

Wirkung einer Glutaminylzyklase-Hemmung auf die Ausprägung einer experimentellen akuten Pankreatitis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität

Magdeburg

von Dipl.-Ing. Carina De Boni (geb. Hedderich)

geb. am 28.04.1985 in Magdeburg

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Wex

Prof. Dr. med. Stephan von Hörsten

eingereicht am: 30.08.2021

verteidigt am: 23.08.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Humane akute Pankreatitis	1
1.1.1	Ätiologie	1
1.1.2	Physiologie des Pankreas	3
1.1.3	Pathogenese.....	6
1.1.4	Entzündungsmediatoren	9
1.2	Pathogeneseforschung an Modellen der experimentellen Pankreatitis.....	13
1.2.1	Taurocholat-induzierte Pankreatitis	14
1.2.2	Hyperstimulationsmodell mit Caerulein	14
1.3	Glutaminylzyklase und Iso-Glutaminylzyklase	15
1.4	Ziel der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.2	Chemikalien und Puffer	21
2.3	Versuchstiere und Haltung	25
2.4	Pankreatitis-Modelle.....	26
2.4.1	Hyperstimulationsmodell mit Caerulein	26
2.4.2	Taurocholat-induzierte Pankreatitis	27
2.5	Präparation der Pankreata	29
2.5.1	Pankreas-Homogenisierung zur Untersuchung von Pankreatitis-Markern	29
2.5.2	Auftrennung im Percoll-Dichtegradienten	29
2.5.3	Isolation und <i>in-vitro</i> -Stimulation von pankreatischen Azini	31

2.6	Assays	33
2.6.1	Glutaminylzyklase-Aktivitätsmessung.....	33
2.6.2	Trypsin- und Chymotrypsin-Bestimmung.....	34
2.6.3	Cathepsin-B-Bestimmung	35
2.6.4	Protein-Bestimmung.....	35
2.6.5	Myeloperoxidase-Bestimmung	35
2.6.6	Bestimmungen der Amylase und Lipase	36
2.6.7	Analyse von Zytokinen	36
2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.8	Western-Blot-Transfer und Immunnachweis von Proteinen	37
2.9	Histologie des Pankreasgewebes.....	38
2.10	Auswertung der Daten	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Nachweis und subzelluläre Lokalisation der Glutaminylzyklase Isoformen im Pankreas der Maus	40
3.2	Nachweis der Wirkungsspezifität von PQ529 als QC-Inhibitor.....	43
3.2.1	Stimulus-Sekretions-Kopplung an isolierten Azinuszellen	43
3.2.2	Wirkung auf pankreatische Enzyme der Aktivierungskaskade.....	44
3.3	Wirkung von PQ529 auf Parameter der akuten Pankreatitis.....	45
3.3.1	Prophylaktische Gabe des QC-Hemmstoffes bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis.....	45
3.3.2	Therapeutische Gabe des Hemmstoffes nach Taurocholat-induzierter Pankreatitis.....	48

3.4	Untersuchungen zur Ausprägung einer Taurocholat-induzierten Pankreatitis an QC-k.o.-Mäusen.....	54
3.5	Trypsinogen-Aktivierung.....	58
3.5.1	Bei prophylaktischer Gabe des Inhibitors PQ529	58
3.5.2	Bei therapeutischer Gabe des Inhibitor PQ529.....	59
3.5.3	Darstellung der subzellulären Lokalisation der durch PQ beeinflussten Trypsin-Aktivität	61
4	Diskussion	62
4.1	Nachweis von Glutaminylyklasen im Pankreas.....	63
4.2	Wirkung des Glutaminylyklase-Inhibitors auf Azinuszell spezifische Enzyme und Pathways.....	64
4.3	Einfluss der QC-Inhibition auf die Ausprägung der Pankreatitis.....	65
4.4	Effekt einer QC-Inhibitor-Gabe auf die Trypsinogen-Aktivierung.....	68
5	Zusammenfassung und Ausblick	71
6	Abkürzungsverzeichnis.....	73
7	Abbildungsverzeichnis	75
8	Tabellenverzeichnis	78
9	Literaturverzeichnis.....	79
	Ehrenerklärung.....	I

1 Einleitung

1.1 Humane akute Pankreatitis

1.1.1 Ätiologie

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine Entzündung des Pankreas, die in den exokrinen Azinuszellen ihren Ursprung hat [1]. Sie ist durch eine variable Beteiligung anderer Gewebe oder entfernter Organsysteme charakterisiert [2]. Die jährliche globale Inzidenz von akuter Pankreatitis liegt bei 34 Fällen, chronischer Pankreatitis bei 10 Fällen und Diabetes mellitus nach Pankreatitis bei 6 je 100.000 Einwohner [3].

Die von Hans Chiari 1896 postulierte Hypothese besagt, dass bei der Pankreatitis eine Autodigestion des Organs auftritt. Durch die Selbstverdauung wird das Parenchymgewebe des Pankreas mittels seiner eigenen, frühzeitig aktivierten, digestiven Proteasen zerstört [4]. Fast ein Jahrhundert später wurde postuliert, dass ein Schlüsselereignis in der Pathogenese die übermäßige Trypsinogen-Aktivierung im Pankreasparenchym mit nachfolgender Aktivierung weiterer Enzyme ist [5].

Die wichtigsten ätiologischen Faktoren der AP sind Gallenwegserkrankungen (vor allem Cholelithiasis) oder ein Alkoholabusus mit einer Inzidenz von 40 % bzw. 30% [6, 7]. Danach folgen die idiopathischen Ursachen mit ca. 15 %. Weitere 5-10 % der Erkrankungen werden durch eine endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatikografie (ERCP), die zu einer temporären Gang-Obstruktion führen kann, oder durch eine Obstruktion des Pankreasganges infolge tumoröser Erkrankungen oder durch Duodenaldivertikel [8, 9] verursacht.

Die Symptomatik der AP äußert sich durch akut auftretende, ständige und sehr starke Schmerzen im Epigastrium. Die Schmerzen beginnen oft gürtelförmig und breiten sich nachgehend auf das gesamte Abdomen aus. Begleitet werden die Schmerzen durch Übelkeit, Erbrechen, Hämatemesis, Meläna und Hautzeichen wie das Cullen-, Grey-Turner-, Fox- und Walzel-Zeichen [10]. Ein wichtiges Kriterium, um die Diagnose einer AP abzusichern, ist eine signifikante, um mehr als 3-fache Erhöhung der Lipase und α -Amylase im Serum. Der Schweregrad der Pankreatitis korreliert jedoch nicht mit der Höhe der im Serum gemessenen Werte [8]. Die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) kann zusätzlich einen Hinweis auf den Schweregrad der Pankreatitis (akute systemische Inflammation) geben, da das Protein schnell und signifikant im Plasma ansteigt [11].

Die Pankreatitis wird klinisch in eine milde (Inzidenz: 80 %) oder schwere Verlaufsform (Inzidenz: 20 %) unterteilt [12].

Die milde Pankreatitis, auch ödematöse-interstitielle Pankreatitis, ist durch interstitielle Ödeme, peripankreatische Fettgewebsnekrosen, Apoptose und ein sehr geringes Ausmaß an Parenchymnekrosen sowie eine geringe Letalität gekennzeichnet. Die Organstruktur bleibt bei dieser Ausprägung erhalten. Der Heilungsprozess ist nach Ausbruch einer milden AP in der Regel nach einer Woche abgeschlossen (restitutio ad integrum) und die Organstruktur und -funktionen bleiben zumeist intakt. Ursache dafür ist die Apoptose, die den nekrotischen Zelluntergang von exokrinen Azinuszellen durch Autolyse und damit das Ausmaß entzündlicher Reaktionen begrenzt [13, 14, 15, 16].

Die schwere Form der AP, die als hämorrhagische und/oder nekrotisierende Pankreatitis auftritt, ist in ihren zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen nur wenig aufgeklärt und führt in bis zu 24 % der Fälle zu einem letalen Ausgang [17]. Die schwere AP ist durch Komplikationen wie z.B. der Bildung von Abszessen oder Pseudozysten, lokalisierte oder diffuse Parenchymnekrosen, einem differierenden Ausmaß an Hämorrhagien, peri- und intrapancreatische Fettgewebsnekrosen, der Bildung einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) und Multi-Organversagen (MOF) geprägt [18, 19]. Im Falle des Auftretens eines MOF steigt die Mortalität auf über 50 % [20, 21].

Der durch Nekrosen hervorgerufene Zelltod der Pankreaszellen führt zu einem Austritt des Zellinhaltes in das umliegende Gewebe. Die Folge ist eine Entzündungsreaktion. Oft entwickelt sich daraus eine überschießende Entzündungsantwort, auch bekannt als ‚systemic inflammatory response syndrome‘ (SIRS) [22, 23].

Die Pathogenese der schweren AP verläuft biphasisch. Innerhalb der ersten Woche der Erkrankung entwickelt sich zunächst ein SIRS. Im weiteren Verlauf wird zumeist nach einer Woche eine anti-inflammatorische Immunantwort (CARS, ‚compensatory anti-inflammatory response syndrome‘) induziert [24]. In Abbildung 1 sind der Verlauf eines SIRS und CARS, die in einer Hyper- bzw. Hypoinflammation resultieren, dargestellt.

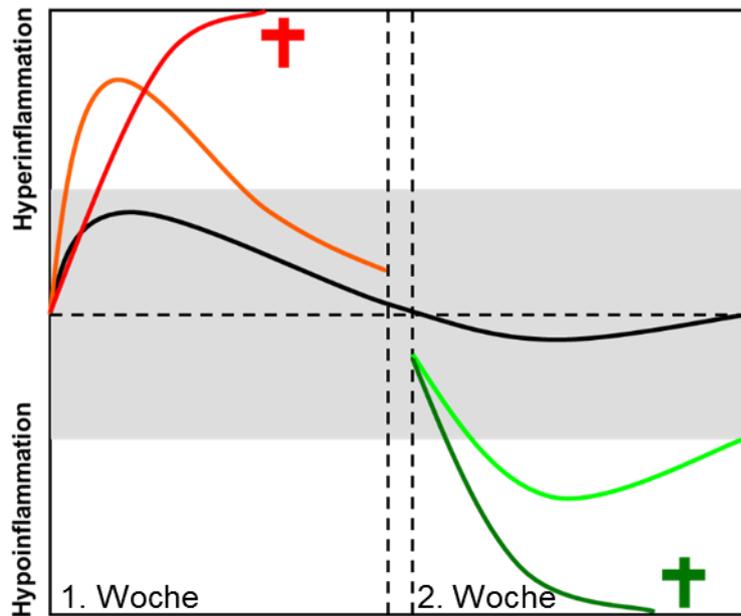


Abbildung 1: Darstellung der biphasischen Krankheitsverläufe und Schweregrade einer AP
 Die erste Woche (links) im Verlauf einer AP wird durch ein SIRS geprägt, welche in einer Hyperinflammation mit drei Schweregraden (schwarz: leicht, orange: mittel, rot: schwer) unterteilt wird. Die systemische Entzündungsreaktion geht im Krankheitsverlauf innerhalb der zweiten Woche in ein CARS über, welche durch eine Hypoinflammation mit einem unterschiedlichen Schweregrad (schwarz: leicht, hellgrün: mittel, dunkelgrün: schwer) verursacht wird [24].

Der Schweregrad der AP und das Überleben wird durch beide Prozesse bestimmt. Im Falle einer sehr starken Hyperinflammation kann der Körper diese nicht mehr kompensieren und es kommt zum frühen MOF (rote Linie). Werden zusätzlich Erreger im Blut nachgewiesen, wird ein SIRS infektiöser Genese als Sepsis bezeichnet. Für das Einsetzen eines späten MOF gelten insbesondere das Zusammenwirken einer Immunparalyse im Sinne eines CARS und das Auftreten einer bakteriellen Translokation als die entscheidenden Faktoren (dunkelgrüne Linie) [24].

Durch Verbesserungen in der computertomografischen Diagnostik, der Intensivmedizin und der Erkennung und Behandlung der Ursachen der AP und den damit verbundenen Komplikationen ist es in den letzten Jahren zu einer Senkung der Letalität gekommen [25, 26, 27].

1.1.2 Physiologie des Pankreas

Das Pankreas besteht hauptsächlich aus Azinuszellen (85 %), die durch die Synthese von hydrolytischen Verdauungsenzymen für die intestinale Verdauung verantwortlich sind. Weitere 10 % sind duktale Zellen, welche Flüssigkeiten und Elektrolyte nach Sekretinstimulation

freisetzen. Den kleinsten Anteil haben endokrine Zellen mit 5 %, die den Glukosestoffwechsel regulieren [5]. Das Pankreas liegt retroperitoneal, ist ca. 15 cm lang und erstreckt sich von der Pars descendens duodeni schräg nach oben links bis zum Milzhilus [28]. In der folgenden Abbildung ist das menschliche Pankreas schematisch dargestellt [29].

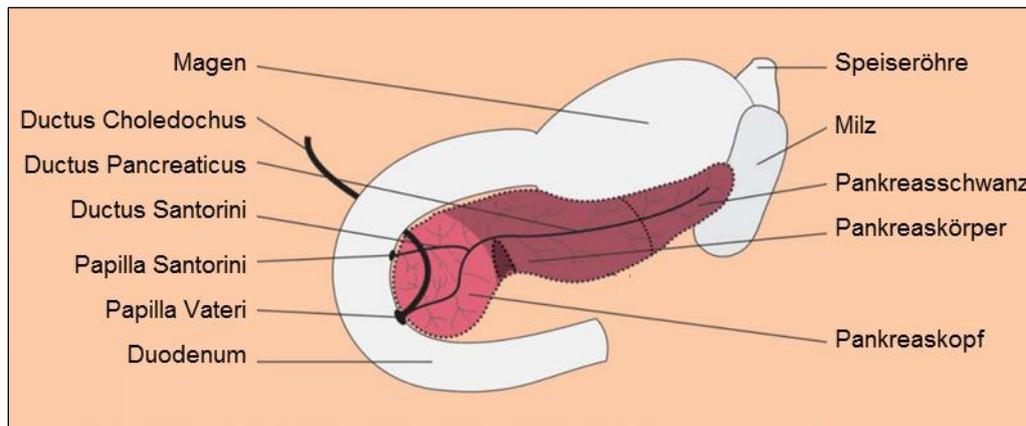


Abbildung 2: Schematische Darstellung des humanen Pankreas

Im Pankreas bilden die Azini die morphologischen und funktionellen Grundeinheiten. Sie sind durch intra- und interlobuläre Gang-Strukturen an die Hauptgänge Ductus pancreaticus und Ductus Santorini angeschlossen [2].

