,

Abschluss: Zertifikat "Fachärztin für Geburtshilfe und Gynäkologie"

09/2004-08/2006: Facharztausbildung in Chirurgie am Notfallhilfekrankenhaus, Vladikavkaz Russland,

Abschluss: Zertifikat "Fachärztin für Allgemein Chirurgie"

Famulaturen:

06/1998-07/1998 - 4 Wochen Krankenpflege an Allgemein Chirurgie, innere Medizin am Universitätsklinikum N1, Vladikavkaz Russland,

07/1999-08/1999 - 4 Wochen als Arzthelferin am Notdienst, Abteilung für Intensivtherapie des Stadtklinikums N1, Vladikavkaz Russland,

07/2000-08/2000 - 6 Wochen in der Allgemein Chirurgie und Therapie am Universitätsklinikum N1, Vladikavkaz Russland

06/2002-07/2002 - 4 Wochen in der Poliklinik N1, Vladikavkaz Russland

Dissertation:

10/2006 - 12/2007 - Promotion zum Thema: „Charakterisierung der inhibitor-insensitiven Trypsinaktivität bei experimenteller akuter Pankreatitis der Maus“ im Bereich für Experimentelle Operative Medizin der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Medizinische Fakultät, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Themenvergebender: Prof. Dr. rer. nat. Walter Halangk

seit 01/2008 – wissenschaftliche Tätigkeit als Promotionsstipendiatin zum Thema: „Conditional immortalization for expansion of endothelial cells“ im Bereich für Molekularbiotechnologie des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung Braunschweig.

Themenvergebende: PD Dr. rer. nat. Dagmar Wirth