Die Funktion des exokrinen Pankreas umfasst die Synthese, Speicherung und regulierte Sekretion von Verdauungsenzymen, die zur Digestion von Nahrungsbestandteilen wie Polysacchariden, Fetten, Proteinen und Nukleinsäuren führen. Die Pankreassekretion wird durch das Hormon Sekretin, welches auf die duktaalen Zellen wirkt, und durch Cholezystokinin (CCK) oder cholinerge Substanzen, die die Azini stimulieren, ausgelöst [5].

Im Anschluss erfolgt eine Sekretion von Wasser und Bikarbonat durch die Gangzellen. Insgesamt werden ca. 1,5-3 l Pankreassaft pro Tag gebildet. Dieser enthält etwa 20 verschiedene Verdauungsenzyme [2]. In Tabelle 1 sind einige Enzyme und Proteine, die von den Azinuszellen sezerniert werden, aufgeführt.

Tabelle 1: Von Azinuszellen des Pankreas sezernierte Enzyme und Proteine

Amylase	
Endopeptidasen	Lipasen
Trypsinogen Chymotrypsinogen Proelastase	Lipase Prophospholipase A2 Colipase
Exopeptidasen	Nukleasen
Procarboxypeptidase A Procarboxypeptidase B	Ribonuklease Desoxyribunuklease
weitere für die enterale Verdauung erforderliche Enzyme	
Lysosomale Enzyme	
Cathepsin B Fucosidase Glukosidase	Galaktosidase Glucuronidase Leucinnaphthylamidase
andere Proteine	
Pankreatitis-assoziiertes Protein (PAP) Lithiostatin	

Nach [30]

Die Verdauungsenzyme (Zymogene) werden an Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und zum Golgi-Apparat transportiert. Dort werden die Proteine in Vesikel verpackt, bis sie zu Zymogengranula reifen und mittels Exozytose in das Ganglumen ausgeschieden werden [31]. Sobald die inaktiven Proenzyme in das Duodenum gelangt sind, werden sie in ihre aktive Form umgewandelt. Am Anfang der nun einsetzenden Enzymkaskade befindet sich das Trypsinogen. Dieses wird durch die ‚brush-border‘-Endoprotease Enteropeptidase (Enterokinase) im Dünndarm zu Trypsin aktiviert. Nach dieser Initial-Aktivierung besitzt das Trypsin die Fähigkeit weitere Vorstufen der pankreatischen Proteasen, wie z.B. die Proelastase oder auch das Chymotrypsinogen, zu aktivieren [32]. Erfolgt die Induzierung der Verdauungskaskade in der Azinuszelle, kommt es zu dem von Hans Chiari beschriebenen Selbstverdau des Pankreas [4]. Damit die vorzeitige Aktivierung nicht zu einem Zellschaden führt, werden die Zymogene unter physiologischen Bedingungen inaktiv in den Azinuszellen synthetisiert, transportiert und gelagert. Sie werden unter physiologischen Bedingungen frühestens im Dünndarm aktiviert [33].

Das Pankreas besitzt weitere Schutzmechanismen, um eine frühzeitige intrazelluläre Aktivierung der Verdauungsenzyme zu verhindern:

- Das Pankreas synthetisiert Proteaseinhibitoren (z.B. pancreatic secretory trypsin inhibitor-PSTI, serine peptidase inhibitor, Kazal type 1-Spink1), die frühzeitig aktiviertes Trypsin inaktivieren [34, 35].
- Die niedrige intrazelluläre Kalzium-Konzentration führt zur Instabilität des Trypsins und damit zu dessen Inaktivierung [36].
- Die Zymogene sind in unterschiedliche subzelluläre Kompartimente verpackt [37].

1.1.3 Pathogenese

Die AP ist je nach Schwere der Erkrankung durch einen variierenden Grad der Azinuszell-Schädigung sowie durch eine Entzündungsreaktion gekennzeichnet. Die genauen Mechanismen, die zu einer Erkrankung führen und die Schwere der Krankheit aufzeigen, sind nach wie vor nicht gänzlich geklärt [38]. Es konnten aber an experimentellen Modellen einige essenzielle Vorgänge und ihre zeitliche Abfolge identifiziert werden. So wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Azinuszell-Schädigung durch die entzündliche Infiltration von aktivierten Leukozyten beeinflusst wird [39, 40]. Die Fähigkeit dieser Zellen, das Gewebe *in vivo* zu zerstören, basiert auf zwei Ereignissen, der Ausschüttung von lytischen Enzymen und der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS, ‚reactive oxygen species‘) [41].

In der folgenden Abbildung 3 ist die Pathogenese der AP gezeigt, indem die Initiierung durch einen auslösenden Faktor, zu einer Dysfunktion der Azinuszellen und im weiteren Verlauf zu einer Azinuszell-Schädigung und Zelluntergang durch apoptotische und nekrotische Prozesse führt.

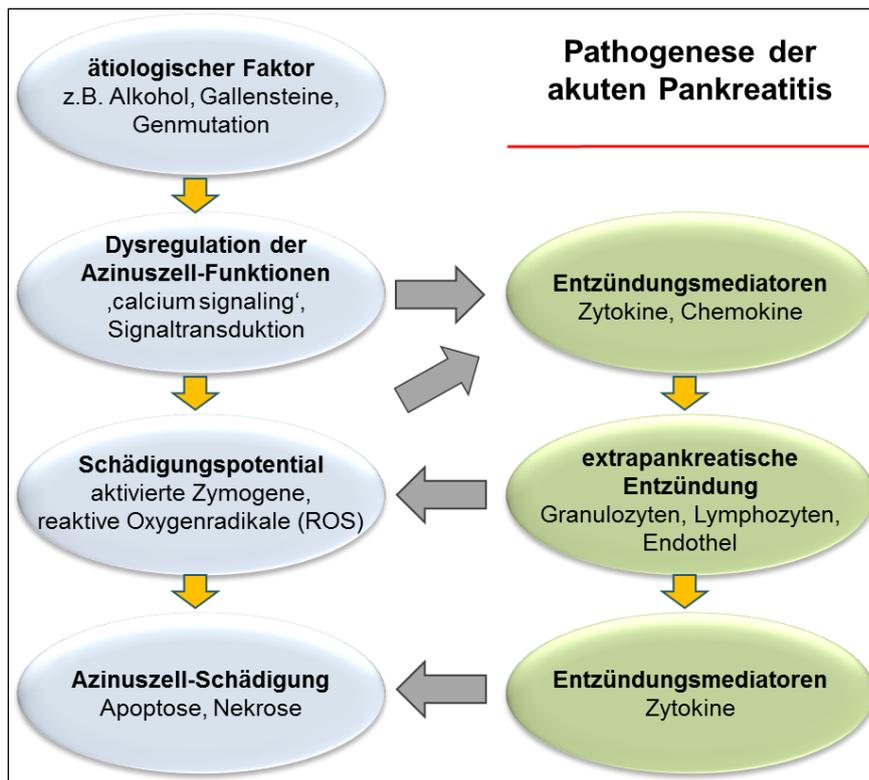


Abbildung 3: Intra- und extrapankreatische Ereignisse in der AP

Nach der Induktion pathophysiologischer Ereignisse in den Azinuszellen (links), initiieren Signalmetabolite eine extrapankreatische Entzündungsreaktionen (rechts). Diese Prozesse interagieren in verschiedenen Stadien der Erkrankung und bedingen die Verstärkung des pathologischen Prozesses [1].

Im Jahr 2007 konnten van Acker und Kollegen zeigen, dass die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6 nicht durch eine unphysiologische Zymogen-Aktivierung induziert wird, sondern parallel und unabhängig verläuft [42]. Die erhöhten Zytokin-Spiegel bewirken die Rekrutierung von Entzündungszellen wie z.B. Makrophagen und Granulozyten, die weitere proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL-6, IL-1 sowie anti-inflammatorische Faktoren wie IL-10 und IL-1-Rezeptor-Antagonisten sezernieren [43]. Das folgende Schema zeigt, wie die initialen Störungen in der Signaltransduktion einerseits zur Zymogen-Aktivierung führen und andererseits die frühzeitige Entzündungsreaktion initiiert wird. Diesbezüglich zeigt die Studie von Sah und Kollegen an isolierten Azinuszellen, dass nach einem pathologischen Insult die Schädigung der Azinuszellen und die damit verbundenen Entzündungsreaktionen früh und unabhängig voneinander verlaufen und zur AP führen. In Abbildung 4 ist dieses Konzept vereinfacht dargestellt [44].

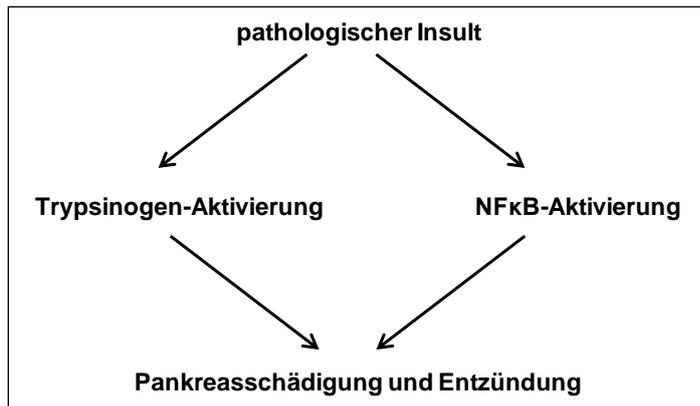


Abbildung 4: Grundlegende Pathomechanismen der Entstehung einer AP

Der pathologische Insult führt über zwei unabhängige Signalwege, einerseits zu einer Trypsinogen-Aktivierung und andererseits zu einer ‚nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells‘ (NFκB)-Aktivierung. Beide führen dann letztendlich zu einer Pankreas-Schädigung und zu einer Entzündung.

Das ‚calcium signaling‘ ist der entscheidende Mechanismus für die gerichtete Exozytose der Granula an der apikalen Membran. Die unter pathologischen Bedingungen zu beobachtende Störung des ‚calcium signaling‘ führt zu einer globalen permanenten Erhöhung des zytosolischen Kalziums. Ist die gerichtete Exozytose verhindert, verbleiben die Granula in der Zelle und es entwickelt sich eine Azinus-Zellschädigung [45]. Dies hat die Aktivierung der Zymogene zur Folge und kann zum Absterben der Azinuszellen führen und in eine AP münden. Untersuchungen der experimentellen Pankreatitis haben gezeigt, dass die Trypsinogen-Aktivierung bereits wenige Minuten nach Induktion, also sehr früh, erfolgt [46, 47, 48, 49, 50]. Weitere Untersuchungen zeigen, dass für die Zell-Schädigung eine Protease-Aktivierung verantwortlich ist, die durch eine Blockade in der Protein-Sekretion verursacht wird [51].

Die lysosomale Cystein-Proteinase Cathepsin B (CTSB) fungiert in den pankreatischen Azinuszellen als aktivierendes Enzym. Deshalb hat es eine essenzielle und wichtige Rolle, da es neben der Enterokinase in der Lage ist Trypsinogen zu aktiven Trypsin zu prozessieren [5, 52]. Deshalb ist die Cathepsin-B-vermittelte Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin als initiales Ereignis der Pankreatitis zu sehen [52, 53, 32, 54]. Bei der zuvor dargestellten Abhängigkeit zwischen der lysosomalen CTSB-Aktivität und der Trypsinogen-Aktivierung, stellt sich jedoch die Frage, wo diese Prozesse ablaufen. Zu den intrazellulären Strukturen, in denen die Protease-Aktivierung ihren Ursprung haben könnte, gehört das Autophagosom. Die Autophagie wird als Prozess der zellulären Abwehr gegen Entzündungen und Stress betrachtet [55]. Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass die Autophagie eine wesentliche Rolle für die späte intrazelluläre Protease-Aktivität und den Schweregrad der

Pankreatitis spielt [56, 57]. Die Autophagie ist primär ein physiologischer Prozess, die in jeder Zelle stattfindet. Er dient zum Recycling von geschädigten oder nicht mehr benötigten einzelnen Proteinen, Protein-Aggregaten und Organellen. Recycling bedeutet hier, dass einerseits nicht mehr funktionelles Zellmaterial unschädlich gemacht werden soll und andererseits ein Zur-Verfügung-Stellen der freigesetzten Aminosäuren für einen erneuten Aufbau von Proteinen und Zellorganellen. Autophagie ist besonders wichtig, wenn ein Mangel an Nährstoffen vorliegt. Dann erfolgt ein Abbau von nicht-essenziellen Zellbestandteilen, damit überlebenswichtige Prozesse weiterhin mit Energie versorgt werden können. Abzugrenzen ist hier die Autophagie im pathologischen Sinne, bei der verstärkt Material, wie z.B. geschädigte Mitochondrien, entstanden bei Pankreatitis, entsorgt werden müssen. Unter diesen Bedingungen werden mehr Autophagosomen und große Vakuolen in den Zellen gebildet [58].

Die pankreatischen Azinuszellen können Zytokine, die auch die Chemokine umfassen, exprimieren [59]. Die Signaltransduktion, die zur Expression von z.B. MCP-1, IL-6 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α führt, erfolgt über den NF κ B-Signalweg, der eine zentrale Rolle einnimmt [60]. Im Verlauf der AP, wird der Transkriptionsfaktor NF κ B durch die pathophysiologische Kalziumüberladung der Azinuszellen aktiviert. Diese Aktivierung verläuft sehr schnell und parallel zur Proteaseaktivierung innerhalb weniger Minuten [61]. Die Stimulation von inflammatorischen myeloiden Zellen durch diese Mediatoren führt dazu, dass weitere Zytokine und Chemokine exprimiert werden. Untersuchungen zur Expression und Freisetzung von Zytokinen durch Azinuszellen und myeloiden Zellen zeigen, dass diese Vorgänge eher die myeloiden Zellen betreffen. Eine Pankreatitis führt bei spezifisch generierten Knock-out-Mäusen (RelA/p65) zu einer signifikanten Erhöhung der lokalen und systemischen Inflammation [62].

Neutrophile und Makrophagen bewirken zusätzlich eine Aktivierung der intrazellulären Protease-Aktivität und Azinuszell-Nekrose. Gesteuert werden die Aktivierungs- und Nekrose-Vorgänge durch TNF- α , welches direkt über den TNF- α -Rezeptor auf Azinuszellen wirken kann. Dabei hängt die Aktivierung von Trypsinogen durch TNF- α von der CTSE-Aktivität und einem intakten ‚calcium signaling‘ ab [63, 64]. TNF- α gilt als wichtigster Mediator des SIRS [65].

1.1.4 Entzündungsmediatoren

Die Pankreatitis stellt eine inflammatorische Erkrankung mit lokalen und systemischen Auswirkungen dar, in deren Pathogenese eine Vielzahl von Zellspezies und Mediatoren beteiligt sind. Über den Einfluss proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, deren Ausprägung und dem Schweregrad der Verlaufsform einer AP, liegen zahlreiche Befunde vor.

Von besonderer Bedeutung scheint das Chemokin Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2/ MCP-1) zu sein. In Tiermodellen und bei Menschen mit chronischer bzw. AP wurden erhöhte Spiegel des MCP-1 detektiert [66, 67, 68, 69]. MCP-1 ist ein sehr früher Mediator in der Entzündungsantwort der AP, da die MCP-1 mRNA bereits eine Stunde nach Induktion einer Pankreatitis im Pankreas nachgewiesen werden kann [67]. Auch korreliert ein erhöhter MCP-1-Spiegel im Plasma des Patienten mit der Schwere der AP [70].

Das CCL2 ist ein kleines Zytokin, das zur Familie der CC-Chemokine gehört und ein Molekulargewicht von 8-10 kDa hat [71, 72]. CCL2 übt eine chemoattraktive Aktivität gegenüber Monozyten, Makrophagen und anderen Immunzellen aus, die einen CCR2 (CC-Chemokin-Rezeptor TYP 2, CD192) auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Hierdurch wird die Migration dieser Zellen zu Entzündungsherden induziert [73, 74, 75, 76]. Neuere Studien zeigen, dass der Wirkungsbereich von MCP-1 über seine ursprüngliche Charakterisierung als Chemoattraktionsmittel hinausgehen kann. CCL-2 scheint Leukozyten zu beeinflussen, in dem es die Adhäsion, Polarisierung, Sekretion von Effektormolekülen, Autophagie, Abtötung und Überleben beeinflusst [76]. In Abbildung 5 ist zur Übersicht gezeigt, von welchen proinflammatorischen Faktoren und Zellarten die MCP-1-Ausschüttung maßgeblich beeinflusst wird.

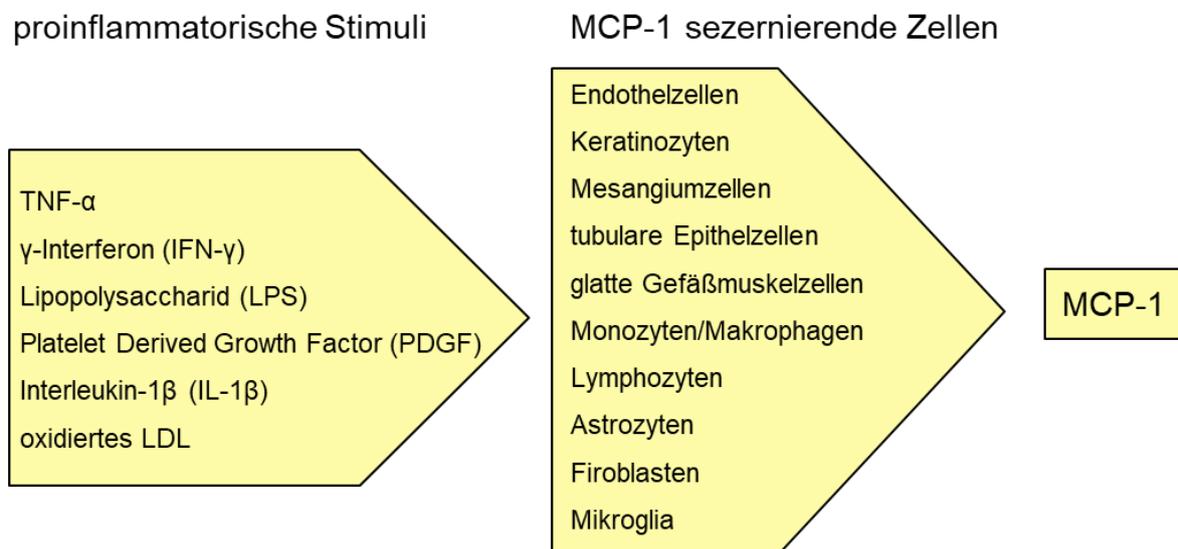


Abbildung 5: Proinflammatorische Reize, die auf MCP-1 sezernierende Zellen wirken nach [72, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83]. „LDL“: Low density lipoprotein.

Damit wird deutlich, dass MCP-1 sehr umfangreich an der Initiation und Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt ist.

Die MCP-1-Ausschüttung wurde bei vielen entzündlichen Erkrankungen wie Arteriosklerose [84], multiple Sklerose [85], Asthma [86], rheumatische Arthritis [87] Alzheimer [88, 89, 90], Diabetes, chronische Nieren Krankheit (CKD) [91] und vieler weiterer beobachtet und spielt dabei offenbar eine wichtige Rolle, wobei seine Funktion in der Pathogenese dieser Krankheiten noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

Es existieren eine Reihe von Hinweisen, dass MCP-1 bei der Pankreatitis eine kausale Rolle spielt. Bei Patienten mit einem Polymorphismus im MCP-1-Gen wurden erhöhte MCP-1-Spiegel detektiert und ein schwererer Verlauf der AP beobachtet [70]. In Therapieansätzen, die auf eine MCP-1-Absenkung gerichtet waren, z.B. durch Inhibition der MCP-1-Synthese (Bindarit) oder anti-MCP-1-Gentherapie, konnte eine Verminderung der Schwere der Pankreatitis erreicht werden [92, 93, 94].

MCP-1 besitzt N-terminal einen Glutamin-Rest (Gln). Das Glutamin wird primär durch Iso-Glutaminylylzyklase (IsoQC) zu Pyroglutamat (pGlu) zyklisiert [95]. Diese posttranslationale Zyklisierung stabilisiert und modifiziert das Protein, wodurch es eine höhere Affinität zum Rezeptor erlangt [96]. Es wurde gezeigt, dass eine N-terminale Verkürzung des Proteins um zwei Aminosäuren zu einem Verlust der chemotaktischen Aktivität des Proteins führt [97]. Zudem konnte durch In-vitro-Untersuchungen gezeigt werden, dass eine QC-Inhibition die pGlu-Zyklisierung des MCP-1s verhindert und so die Monozyten-Migration reduziert wird [98].

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das durch viele Zellen wie Monozyten, Azinuszellen, Fibroblasten als Antwort auf eine Endotoxin-, IL-1 β - und TNF- α -Stimulation gebildet wird [99, 100, 101]. Der IL-6-Level steigt durch diverse akute Noxen an wie z.B. Verbrennungen, große Operationen und Sepsis. IL-6 führt zu Pyrexie. Bei Patienten mit AP kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung des IL-6-Levels, welches mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert [102, 103]. Transgene Mäuse, die humanes IL-6 überexprimieren, haben eine erhöhte Vulnerabilität zur Ausprägung einer AP [101].

Eine gravierende Komplikation im Verlauf der schweren Pankreatitis ist das sogenannte akute Lungenversagen ARDS. Der Arbeitsgruppe um Algül ist es mithilfe tierexperimenteller Untersuchungen gelungen, die Funktion des IL-6 bei dieser Erkrankung aufzudecken. Durch die Entzündung sezernieren myeloide Zellen über die NF κ B-Kaskade IL-6. Dieses IL-6 wiederum bindet an den löslichen IL-6R, ein Prozess der als ‚Trans-Signaling‘ bekannt ist. Das ‚IL-6-Trans-Signaling‘ führt zur Phosphorylierung von STAT3 und zur Produktion des ‚neutrophil attractant‘ CXCL1 in pankreatischen Azinuszellen. Diese Studie konnte nachweisen, dass eine therapeutische Inhibition des IL-6 vor einem schweren Lungenschaden schützt [104].

Der NFκB kommt im Zytoplasma vor und ist an seinen Inhibitor IκB gebunden. Erst durch bestimmte Stimuli wird IκB degradiert und NFκB aktiviert [105]. Die NFκB-Proteine bestehen aus fünf Proteinen, welche stark mit dem Zelltod verbunden sind und die in entzündliche Prozesse involviert sind. Unter den Mitgliedern dieser Familie ist RelA/p65, ein entscheidender Transkriptionsfaktor des klassischen NFκB-Signalweges [106]. NFκB aktiviert und reguliert die Expression von proinflammatorischen Genen wie z.B. von TNF-α, IL-6, IL-8 und ‚inducible nitric oxide synthase‘ (iNOS) die die Immunantwort und die Rekrutierung von Leukozyten zum geschädigten Organ steuern [107, 104]. Eine Verringerung des Pankreas spezifischen RelA/p65 führt zu einer ansteigenden Anfälligkeit der Azini in Bezug auf den entzündungsbedingten Zelltod, gefolgt von der akuten Pankreatitis. Mäuse im ‚Cre-loxP-System‘ (RelA k.o. ist letal) zeigten massive Nekrosen im Pankreas nach einer Caerulein-Hyperstimulation [60].

In der folgenden Abbildung sind die Signalwege in der Azinuszelle, die Beteiligung der inflammatorischen Zellen und die wesentlichen Mediatoren nach einer Stresssituation zusammengefasst (persönliche Mitteilung Halangk). Es ist einerseits zu erkennen, wie der Stimulus über NFκB Chemokine und Zytokine aktiviert, und andererseits über den Anstieg der Kalzium-Konzentration zur Zymogen-Aktivierung führt.

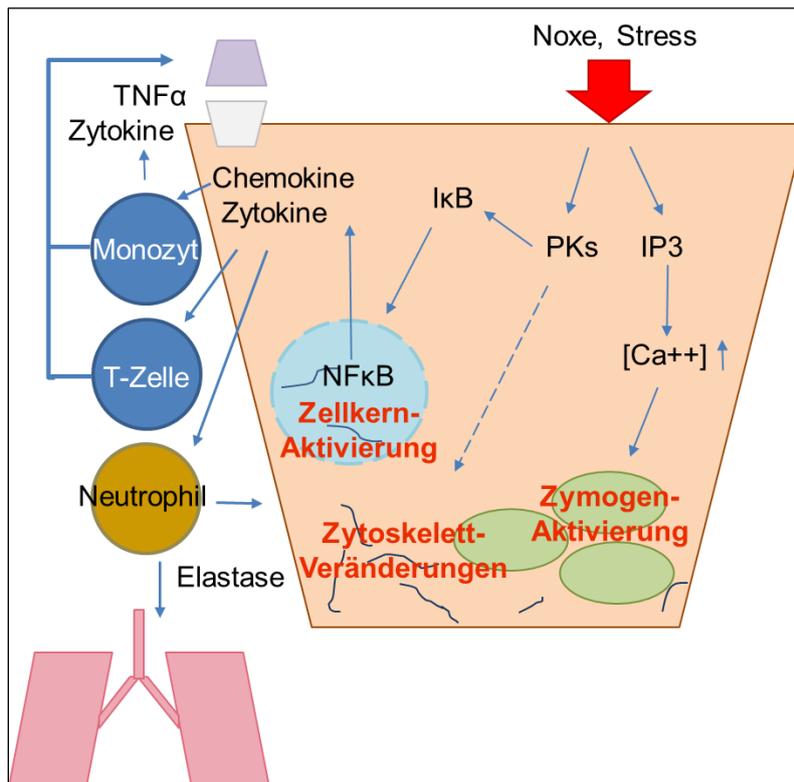


Abbildung 6: Pankreas-Signalkaskade nach Noxen-Wirkung

Der auf die Zelle wirkende Stress führt zu einer Ausschüttung an Proteinkinasen (PKs) und Inositoltriphosphat (IP3). Es ist bekannt, dass IP3 zu einer Erhöhung des Kalzium-Spiegels führt, welcher für die Zymogen-Aktivierung verantwortlich ist. PKs aktivieren den Inhibitor von NFκB (IκB), der die NFκB-Signalkaskade im Zellkern initiiert. Die dadurch freigesetzten Chemokine (vor allem MCP-1) und Zytokine leiten die Entzündungskaskade ein.

1.2 Pathogeneseforschung an Modellen der experimentellen Pankreatitis

Aufgrund seiner anatomischen Lage im Retroperitonealraum ist das Pankreas im Körper nur schwer zugänglich. Studien zur humanen akuten Pankreatitis werden zudem erschwert, da Biopsien am entzündeten Pankreas das Risiko eines schweren Krankheitsverlaufes signifikant erhöhen. Im Allgemeinen ist es sehr schwierig, die initialen pathophysiologischen Ereignisse einer AP am humanen Pankreas zu untersuchen, da die Patienten erst mit Beschwerden zur ärztlichen Untersuchung kommen, wenn die frühzeitig ablaufenden initialen Ereignisse schon durchlaufen sind. Daher werden die meisten Studien an Tiermodellen bzw. an isolierten Zellen durchgeführt. Diese sind standardisiert, reproduzierbar und es kann jeder Schweregrad der Pankreatitis simuliert werden. Es können viele zelluläre Ereignisse auf molekularer Ebene näher untersucht werden, die sich in der klinischen Situation einer Pankreatitis widerspiegeln.

Zum Studium einer experimentellen AP wird daher das Tiermodell der Maus, nicht zuletzt durch die Vielfalt an etablierten Mausstämmen und genetisch veränderten Mauszüchtlinien seit vielen Jahren genutzt [108].

1.2.1 Taurocholat-induzierte Pankreatitis

Viele Tiermodelle wurden für die Untersuchung der Mechanismen wie der Prognose und der Behandlung der humanen schweren AP entwickelt. Besonders geeignet für die Untersuchung der AP ist das Modell der Taurocholat-induzierten Pankreatitis von Aho und Koskensalo [109, 110, 111]. Dieses Modell führt in der Regel durch eine retrograde Injektion oder Infusion von Natriumtaurocholat (TC, Gallensalz) in den Pankreasgang zu einer AP. Dadurch wird die klinische Situation einer Gallenstein-Pankreatitis mit Reflux von Gallensekret in das Pankreasgangsystem und einer temporären Behinderung der Pankreassekretion simuliert [112].

Nachteilig in diesem Infusionsmodell ist, dass ein zu hoher Infusionsdruck selbst mit inerten Substanzen zu einer Pankreatitis führen kann. Deshalb hängt der Schweregrad der Pankreatitis nicht allein von der infundierten Substanz und deren Konzentration ab [113, 114].

Diese Methode erzeugt hämorrhagische Pankreasnekrosen, die zuerst fokal sind, ehe im späteren Verlauf große Teile des Organs zerstört werden. Zudem treten Fettgewebnekrosen und Aszites auf. Charakterisiert ist dieses Modell durch eine sehr frühe transiente Aktivierung von Trypsinogen, Pankreasödemen, Hyperamylasämie, Einwanderung von entzündlichen Leukozyten in das Pankreas sowie die intrapankreatische Generierung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 [115].

Für einen milderen Pankreatitisverlauf kann anstelle des TCs auch Glycodesoxycholat verwendet werden [116].

1.2.2 Hyperstimulationsmodell mit Caerulein

Die intraperitoneale Zufuhr physiologischer Konzentrationen von Caerulein (CCK-Analogen, Darmhormon) stimuliert die Enzymsekretion im exokrinen Pankreas. Im Gegensatz dazu führt eine supramaximale Gabe (50 µg/kg Körpergewicht, KG) zu einer Blockade der Sekretion [117, 47, 118]. Die Sekretionsblockade wird durch eine Aktivierung des ‚low affinity state‘ des CCK-Rezeptors innerhalb von kurzer Zeit hervorgerufen. Die Blockade der Enzymsekretion hat eine Beeinträchtigung des Azinuszell-Metabolismus zur Folge und resultiert in einer Zymogen-Akkumulation mit frühzeitiger Aktivierung der digestiven Enzyme sowie einer Zell-Schädigung [112]. Dadurch kommt es zum Anstieg des Enzymgehalts im Serum [119]. Die

akute Form einer milden ödematösen Pankreatitis wird im Allgemeinen durch Cholezystokinin-Analoga oder auch cholinerge Substanzen in supramaximalen Dosen ausgelöst. Die Vorteile dieses Stimulationsmodells liegen in der geringen Invasivität sowie der guten Reproduzierbarkeit der pathogenetischen Abläufe und histologischen Veränderungen begründet. Nach der Caerulein-Gabe treten bereits nach ein bis zwei Stunden intrazelluläre Vakuolen auf, die die frühesten, mikroskopisch nachweisbaren Veränderungen im Pankreas aufzeigen. Die Vakuolen können Zymogengranula und geschädigte Zellorganellen enthalten [120]. Im folgenden Verlauf der Pankreatitis treten vereinzelt Parenchymnekrosen auf. Später kommt es zur Einwanderung von Neutrophilen und mononuklearen Zellen. Bedingt durch die milde Verlaufsform einer Caerulein-Pankreatitis treten schwere Krankheitsbilder wie nekrotische Hämorrhagien, die zu einer hohen Morbidität und Mortalität führen, kaum in Erscheinung. Damit kommt das Hyperstimulationsmodell der milden interstitiellen ödematösen Form der Pankreatitis beim Menschen sehr nahe [121].

Eine chronisch fibrosierende Pankreatitis kann durch eine wiederholte Gabe des Caeruleins induziert werden. Allerdings ist dann keine Kalzifikation, Kalziumablagerung im Pankreas, zu beobachten [120].

1.3 Glutaminylyklase und Iso-Glutaminylyklase

Die Glutaminylyklase (QC) ist ein monomeres Metalloenzym, welches ein Molekulargewicht von ca. 38-40 kDA besitzt [122]. Sie wurde zuerst aus Latex/Milch der tropischen Pflanze *Carica papaya* isoliert [123, 124, 125]. Fast ein viertel Jahrhundert später wurde eine entsprechende enzymatische Aktivität in Rindern, Schweinen (aus Hypophysen-Homogenaten) und Menschen sowie in anderen Säugern entdeckt [126, 127, 128, 129]. Die Säugetier-QC hat auffallende Homologien zu den bakteriellen Doppel-Zink-Aminopeptidasen [130, 131]. Imidazol und Imidazol-Derivate wurden als kompetitive Inhibitoren von QC identifiziert [125].

QC katalysiert die Zyklisierung von N-terminalem Glutamin zu Pyroglutamat (pGlu), die zumeist zu einer Erhöhung der proteolytischen Stabilität und der physiologischen Aktivität der N-terminal zyklisierten Proteine führen. Dadurch können diese Proteine wie Neuropeptide, Peptidhormone und Chemokine (MCP-1), Fraktalkine (CX3CL1) Thyrotropin-Releasing-Hormon, Gonadotropin-Releasing Hormon oder Neurotensin, zu einem fulminanten Verlauf einer Erkrankung, wie auch einer schweren akuten Pankreatitis beitragen [96, 126, 130, 132]. In Abbildung 7 ist diese Reaktion dargestellt.

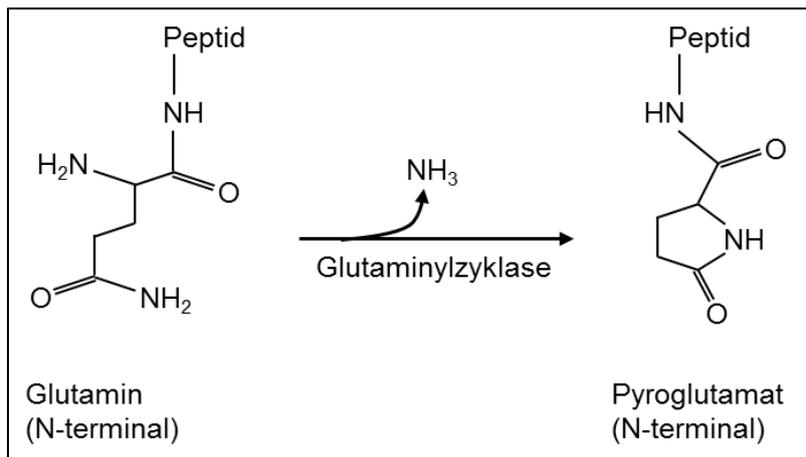


Abbildung 7: Zyklisierung des Glutamins (N-terminal) zu Pyroglutamat durch Glutaminylyklyase (QC), unter Abspaltung von NH_3

QC1 (Qpct) ist ein sekretiertes Protein, das in Richtung des regulierten Sekretionsweges gerichtet ist. In Säugetieren konnte eine weitere Glutaminylyklyase, die IsoQC (auch QPCTL ‚glutaminyly peptide cyclotransferase-like enzyme‘), identifiziert werden. Die primäre Struktur der humanen IsoQC zeigt im Bereich des Zink-Bindungs-Motifs eine ähnliche Struktur wie die der humanen QC1. Ähnlich zu QC1 wird IsoQC konkurrierend durch Imidazol und Zysteamin inhibiert. Die Inaktivierung durch Metallchelatoren suggeriert eine konservierte, metallabhängige, katalytische Funktion beider Isoenzyme. Im Gegensatz zum QC1 fehlen dem Isoenzym die N-Glykosylierungsstellen. IsoQC von Mäusen wurde bisher in verschiedenen Gehirnregionen, peripheren Organen wie Niere und Lunge und mit geringeren Expressionen im Herz und der Milz nachgewiesen [133]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die IsoQC das MCP-1 in seinen biologisch aktiven Zustand überführt [134].

Im neuroendokrinen Gewebe, z.B. dem Hypothalamus und der Hypophyse, ist die QC bei Säugern in großer Menge vorhanden [127, 135]. Pathologisch wird eine Beteiligung von QC bei rheumatoider Arthritis, Osteoporose und M. Alzheimer diskutiert [136, 137]. Peptide, die N-terminales pGlu enthalten, sind Hauptbestandteile von $\text{A}\beta$ -Peptiden im Kern der neuritischen Plaques [138, 139, 140]. Dabei ist zu unterscheiden, dass im neuronalen Gewebe hauptsächlich QC1 vorkommt und im Organismus die IsoQC ein eher ubiquitär vorkommendes Enzym ist [133, 141].

Das Ausschalten von QC1 bzw. IsoQC am Modell von knock-out-Mäusen zeigt kaum Auswirkungen auf den Organismus [142, 143], da die Zyklisierung von Gln zu pGlu auch spontan und unabhängig von QC erfolgen kann [144, 145]. Diese Vorgänge können die Wirkung spezifischer QC-Inhibitoren, zur Untersuchung des therapeutischen Potenzials bei entzündlichen Erkrankungen, wie auch im Tiermodell, begrenzen.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Glutaminylyklase als neuartiges Target zur Behandlung der AP als inflammatorische Erkrankung zu beurteilen. Dabei wurde die Wirkung einer Glutaminylyklase-Hemmung auf die Ausprägung einer experimentellen AP untersucht.

Die Experimente basieren auf der Hypothese, dass die inflammatorische Reaktion bei AP die Azinuszell-Schädigung die systemische Inflammation und damit das Überleben der betroffenen Patienten maßgeblich beeinflusst.

Die Testung eines QC-Inhibitors 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-5-(4-propoxyphenyl)imidazolidine-2,4-dione (PQ529), der uns freundlicherweise von der Firma Probiodrug AG (Halle/Saale, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte im Hinblick auf die Verhinderung der Entstehung und Freisetzung pyroglutamat-haltiger pro-inflammatorischer Chemokine wie MCP-1. Wie bereits aufgeführt, ist eine Zyklisierung des N-terminalen Glutamins im MCP-1 vorwiegend auf die Aktivität des im Golgi-Apparat von Entzündungszellen lokalisierten Glutaminylyklase-Isoenzym IsoQC zurückzuführen [95]. In deren Folge wird das Protein im Sekretionsweg proteolytisch stabilisiert und in seiner chemoattraktiven Wirkung verstärkt [96]. Dementsprechend sollte eine Hemmung der QC, insbesondere der IsoQC eine Verringerung des MCP-1-Spiegels und eine Verminderung der Inflammation im Pankreas herbeiführen.

Der klinischen Situation Rechnung tragend, dass eine medikamentöse Intervention vor allem bei schwerer AP wünschenswert sei, wurden die Untersuchungen am Modell der Taurocholat-AP durchgeführt. Dies machte es erforderlich, neben dem prophylaktischen Einsatz des QC-Inhibitors, vor allem auch das mögliche therapeutische Potenzial des QC-Hemmstoffes PQ529 eingehend zu analysieren.

Mit der milden Verlaufsform einer murinen Caerulein-induzierten Pankreatitis ist erfahrungsgemäß nur eine geringe Erhöhung der pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren verbunden. Es ist demnach nur ein geringer Einfluss und therapeutischer Nutzen durch Einsatz des QC-Inhibitors zu erwarten.

Aufgrund der sehr begrenzten Anzahl an verfügbaren IsoQC- und QC1-deletierten Versuchsmäusen wurden diese Mausstämme vorwiegend zur Untersuchung auf eine Pankreas spezifische Expression der QC-Isoformen eingesetzt. Zur Charakterisierung der Expression und Lokalisation der Glutaminylyklase und deren Isoformen in Azinuszellen wurden dazu vergleichende Untersuchungen von QC1- und IsoQC-k.o. Mäusen mit WT-

Kontrollmäusen unter physiologischen Bedingungen bzw. nach Induktion einer Caerulein-induzierten Pankreatitis durchgeführt.

Mit den Experimenten sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Lässt sich die QC1-Isoform der QC im Pankreas-Gewebe der Maus nachweisen und welche intrazelluläre Lokalisation weist diese auf?
2. Wird in den Azinuszellen auch die Isoform IsoQC- exprimiert?
3. Welche Wirkung zeigt eine QC-Hemmung auf die Ausprägung einer schweren Taurocholat-induzierten Pankreatitis der Maus hinsichtlich der Pankreas-Schädigung, der Entzündungsreaktion und der intrazellulären Trypsinogen-Aktivierung?
4. Lässt sich eine mögliche QC-Inhibitor-Wirkung auch bei therapeutischer Anwendung nachweisen?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/Vertrieb
Cryo-Röhrchen, 4 ml, steril, mit Innengewinde, freistehend	Carl Roth, Karlsruhe
epT.I.P.S. Standard (0,1 µl-10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Mikroplatten, weiß, F 96 Well	NUNC, Roskilde
Mikroplatten, farblos, PS 96 Well, flat bottom	Greiner Bio-one, Essen
PP-Röhrchen, steril 15 und 50 ml	Greiner Bio-one, Essen
Probengefäße f, Analyser, Coulter Counter	Greiner Bio-one, Essen
Q-Tips, Cotton Swabs	Unilever, Hamburg
Roti [®] -PVDF, Transfermembran, Porengröße 0,45 µm	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Absorptions- und Fluoreszenz-Mikrotiterplatten Reader	Spectrafluor Plus	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Absorptions- und Fluoreszenz-Mikrotiterplatten Reader	SAFIRE	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Chromatograph-Kühlschrank (Elektrophorese)	Super 720-Chromat	Kirsch, Offenburg
Elektrophorese-Stromversorgung	Power Supply ESP 600	PharmaDiagnos, Freiburg
Feinwaage	CP 225D – OCE	Sartorius AG, Göttingen
Gefrierschrank	GS 5203 Comfort	Liebherr, Ochsenhausen
Mini Hoefer Gelsystem	Hoefer Mini Ve Complete, Vertical Electrophoresis System	GE HealthCare, München
Homogenisator (2.5.2)	Potter-Elvehjem-Homogenisator	Schütt-Labortechnik Göttingen
Homogenisator (2.5.1)	Ultra-Turrax T 25	IKA-Labortechnik, Staufen
Inkubationsschüttler	Enviro-Genie Typ SI 1201	Scientific Industries INC, Bohemia New York Ort
Kühlschrank	Premium frost-free	Liebherr, Ochsenhausen

Fortsetzung Tabelle 3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Kühlschrank	Med-520	Kirsch, Offenburg
Laborwaage	R 180 D - *d1	Sartorius AG, Göttingen
Peristaltikpumpe	P-1 / Peristaltikpumpe	PharmaciaLkb, Schwäbisch Gmünd
Rührer	R 3t Magnetrührer	Mlw, Medingen
Schüttler	Gfl 3017	Gfl, Burgwedel
Stromversorgungsgerät	Elektrophorese	Bio-Rad Labor, München
Tiefkühlschrank (-80°C)	Ult 2186-3-V12	Revco, Berlin
Tierbox (Scantainer groß)	Tierbox 50-Scant.-D-110	Scanbur A/S, Karlslunde
Tierbox (Scantainer klein)	Scantainer 50-B-110	Scanbur A/S, Karlslunde
Ultraschall-Desintegrator	Uw 70	Bandelin-Electronic., Berlin
Ultraschall-Desintegrator	SonopulsHd 70/gm70 Hd	Bandelin-Electronic., Berlin
Wasserbad	Gfl 1012 Wasserbad	Gfl, Burgwedel
Zentrifuge	Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Tischzentrifuge)	Multi-Spin MSC-3000	Kisker Biotech., Steinfurt
Zentrifuge (Zell-Fraktionierung)	Sigma 3k 30	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode

Tabelle 4: Operationszubehör

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Ethicon Prolene Suture, 8776H 6-0, 8975H4-0	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Katheter, Polyethylenschlauch	Smiths Medical™ Portex™ Fine Bore Polythene, Fraureuth, Deutschland
Polyester Weiß Ds16 Usp4/0 17218113	Catgut, Markneukirchen
Op-Transporter 1140-60/A	Stierlen-Maquet, Rastatt
Op-Hilfs-Leuchte Oslo-Wand	Heraeus, Hanau
Pinzette, chirurgisch	Aesculab, Tuttlingen
Pinzette, gebogen und stumpf	Aesculab, Tuttlingen
Scheren, chirurgisch	Aesculab, Tuttlingen
Tierfütterungsnadel Barrel 30 mm, Gauge 20	Fine Science Tolls GmbH, Heidelberg
Untersuchungsleuchte Hanaulux Blue 30	Heraeus, Hanau
Yasargil-Mini-Aneurysma-Clip, FE 693K	Aesculab, Tuttlingen

2.2 Chemikalien und Puffer

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Vertrieb
Acrylamid; $\geq 99,9\%$; p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Advanced Protein Assay Reagent, 5x Concentrat	Cytoskeleton Inc, Denver
Amersham ECL Advance Western-Blotting Detection Kit	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Ammoniumperoxodisulfat, 98 %, p.a., ACS	Carl Roth, Karlsruhe
Aprotinin, aus Rinderlunge	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bisacrylamid, $\geq 98\%$	Carl Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
o-Dianisidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-2H ₂ O	VEB Laborchemie, Apolda
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA, 0,5 M; pH: 8,0	Gibco, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, EGTA	Calbiochem, Darmstadt
Formaldehyd-Lösung, phosphatgepuffert, 4 %, pH: 6,9	Merck, Darmstadt
Gln-AMC*HCl	Probiodrug AG, Halle
Glucose, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Glycerin, Rotipuran $\geq 86\%$, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Glycylglycin, Pufferan® $\geq 99\%$, Ultra Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
Hydroxyethyl-Cellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Applichem, Darmstadt
Ketamin 10 %, Injektionslösung	CEVA, SanteAnimale, Düsseldorf
Kollagenase, CLS PA	Cell Systems, Troisdorf
Leupeptin, Hemisulfat-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Applichem, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Applichem, Darmstadt
Magnesiumsulfat, $\geq 99\%$, p.a., ACS	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	VWR, Darmstadt
MOPS	Serva, Heidelberg

Fortsetzung Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Vertrieb
Natriumchlorid; $\geq 99,9\%$; p.a.	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat, zur Analyse EMSURE [®] ACS, Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Fluka, Steinheim
Natriumdoxicholate, $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Taurocholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Percoll [®] ; pH: 8,5-9,5 (20 °C)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyroglutamyl-Aminopeptidase (pGAP), rekombinant	Probiodrug AG, Halle
Rompun 2 %, Injektionslösung	AppliChem, Darmstadt
SDS ultra pure; $\geq 99,9\%$; f. d. Elektrophorese	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose, BioUltra, for molecular biology, $\geq 99,5\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED, 99 %, p.a., f. d. Elektrophorese	Carl Roth, Karlsruhe
Tricine	AppliChem, Darmstadt
Tris, Pufferan $\geq 99,9\%$, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Ferak, Berlin
TWEEN 20, Ph. Eur.	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl), 37 % (w/v), rauchend	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid-Lösung, ACS Reagenz, 30 % (w/w) in H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 6: Substrate, Enzyme und Inhibitoren

Substrat, Enzym, Inhibitor	Hersteller/Vertrieb
7-Amino-4-methylcoumarin (freies AMC)	Bachem, Bubendorf
Boc-Gln-Ala-Arg-AMC	Pepta Nova GmbH, Sandhausen
Caerulein	Bachem Holding AG, Bubendorf
PQ529, QC-Inhibitor, Hemmstoff	Probiodrug AG, Halle
n Plus Protein™ Standards Unstained	Bio-Rad, München
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Complete	Roche, Mannheim
Pyroglutamyl-Aminopeptidase (pGAP), Hilfsenzym	Probiodrug AG, Halle
Q-AMC*HCL	Probiodrug AG, Halle
QC-Positiv Kontrolle, rekombinantes Maus-QC	Probiodrug AG, Halle
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Suc-AAPF-AMC	Pepta Nova GmbH, Sandhausen
Z-Arg-Arg-4-methyl-coumarin-7-amide	Bachem Holding AG, Bubendorf

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Natrium-Taurocholat (2 %-ig) zur Pankreatitis-Induktion	
Natrium-Taurocholat-Lösung	2 % (w/v) Natrium-Taurocholat in 25 mM Glycylglycin lösen
MPO ELISA	
Lysis Puffer MPO	200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 10 mM Tris; 10 % (v/v) Glycerin; 1 mM PMSF; 1 µg/ml Leupeptin; 28 µg/ml Aprotinin; pH: 7,4
Lösungen für Aufarbeitung nach 2.5.2	
(HS 1) = HS-Puffer (Homogenisationspuffer)	250 mM Saccharose; 10 mM Zitronensäure; 0,5 mM EGTA; 0,1 mM MgSO ₄ ; pH: 6,0 mit 1 M NaOH
(2xHS) = 2xHS-Puffer	500 mM Saccharose; 20 mM Zitronensäure; 1 mM EGTA; 0,2 mM MgSO ₄ ; pH: 6,0 mit 1 M NaOH
Percoll-Lösung	Percoll mit 2xHS-Puffer 1:1 (v/v) mischen
Homogenisationspuffer für Aufarbeitung nach 2.5.1 und 2.5.3	
MOPS-Puffer	5 mM MOPS; 1 mM MgSO ₄ ; 250 mM Saccharose; pH: 6,5
Trypsin-Messung	
Trypsin-Puffer	50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM CaCl ₂ *2H ₂ O; 0,01 % (v/v) BSA; pH: 8,0 mit 3 M HCl

Fortsetzung Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Isolation pankreatischer Azinuszellen	
KHP	110 mM NaCl; 32,5 mM NaHCO ₃ ; 2 % (v/v) MEM; 1,15 mM MgCl ₂ *6H ₂ O; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 0,2 % (v/v) Glucose; 4,7 mM KCl
Zentrifugations-Lösung	0,5 mM CaCl ₂ ; 4 % (v/v) BSA; gelöst in KHP
Kollagenase-Lösung	0,1 mM CaCl ₂ ; 0,1 % (v/v) BSA; 300 U/ml Kollagenase CSL PA gelöst in KHP
Rinse-Lösung	0,1 mM CaCl ₂ ; 1 % (v/v) BSA; gelöst in KHP
Glutaminylyklase Assay Puffer	
Reaktionspuffer-QC	50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH: 8,0
Substratlösung	2,5 mM Q-AMC*HCl
Hilfsenzym Pyroglutamyl-Amino-peptidase (pGAP)	ca. 0,02 U/ml; mit Reaktionspuffer-QC
QC-Inhibitor	6,25 mM PQ529, gelöst in 0,9 % physiologischer Kochsalzlösung
QC-Positiv - Kontrolle	rekombinante QC1 aus Maus (Proteingehalt: 0,38 mg/ml, gelöst in Reaktionspuffer-QC mit 50 % Glycerol), 1:50 mit H ₂ O verdünnen
Western-blot-Puffer [146]	
Anodenpuffer	0,2 M Tris; pH: 8,9 mit HCl
SDS-Kathodenpuffer	0,1 M Tris ; 0,1 M Tricine ; 0,1 % (w/v) SDS ; pH : 8,25
Gel-Puffer	3,0 M Tris; 0,3 % (w/v) SDS; pH: 8,45 mit HCl
Towbin-Puffer	25 mM Tris; 192 mM Glycerin; 5 % (v/v) Methanol; 3,5 mM SDS; pH: 8,3
Acrylamid/bis-Acryl-amid-Mix (AB-Mix)	48 % (w/v) Acrylamid; 1,5 % (w/v) Bisacrylamid
10x TBS-Puffer	0,5 M Tris-HCl; 1,5 M NaCl
1x TBST	10x TBS-Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnen + 0,1 % (v/v) Tween 20
Entfärbe-Lösung	50 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure
4x Laemmli-Puffer	40 mM Tris; 40 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 0,04 % (v/v) Bromophenolblau; pH: 6,8 mit 1 M HCl, gebrauchsfertig nach Zugabe von 12,5 % Mercaptoethanol
RIPA-Puffer	150 mM NaCl; 1 % (w/v) IGEPAL CA-630; 0,05 % (w/v) Na-doxycholate; 0,1 % (w/v) SDS; 50 mM Tris-HCl; pH: 8,0
HEPES-Puffer mit Inhibitor-Cocktail	1 Tablette (Protease-Inhibitor-Cocktail), in 50 ml HEPES Puffer gelöst

Tabelle 8: Antikörper für den Western-Blot

Primär-Antikörper	
mIsoQC-AK 5407	rabbit anti-Maus IsoQC-AK, Firma Probiodrug AG Halle
mQC-AK 6001 (QC1 AK)	rabbit anti-Maus QC1-AK, Firma Probiodrug AG Halle
mQC-AK 10269 (QC1 AK)	rabbit anti-Maus QC1-AK, Firma Probiodrug AG Halle
Sekundär Antikörper	
sc-2054	goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology
sc-2020	donkey anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology

2.3 Versuchstiere und Haltung

Die Durchführung der nachfolgend beschriebenen Tierversuche erfolgte auf der Grundlage der Erteilung einer Ausnahmegenehmigung und des Sachkundenachweises nach Absolvierung eines tierexperimentellen Kurses des beteiligten Personals. Die Versuche an Tieren (Mäusen) wurden auf Grundlage der beiden genehmigten Tierversuchsanträge mit den Aktenzeichen 42502-2-974 "Evaluierung des therapeutischen Potenzials neu entwickelter Inhibitoren der Glutaminylyklase (QC) für die Verminderung des Schweregrades und der Letalität bei der Taurocholot-Pankreatitis der Maus" bzw. 42502-2-795 „Evaluierung des therapeutischen Potenzials neu entwickelter Inhibitoren der Glutaminylyklase (QC) bei akuter Pankreatitis“ gemäß §9(1) Satz 4 des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden kommerziell erhältliche männliche NMRI-Mäuse der Firma Janvier (Frankreich) sowie QC1-knock-out- bzw. IsoQC-knock-out-Mäuse mit C57BL/6N-Hintergrund [95, 142] und deren Wild-Typ-Kontroll-Mäuse von der Firma Ingenium Pharmaceuticals AG (München, Deutschland) eingesetzt.

Die Tiere wurden bei einer Temperatur von ca. 22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50 % und bei einem 12:12 h Hell-/Dunkel-Zyklus gehalten. Die Mäuse erhielten Standardfutter und bekamen Trinkwasser ad libitum.

2.4 Pankreatitis-Modelle

2.4.1 Hyperstimulationsmodell mit Caerulein

Eine durch Caerulein-Hyperstimulation induzierte Pankreatitis wurde durch intraperitoneale Injektionen des Cholezystokinin-Analogons Caerulein in einer Dosis von 50 µg Caerulein/kg Körpergewicht (KG) im stündlichen Intervall erzeugt (Abbildung 8). Die Kontrolltiere bekamen analog physiologische Kochsalzlösung injiziert. Vor Beginn des Experiments wurden die Mäuse für 16 h nüchtern gesetzt, hatten aber freien Zugang zum Trinkwasser. Die Tötung der Caerulein-unbehandelten Tiere erfolgte zum Zeitpunkt 0 h. Die Tötung der Caerulein- bzw. NaCl-behandelten Tiere erfolgte 1-24 Stunden nach der ersten Injektion durch Dekapitation. In der Abbildung 8 ist das Injektionsschema und die dazugehörige Obduktionszeit dargestellt.

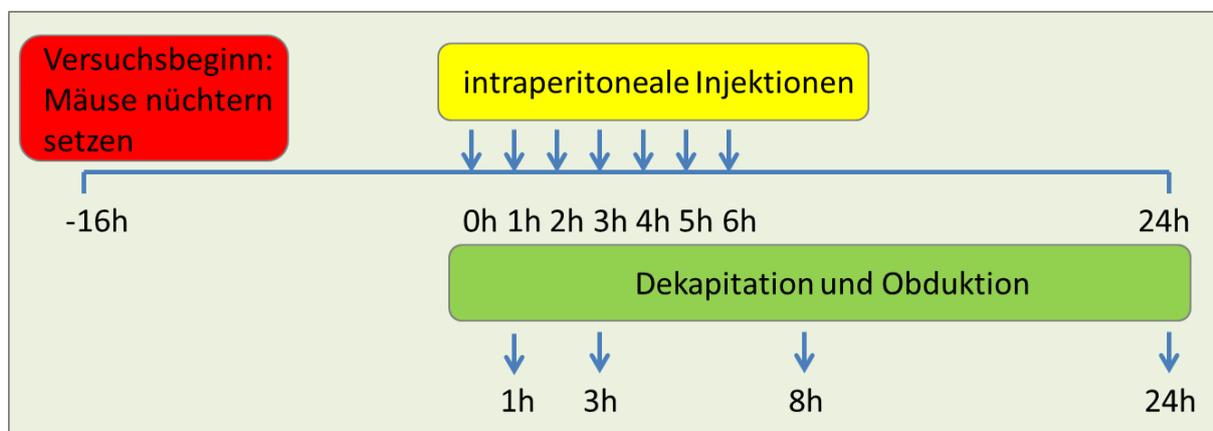


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Caerulein-/NaCl-Injektion

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf des Hyperstimulationsmodells. Es sind sieben Injektionszeitpunkte und die Obduktionszeiten nach 1 h, 3 h, 8 h und 24 h dargestellt.

Das Blut der Mäuse wurde in 1,5-ml-Eppendorf-Tubes aufgefangen. Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das erhaltene Serum wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bei der Obduktion wurde das Pankreas entnommen, in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und das Organgewicht ermittelt. Danach wurde das Pankreas für die Percoll-Dichtegradienten-Fraktionierung präpariert, siehe Punkt Auftrennung im Percoll-Dichtegradienten 2.5.2.

2.4.2 Taurocholat-induzierte Pankreatitis

Die Mäuse wurden nach 16 h Fasten anästhesiert. Die Narkose erfolgte mittels intramuskulärer (i.m.) Injektion von 2 μ l/g KG des Narkosegemisches (40 % Rompun, 10 % Ketanest, 50 % physiologische NaCl), wobei die Tiere vor Auskühlung geschützt wurden. Die Laparatomie erfolgte an der Linea alba. Mit Q-Tips wurde im Retroperitonealraum das Duodenum mit angrenzendem Pankreas frei präpariert. Die Ligatur des Ductus choledochus erfolgte hilusnah mittels Aneurysma-Mini-Clips, um ein Abfließen der zu instillierenden Natrium-Taurocholat-Lösung in die Leber zu verhindern. Abbildung 9 verdeutlicht diese Vorgehensweise.

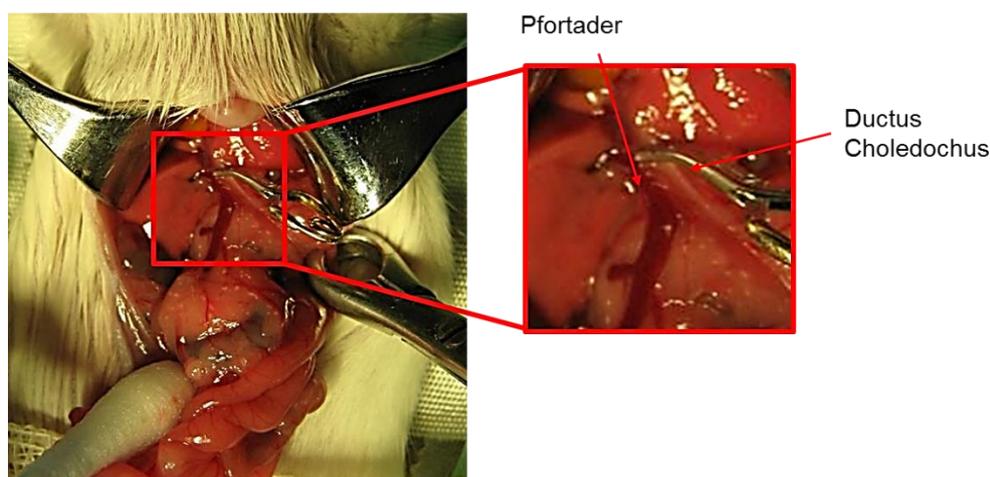


Abbildung 9: Ligatur des Pankreasgangs mittels Aneurysma-Mini-Clips

Die Papilla duodeni major, auch Papilla Vateri genannt, wurde im Duodenum aufgesucht und gegenüber die Duodenalwand mit einer Punktionskanüle inzidiert. In diese Inzision wurde ein Katheter geführt und durch die Papilla Vateri in den Pankreasgang geschoben. Es wurden 75 μ l körperwarme 2 %-ige Natrium-Taurocholat-Lösung (pH-Wert: 7,5) bzw. 0,9 %-ige Kochsalz-Lösung bei gleichmäßig mildem Druck in das biliopankreatische Gang-System injiziert [109, 110, 111]. Dies ist in Abbildung 10 dargestellt.



Abbildung 10: Instillation von Trypanblaulösung zur demonstrativen Darstellung in den Pankreasgang

Der Katheter wurde vorsichtig entfernt, die Inzision in der Duodenalwand mit einer Naht verschlossen und der Clip entfernt. Bevor die Bauchdecke verschlossen wurde, erfolgte die Gabe von 250 µl Ringerlösung in den Retroperitonealraum der Maus. Die Bauchhaut und das Peritoneum wurden getrennt voneinander mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Je nach Agilität der Maus, wurde zweimal 100 µl Ringerlösung i.p. gespritzt.

Die orale Gabe des Inhibitors (PQ529) erfolgte mit einer Schlündel-Nadel prophylaktisch eine Stunde vor und fünf Stunden nach Induktion der Pankreatitis. Die therapeutische Gabe erfolgte +1/+5 h, +2/+5 h und +4/+7 h nach Induktion der Pankreatitis. Der Inhibitor wurde in einer Dosis von 100 mg PQ529/kg KG (gelöst in 0,5 %-iger [w/v] Hydroxyethyl-Cellulose [CEL] in 0,9 %-iger NaCl-Lösung als Solvent) appliziert. Die Kontrolltiere erhielten in analoger Vorgehensweise CEL ohne PQ529-Inhibitor.

Zur Organentnahme und Blutgewinnung wurden die Tiere 24h nach Pankreatitis-Induktion obduziert. Die Gewinnung des Serums und Entnahme des Pankreas erfolgte analog wie im Abschnitt 2.4.1. beschrieben.

In dieser Aufarbeitung wurde das Pankreas zusätzlich in Pankreaskopf und Pankreasschwanz geteilt. Anschließend wurden die Organstücke separat gewogen. Von den beiden Organstücken wurden kleine Gewebeproben für die Histologie entnommen und in 4 %-igem, phosphatgepuffertem Formaldehyd fixiert. Die beiden Pankreasstücke wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Pankreasstücke erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C. Die Aufarbeitung der Pankreata erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben. Das Serum aus dem Blut wurde, wie im vorherigen Punkt beschrieben, gewonnen und gelagert.

In der folgenden Tabelle sind die Maus-Untersuchungsgruppen zur Taurocholat-induzierten Pankreatitis mit und ohne Inhibitor-Gabe dargestellt.

Tabelle 9: Untersuchungsgruppen Taurocholat-induzierte akute Pankreatitis

Gruppe	Maus-Stamm	orale Gabe		Induktion in den Gang
		CEL	PQ529	
Pankreatitis-Kontrolle	NMRI	+	-	NaCl
Wirkstoff-Kontrolle	NMRI	-	+	NaCl
Pankreatitis-Gruppe	NMRI	+	-	2 % TC
Pankreatitis-Gruppe + Wirkstoff	NMRI	-	+	2 % TC
Pankreatitis-Kontrolle	QC-WT x C57BL/6	-	-	NaCl
	QC-k.o.x C57BL/6	-	-	NaCl
Pankreatitis-Gruppe	QC-WT x C57BL/6	-	-	2 % TC
	QC-k.o. x C57BL/6	-	-	2 % TC
Pankreatitis-Kontrolle	IsoQC-WT x C57BL/6	-	-	NaCl
	IsoQC-k.o. x C57BL/6	-	-	NaCl
Pankreatitis-Gruppe	IsoQC-WT x C57BL/6	-	-	2 % TC
	IsoQC-k.o. x C57BL/6	-	-	2 % TC
Pankreatitis-Gruppe + Wirkstoff	IsoQC-k.o.x C57BL/6	-	+	2 % TC

2.5 Präparation der Pankreata

2.5.1 Pankreas-Homogenisierung zur Untersuchung von Pankreatitis-Markern

Das Pankreasstück wurde in ein Reagenzglas gegeben und mit neun Volumenanteilen (in µl) MOPS-Puffer je Gewichtsanteil (in mg) Pankreas überschichtet. Die Aufarbeitung erfolgte Eiskühlt mit dem Ultra-Turrax. Dabei wurde das Pankreas in drei Hüben bei 24.000 rpm homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat zur weiteren Aufarbeitung mittels Ultraschall 3x10 s beschallt. Um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen, wurde das Homogenat bei 4 °C für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Aliquots aufgeteilt, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Auftrennung im Percoll-Dichtegradienten

Das nach 2.4.1 vorbereitete Pankreas wurde in 1xHS Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Organ in ein Potter-Glasgefäß (Nr. 20) überführt und mit 700 µl 1xHS Puffer versetzt. Die Homogenisierung erfolgte mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisator in drei Hüben bei 2.000 rpm. Zur Abtrennung der Zelltrümmer und der Zellkerne wurde das Homogenat in ein 2- ml-Eppendorf-Tube (1) überführt und für 5 min mit 200 g bei 4 °C zentrifugiert. Der postnukleäre Überstand wurde in ein neues 2-ml-Eppendorf-Tube (2) überführt. Das Pellet aus

Tube (1) wurde in 700 μ l 1xHS Puffer resuspendiert und im Potter-Glasgefäß unter denselben Bedingungen mit drei Hüben aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das Homogenat in das 2- ml-Eppendorf-Tube (1) überführt und mit dem Eppendorf-Tube (2) unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pankreas-Homogenat wurde gewonnen, indem beide Überstände in einem neuen Eppendorf-Tube (3) vereinigt und gemischt wurden. In Abbildung 11 ist dieser Aufschluss grafisch dargestellt.

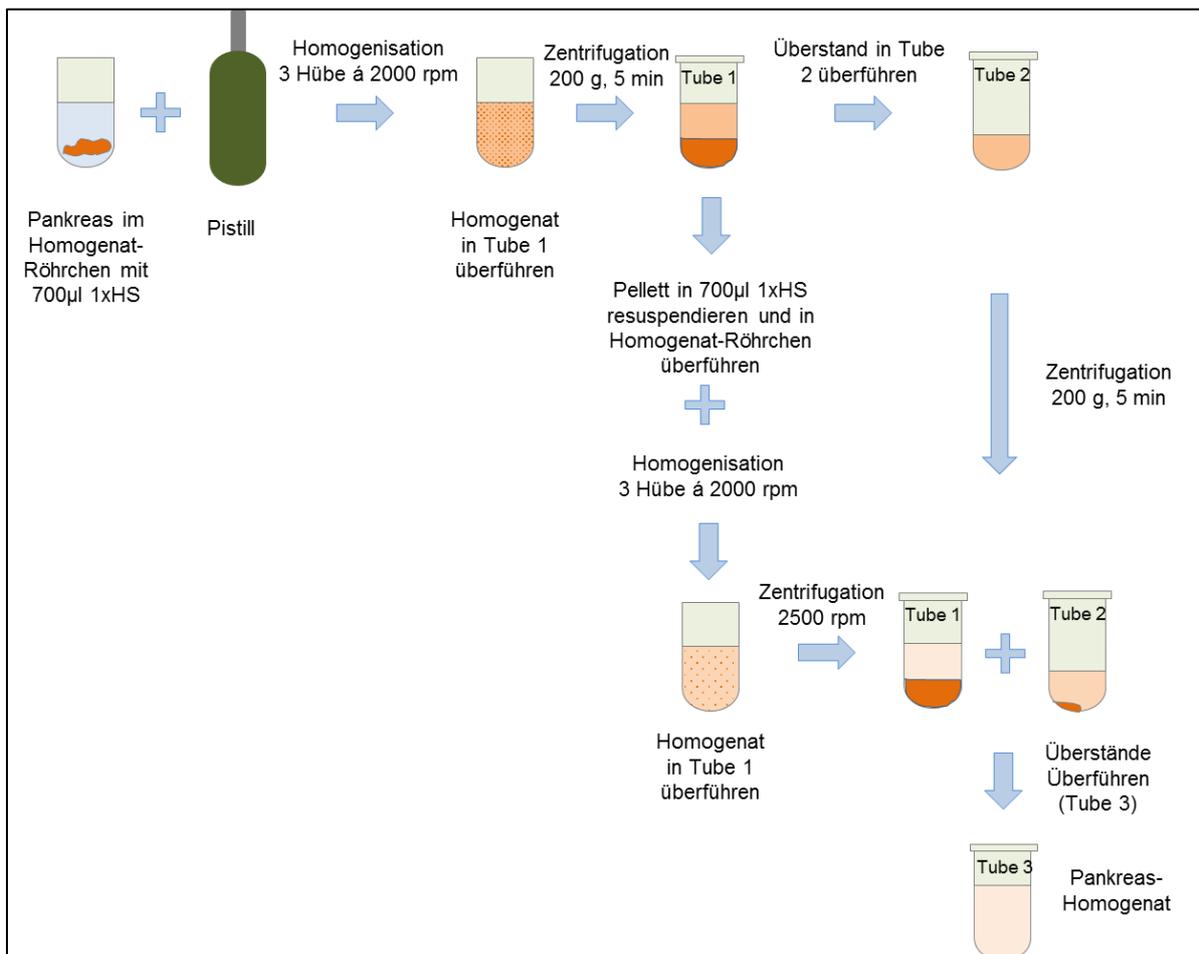


Abbildung 11: Schema zur Herstellung der Pankreas-Homogenate zur subzellulären Fraktionierung mit Hilfe der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

In einem Sigma-Zentrifugen-Röhrchen wurden 8,5 ml einer 50 %-igen Percoll-Lösung vorgelegt und 950 μ l des Pankreas-Homogenates darüber geschichtet. Die Auftrennung der subzellulären Bestandteile des Pankreas-Homogenates im Percoll-Dichtegradienten erfolgte durch Zentrifugation bei 50.000 g für 45 min. Der Inhalt des Röhrchens mit den enthaltenen Zellkompartimenten wurde anschließend über eine am Boden des Röhrchens positionierte Kanülenöffnung, d.h. beginnend mit den Fraktionen hoher Dichte, mit Hilfe einer Peristaltikpumpe in 46 Fraktionen mit einer Samplingrate von 15 s/Fraktion (ca. 190-210 μ l/Fraktion) aufgeteilt und eisgekühlt.

Hohe Konzentrationen an Percoll führen zu einer Beeinträchtigung des Trennverhaltens der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese. Deshalb wurde das Percoll aus den „schwere“ Zymogengranula enthaltenden Fraktionen 5-16, d.h. mit einer Dichte > 1,12 g/ml, unmittelbar nach Auftrennung der Pankreata im Percoll-Dichtegradienten entfernt. Dazu wurden je 150 µl der Fraktionen 5-16 abgenommen und in ein neues 2- ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zu diesen Fraktionen wurden je 1,35 ml HEPES-Puffer mit Protease-Inhibitormix gegeben und vorsichtig gemischt. Die Proben wurden dann mit 20.000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 400 µl HEPES-Puffer mit Protease-Inhibitor unter gleichen Bedingungen gewaschen. Zur Vermeidung eines Pellet-Verlustes wurde der Überstand nur bis auf ein Restvolumen von 30 µl entfernt. Das Pellet wurde durch Zugabe von je 50 µl RIPA-Puffer und anschließendes „Vortexen“ lysiert und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

Zur Bestimmung von Proteinen wurden die restlichen Fraktionen bzw. das Pankreas-Homogenat zur Lyse der enthaltenen Zellorganellen mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 versetzt, gemischt und in zwei Aliquots bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

2.5.3 Isolation und *in-vitro*-Stimulation von pankreatischen Azini

Zur Präparation der Azini wurden zwei Pankreata von NMRI-Mäusen nach 16 h Fasten isoliert. Diese wurden von Fett, Lymphknoten und Bindegewebe befreit. Die Pankreata wurden in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gespült. Für einen effizienten „Verdau“ wurde ca. 0,5 ml Kollagenase-Lösung in den Pankreasgang jedes Organs instilliert. Die Pankreata wurden nachfolgend in einen 25- ml-Polycarbonat-Erlenmeyerkolben überführt und mit der restlichen Kollagenase-Lösung auf 5 ml aufgefüllt. Für einen optimalen Gasaustausch wurden die Zellen für 15 s mit Wasserdampf-gesättigtem Carbogen (5 Vol % CO₂/95 Vol % O₂) begast und der Erlenmeyerkolben verschlossen. Die erste Digestion erfolgte im Kreisschüttel-Wasserbad bei 37 °C für 10 min und bei 140 Oszillationen/min. Danach wurde die Kollagenase-Lösung dekantiert und 5 ml neue Kollagenase-Lösung hinzugegeben. Der Kolben wurde nochmals 15 s mit Carbogen begast. Die zweite Digestion erfolgte abermals im Kreisschüttel-Wasserbad unter analogen Bedingungen, jedoch für 40 min. Danach wurden 5 mg Trypsin-Inhibitor hinzugegeben. Die mechanische Zerkleinerung des Pankreasgewebes erfolgte durch fünf- bis zehnmaliges Auf- und Absaugen in eine Plastikpipette (Öffnungsdurchmesser: 2,4 mm bzw. 0,9 mm). Im Anschluss wurde die Suspension durch ein Nylonnetz (Porendurchmesser: 150 µm) filtriert und mit 10 ml Rinse-Lösung nachgespült. Die Azini-Suspension wurde auf vier Röhrchen mit je 5 ml Zentrifuge-Lösung geschichtet und 4 min bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets in je 5 ml Zentrifuge-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei Röhrchen aufgeteilt und

nochmal für 4 min bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets erneut in 5 ml Zentrifuge-Lösung resuspendiert. Die Zell-Suspension wurde in ein Röhrchen überführt und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum entfernt und das erhaltene Azini-Zellpellet in 12 ml HR-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde nun nochmal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet nachfolgend in 32 ml HR-Puffer resuspendiert und in einen 250- ml-Erlenmeyerkolben überführt. Die Suspension wurde 15 s mit Sauerstoff begast und für 30 min im Kreisschüttel-Wasserbad bei 37 °C und 80 rpm präinkubiert. Die Suspension wurde auf zwei Zentrifugen-Röhrchen verteilt und für 4 min bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit ca. 8-12 ml HR-Lösung resuspendiert, so dass eine Zelldichte von ca. 10^7 Zellen/ml erreicht wurde.

Zur Stimulation der Sekretion wurden die resuspendierten Azini in parallelen Ansätzen ohne bzw. mit Caerulein in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von $1,49 \times 10^{-12}$, $1,49 \times 10^{-11}$, $1,49 \times 10^{-10}$, $1,49 \times 10^{-9}$, $1,49 \times 10^{-8}$, $1,49 \times 10^{-7}$ nM inkubiert. Die Entnahme der Azini-Zellsuspension aus diesen Ansätzen erfolgte im Zeitverlauf nach 0 min, 15 min und 30 min.

Zur Bestimmung der Sekretion der Azini wurde die Azini-Suspension für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der ins Kulturmedium sekretierten α -Amylase abgenommen und anschließend schockgefroren. Das Azini-Zellpellet wurde in je 500 μ l frischem, eisgekühltem MOPS-Puffer resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf Tube mit zwei 3 mm Glaskugeln und ca. 100 mg 0,25-0,5 mm Glaskugeln vereinigt und durch Vortexen (ca. 30 s) mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 6.000 rpm für 5 min bei 4 °C entfernt und der Überstand als Azini-Proteinextrakt gewonnen, aliquotiert, schockgefroren, und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

Der Anteil der in den Kulturüberstand sezernierten Pankreasenzyme wurde prozentual ermittelt. Dazu wurde die α -Amylase-Aktivität im Überstand im Verhältnis zur gesamten Amylase-Aktivität (Summe der intra- und extrazellulären Amylase-Aktivität) in Abhängigkeit von der Caerulein-Konzentration und den aufgeführten Inkubationszeiten bestimmt. Die Enzym-Aktivität im Überstand ($A^{\text{Ü}}$) nimmt mit der Zeit zu, während die Enzym-Aktivität im Azini-Zellpellet (Niederschlag A^{N}) abnimmt.

Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\Delta\alpha - \text{Amylase [\%]} = \frac{A^{\ddot{U}}}{(A^{\ddot{U}} + A^N)} \times 100$$

$A^{\ddot{U}}$... Enzym-Aktivität im Überstand

A^N ... Enzym-Aktivität im Niederschlag (Azini-Zellpellet)

2.6 Assays

2.6.1 Glutaminylyklase-Aktivitätsmessung

Die Glutaminylyklase-Aktivitätsmessung basiert auf einem von der Firma Probiobdrug entwickelten Assay [147, 130, 148]. Dieses gekoppelte Assay ermöglicht eine kontinuierliche Messung der Gesamt-QC-Aktivität (QC1 und isoQC), indem im ersten Schritt die Zyklisierung des Glutaminrestes (Gln-AMC) durch QC zu Pyroglutamin-AMC (pGlu-AMC) erfolgt. Anschließend wird durch das bakterielle Hilfsenzym Pyroglutamylaminopeptidase (pGAP) das pGlu-AMC in Pyroglutaminsäure und AMC gespalten. Die kinetische Bestimmung des freigesetzten AMC erfolgt durch den Anstieg der Fluoreszenz (Ex/Em= 380/460nm).

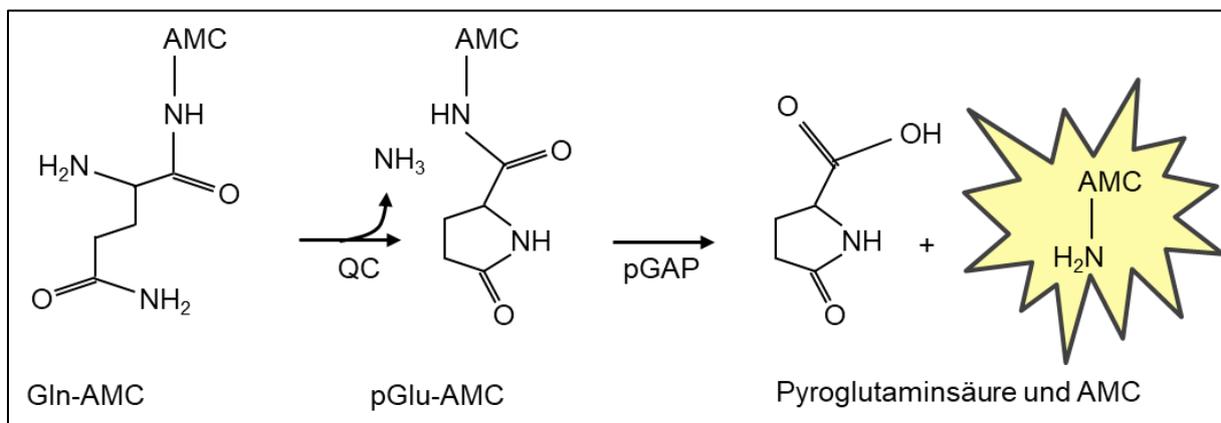


Abbildung 12: Darstellung des gekoppelten QC-Assays mit Gln-AMC als Substrat.

In der ersten Reaktion wird Gln-AMC durch QC in pGlu-AMC zyklisiert. Anschließend wird durch pGAP pGlu-AMC in Pyroglutaminsäure und AMC gespalten, wodurch die Fluoreszenz gemessen werden kann.

In parallelen Messansätzen mit bzw. ohne QC-Inhibitor PQ529 wurden je 80 μ l Reaktionslösung mit 20 μ l vorinkubiertem Probenansatz (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11 für ungehemmte und gehemmte Ansätze) in dem Well einer 96-Well-NUNC-Mikrotiterplatte vereinigt. Die Messung erfolgte als kinetische Bestimmung der Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität in RFU/sec. Verwendet wurde der Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Reader

„Spectrafluor Plus“ mit einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 360 nm/440 nm. Es erfolgten 18 Mess-Zyklen mit einer Mess-Zeit von 50 s/Zyklus bei 30°C.

Tabelle 10: Reaktions- und Probenlösung für QC-Aktivitätsmessung

	Reaktionslösung		Probenlösung	
	ungehemmt [µl]	gehemmt [µl]	ungehemmt [µl]	gehemmt [µl]
Substratlösung	10	10	-	-
Reaktionspuffer-QC	60	59,2	18	17,82
pGAP	10	10	-	-
Inhibitor PQ529	-	0,8	-	0,18

Die Reaktionslösung wurde zur Rekonstitution der Pyroglutamyl-Amino-peptidase (pGAP) 10 min bei RT inkubiert.

Tabelle 11: Probenansätze zur Bestimmung der QC-Aktivität

	subzelluläre Fraktion	Pankreas-Homogenat	Positiv-kontrolle
Probenvolumen [µl]	4	2	3
Probenlösung (je ungehemmt bzw. gehemmt) [µl]	16	18	17

Die gehemmten bzw. ungehemmten Probenansätze wurden zur Gleichbehandlung bzw. spezifischen Hemmung der endogenen QC-Aktivität mit dem Inhibitor PQ529 für 5 min auf Eis inkubiert.

Die QC-Aktivität in mU/mg Protein wurden nach folgender Formel berechnet.

$$QC - Aktivität \left[\frac{mU}{mg \text{ Protein}} \right] = \frac{(RFU_{Protein} - RFU_{blank}) \times 1000}{RFU_{1 \mu M \text{ AMC}} \times V_p * c_{Protein}}$$

RFU_{Protein}...QC-Messwert der Probe/ linearer Anstieg der Fluoreszenz je Minute

RFU_{blank}...Leerwert ohne Probenzusatz/ linearer Anstieg der Fluoreszenz je Minute

V_p...eingesetztes Probenvolumen in ml

RFU_{1 µM AMC}...Reader-Fluoreszenzwert (Referenzwert) bei einer Konzentration von 1 µM AMC im Messansatz

c_{Protein}... Proteinkonzentration der Probe in mg/ml

2.6.2 Trypsin- und Chymotrypsin-Bestimmung

Zur Bestimmung der spezifischen Trypsin-Aktivität wurden Messungen mit und ohne SBTI (Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor) durchgeführt.

Zur Messungen ohne SBTI wurde das Peptid-Substrat Boc-Gln-Ala-Arg-AMC in einer Endkonzentration von 30 μM in die Trypsin-Messlösung gegeben. Zur Trypsin-Hemmung wurde zusätzlich SBTI in einer Endkonzentration von 20 μM im Messansatz eingesetzt. Die Proben und die Messlösungen wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die proteolytischen Aktivitäten wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmessung am Mikrotiterplatten-Reader Safire mit einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 360 nm und 440 nm bestimmt. Die kinetische Zunahme der Fluoreszenz wurde in 15 Zyklen (Messzeit: 50 s/Zyklus) bei 30 °C gemessen und als „Reader Fluorescence Unit/Sekunde“ (RFU/s) berechnet. Das Mitführen einer Standardkurve an freiem AMC und bovinem Trypsin diente zur Berechnung der enzymatischen Aktivität in fmol/mg Protein.

Chymotrypsin wurde analog bestimmt. Es wurde als Substrat Suc-AAPF-AMC (in einer Endkonzentration von 32 μM) eingesetzt und die freie Aktivität ohne Zugabe eines Inhibitors ermittelt.

2.6.3 Cathepsin-B-Bestimmung

Als Substrat wurde Z-Arg-Arg-4-Methylcumarin-7-amide (20 μM) verwendet. Die Messung wurde in einem 100 mM Na-Acetat-Puffer (pH 5,5), welcher 5 mM CaCl_2 und 10 mM Dithiothreitol enthält, durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C präinkubiert und nach Zugabe des Substrates weitere 10 min inkubiert. Die Freisetzung des 7-amino-4-Methylcumarins wurde spektrofluorometrisch am Safire gemessen. Das Mitführen einer Standardkurve diente zur Berechnung der enzymatischen Aktivität.

2.6.4 Protein-Bestimmung

Die Ermittlung der Protein-Konzentration erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bradford. In eine Mikrotiterplatte (farblos) wurden in Duplikaten je 6 μl /Well Puffer als Blank bzw. Probenansatz in einer Verdünnung 1:2 bis 1:40(v/v) sowie eine BSA-Standardreihe (bovines Serumalbumin in aufsteigender Konzentration) pipettiert und mit je 295 μl /Well 1x Advanced Protein Assay Reagent versetzt und gemischt. Anschließend wurden die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 595 nm am Spectrafluor plus gemessen und mit Hilfe der mitgeführten Protein-Standardreihe berechnet.

2.6.5 Myeloperoxidase-Bestimmung

Die Messung der Myeloperoxidase (MPO) erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Kits von Hycult Biotech. Die Durchführung erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers. Zur Bestimmung wurden die entsprechend Punkt 2.5.1 hergestellten Pankreas-Homogenate zuvor mit Diluent-

Puffer 1:10 verdünnt und zu je 100 µl/Well in Duplikaten pipettiert. Die MPO-Konzentration in den Wells wurde abschließend durch Absorptionsmessung bei 450 nm am Safire-Reader mit Hilfe einer mitgeführten MPO-Standardkurve berechnet.

2.6.6 Bestimmungen der Amylase und Lipase

Die Messung der Amylase- und Lipase-Aktivität im Serum, Azini- und Pankreas-Homogenat erfolgte durch das Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Direktor: Prof. Dr. med. Berend Isermann). Die Bestimmung wurde mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Kits 'α-Amylase EPS ver.2' bzw. 'Lipase colorimetric assay' (Roche, Mannheim, Deutschland) unter Nutzung des Analysegerätes „Roche/Hitachi cobas c 501“ durchgeführt.

2.6.7 Analyse von Zytokinen

Es wurden folgende Zytokine mittels Zytokin-Arrays analysiert: MCP-1, IL-6 und TNF-α. Die Zytokin-Arrays wurden von der Firma Probiobdrug AG (Halle/Saale, Deutschland) durchgeführt.

Für die Analyse der Zytokine IL-6, TNF-α und MCP-1 wurde ein Bead Immunoassay, basierend auf der Luminex Technologie (Milliplex xMAP Kit, Maus-3Plex [Millipore, Darmstadt, Deutschland]), mit den entsprechenden Analyten verwendet. Die Maus-Seren wurden 1:5 mit Assay-Puffer verdünnt. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Instruktion des Herstellers. Jede Probe wurde in einer Doppelbestimmung gemessen (>100 Beads/Analyt). Der Messung wurde mit einem BioPLex 200 Gerät (Biorad, Bioplex Manager Software V4.1.1) im „high sensitivity“ Modus durchgeführt. Der Messbereich lag zwischen 12 und 12.500 pg/ml.

2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gel-Elektrophorese erfolgte nach dem Prinzip von Schägger [146] im Mini Hoefer Gelsystem (vertikale Gel-Elektrophorese). Hierbei wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt [149]. Die einzelnen Gele hatten eine Abmessung von 10x12x0,1 cm.

Als Erstes wurden das Trenn- und das Sammelgel nach Tabelle 12 hergestellt. Danach wurde das Trenngel in die Gießkammer gegeben und anschließend das Sammelgel auf das Trenngel überschichtet. Danach wurde der Proben-Kamm eingefügt. Nach Polymerisation der Gele wurde die Gießkammer in die Trennkammer eingesetzt und das Gel mit Kathodenpuffer überschichtet. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurde der Kamm entfernt und die einzelnen Taschen gespült.

Tabelle 12: Zusammensetzung für ein diskontinuierliches SDS-PAA-Gel

	Trenngel 10 % (w/v) AB-Mix	Sammelgel 4 % (w/v) AB-Mix
Aqua dest.	4,4 ml	2,2 ml
AB-Mix	2,5 ml	0,3 ml
Gelpuffer	4,2 ml	1,25 ml
Glycerin	1,4 ml	-
APS 10 %	35 µl	25 µl
TEMED	6,75 µl	12,5 µl

Tabelle 13: Probenvorbereitung für Gel-Elektrophorese

	subzelluläre Fraktion	Pankreas-Homogenat
Aqua dest.	4 µl	8 µl
4xLaemmli	4 µl	4 µl
Probe	8 µl	4 µl

Die vorbereiteten Proben (16 µl), siehe Tabelle 13, wurden durch Inkubation im Wasserbad bei 95°C für 5 min denaturiert. Nach der Denaturierung der Proteine wurden die Proben und der Marker (8 µl) in die Probentaschen aufgetragen. Die Trennkammer wurde vollständig mit Kathodenpuffer und die Elektrophorese-Kammer mit Anodenpuffer gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 6 mA je Gel unter Begrenzung der Spannung auf max. 200 V über Nacht (ca. 16 h) im Kühlschrank durchgeführt. Nach dem Lauf erfolgte das Blotting der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot).

2.8 Western-Blot-Transfer und Immunnachweis von Proteinen

Nachdem die Auftrennung der Proteine durch SDS-Page erfolgte, wurden die Proteine zum spezifischen Nachweis mit Antikörpern durch Western-Blot [150] auf eine PVDF-Membran transferiert. Dafür wurde die PVDF-Transfermembran durch Inkubation in Methanol für 1 min hydrophilisiert und nachfolgend in Aqua dest. bzw. Towbin-Puffer 5 min inkubiert. Die Schwämme und die Filterpapiere (Filter) wurden in Towbin-Puffer getränkt. Die Anodenplatte wurde in folgender Reihenfolge gepackt: Schwamm, Filter, vorbehandelte PVDF-Membran, SDS-Gel, zweiter Filter und zweiter Schwamm. Das Packen der Filter, der Membran und des Gels erfolgte luftblasenfrei. Danach wurde die Apparatur mit der Kathodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte durch Elektrophorese bei einem konstanten Strom von 300 mA (mit einer Begrenzung auf 40 V bzw. 12 W) bei 4°C für 90 min.

Nach dem Proteintransfer wurde der Marker abgeschnitten und in PVDF-Färbelösung für ca. 5 min gefärbt. Die restliche Membran wurde in 1xTBST für 15 min gewaschen. Der Marker

wurde mit Entfärbe-Lösung entfärbt, bis die Banden sichtbar wurden. Die Membran wurde in 2 %-igen Advanced Blocking-Reagent für 60 min im Inkubationsschüttler (Enviro-Genie) blockiert. Für die Detektion der Proteine wurde die Membran anschließend mit dem primären Antikörper (1:10.000) verdünnt und über Nacht für ca. 16 h im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde die Membran für 15 min in 1xTBST und anschließend dreimal 5 min in 1xTBST gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem verdünnten sekundären Antikörper (1:125.000) erfolgte in 2 %-igem Advanced blocking reagent für 1 h. Nach einem weiteren Waschschrift (15 min und dreimal 5 min in 1xTBST) wurde die Lumineszenz-Lösung, zu gleichen Teilen Lösung A und Lösung B gemischt, auf der Membranoberfläche unter Nutzung einer Abdeckfolie verteilt und für 5 min bei RT inkubiert. Der „Enhanced-Chemoluminescence“ (ECL)-Nachweis der Proteine nach Immunreaktion erfolgte durch Filmbelichtung bzw. Entwicklung im Dunkelraum unter Rotlicht.

2.9 Histologie des Pankreasgewebes

Die in 4 %-igem phosphatgepufferten Formaldehyd fixierten Pankreasgewebestücke wurden zur Entfernung von Formalin mindestens für 24 h in 70 % Ethanol gelegt und über eine aufsteigende Ethanol-Reihe entwässert. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffinblöcke eingebettet. Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurden die Paraffinblöcke am Mikrotoms in einer Schichtdicke von ca. 5 µm geschnitten und mit Hilfe eines Pinsels auf einem Glasobjektträger fixiert. Durch die Verwendung von Xylol wurde das Paraffin aus den Schnitten entfernt. Anschließend wurde das Gewebe mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Die aufgeführte histologische Aufbereitung und Färbung der Präparate wurde mit Hilfe etablierter Standardmethoden am Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Direktor: Prof. Dr. med. Albert Roessner/Johannes Haybäck) durchgeführt.

Die histologische Beurteilung erfolgte nach einem modifizierten Spormann-Score. Dementsprechend wurden die Präparate auf folgende Merkmale überprüft: entzündliche Infiltration, Parenchymnekrosen und Ödeme [151]. In Tabelle 14 sind die einzelnen Bewertungskriterien dargestellt. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte am Axiovert S100 (25-fache Vergrößerung).

Tabelle 14: Quantifizierung histologischer Veränderungen im Pankreas [151]

Veränderung	Ausmaß					
		1		2		3
Ödeme	mild	1	moderat	2	schwer	3
entzündliche Infiltration	mild	1	moderat	2	schwer	3
Parenchymnekrosen	focal (5 %)	3	fokal und/oder sublobulär	5	fokal und/oder lobulär (>20 %)	7

2.10 Auswertung der Daten

Die gezeigten Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Auswertungen erfolgte initial über eine one-way ANOVA, gefolgt von einem Student's *t*-Test post hoc, dessen Ergebnisse sowohl in den Abbildungen und Text dargestellt wurden. Statistisch signifikant sind die Werte mit einem Signifikanzwert $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***). Die histologischen nicht-parametrischen Daten (Scores) wurden aufgrund der besseren Darstellungsweise parametrisch mit Mittelwert-Betrachtung illustriert. Alle Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel ermittelt und dargestellt. Die Statistische Auswertung erfolgte mit Minitab.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis und subzelluläre Lokalisation der Glutaminylzyklase Isoformen im Pankreas der Maus

Es lagen bisher keine Daten vor, die zeigen, dass die Glutaminylzyklase-Isoformen (QC-Isoformen) als aktives Enzym im gesunden Pankreas exprimiert werden. Am Anfang der Untersuchungen wurde daher überprüft, ob eine enzymatische Aktivität von QC1 und IsoQC im Pankreas der Maus nachweisbar ist, die zudem eine subzelluläre Lokalisation dieser Isoenzyme ermöglicht. Diese Erkenntnis ist erforderlich, um die spezifische Wirkung des Hemmstoffes auf die QC-Aktivität und deren Auswirkungen auf die Pathogenese und den Schweregrad einer AP zu beurteilen.

Eine spezifische Zuordnung der QC war möglich, da sowohl QC1- als auch IsoQC-knock-out-Mäuse für die Untersuchungen zur Verfügung standen. Für diese Untersuchungen wurden unstimulierte QC1- bzw. IsoQC-k.o.-Mäuse einschließlich der zugeordneten WT-Kontrollmäuse zur subzellulären Lokalisation der QC-Isoformen eingesetzt. Dazu wurde das aufgearbeitete Pankreasgewebe (siehe Abschnitt 2.5.2) über einen 50 %-igen Percoll-Gradienten aufgetragen und aufgetrennt. In den Fraktionen wurde die QC-Aktivität (siehe Abschnitt 2.6.1) mittels eines gekoppelten Assays mit Pyroglutamyl-Amino-peptidase und des Substrates Q-AMC gemessen. Die Western-Blots (siehe Abschnitt 2.7 und 2.8) zur Detektion von QC1 und IsoQC wurden mit spezifischen Antikörpern in den Percoll-Gradient-Fraktionen von IsoQC-, QC1-k.o.- und den entsprechenden Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

In Abbildung 13 bzw. 13 sind die Ergebnisse der QC1-Mäuse bzw. der IsoQC-Mäuse dargestellt.

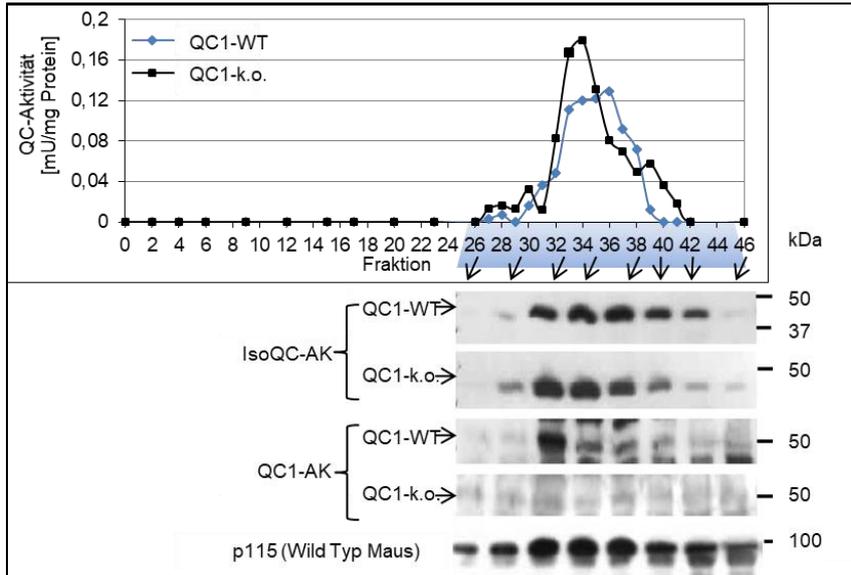


Abbildung 13: Verteilung der QC-Aktivität und der Proteine QC1 und IsoQC in den Fraktionen nach subzellulärer Fraktionierung des Pankreas von QPCT-(„QC1“)-k.o. vs. WT-Kontrollmäusen.

Die QC-Aktivität (oben) und der Immunnachweis von QC1 und IsoQC nach Western-Blot-Transfer (unten) wurde in den Fraktionen nach Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation bestimmt. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit Hilfe spezifischer IsoQC- und QC1-Antikörper. Zusätzlich wurde der Golgi-Marker p115 mit anti-p115-AK im Pankreas von WT-Kontrollmäusen detektiert.

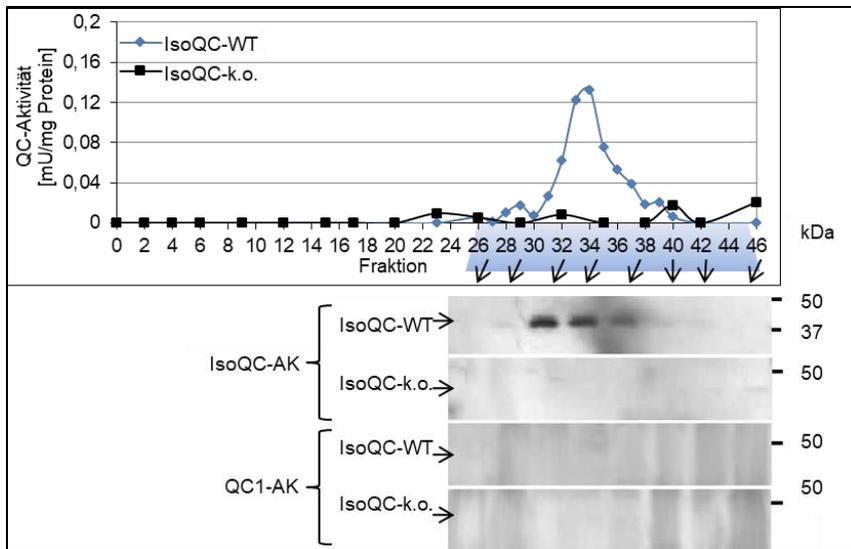


Abbildung 14: Verteilung der QC-Aktivität und der Proteine QC1 und IsoQC in den Fraktionen nach subzellulärer Fraktionierung des Pankreas von QPCTL-(„IsoQC“)-k.o. vs. WT-Kontrollmäusen.

Die Bestimmung der QC-Aktivität (oben) und Immunnachweis von QC1 und IsoQC (unten) erfolgte in den isolierten Fraktionen nach Auftrennung der subzellulären Kompartimente des Pankreas mit Hilfe der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation. Als Primär-Antikörper wurden spezifische IsoQC- und QC1-Antikörper verwendet.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die QC-Aktivität in den Vesikeln mit geringer Dichte nachweisbar ist. Zusätzlich wurde der Golgi-Marker p115 immunlokalisiert, der ebenfalls in diesen Fraktionen vorkommt. Aufgrund der sehr ähnlichen Verteilung ist davon auszugehen, dass eine Lokalisation von QC1/IsoQC im Golgi-Apparat der Pankreaszellen vorliegt. Der Vergleich von QC1-k.o.- zu -WT-Mäusen in Abbildung 13 zeigt, dass die Deletion von QC1 zu keiner Reduktion der Aktivität im Pankreas führt. IsoQC-Proteine lassen sich in k.o.- und WT-Mäusen mittels Western-Blot in gleicher Menge nachweisen; und der Nachweis der Banden in den Fraktionen entspricht der Aktivitätsverteilung. Das QC1-Protein war im Vergleich zu IsoQC praktisch nicht nachweisbar. Die schwache Bande für QC1 resultierte aus einer verlängerten Belichtungsdauer bei der Entwicklung des Western-Blots. Der Vergleich von IsoQC-k.o.- und -WT-Mäusen in Abbildung 14 zeigt erwartungsgemäß, dass kein IsoQC-Protein und keine QC-Aktivität im unbehandelten Pankreas von IsoQC-k.o.-Mäusen nachweisbar ist.

Das Fazit aus diesen Untersuchungen ist, dass im Pankreasgewebe die IsoQC deutlich exprimiert ist, wohingegen die QC1 unter Kontrollbedingungen und bei einer leichten Form der Pankreatitis praktisch nicht nachweisbar ist und somit auch nicht zur Aktivität beiträgt.

Um zu untersuchen, ob sich die Verteilung der Lokalisation im Golgi ändert, wenn eine Pankreatitis induziert wurde, erfolgte im nächsten Schritt die supramaximale Stimulation der Mäuse mit Caerulein. Ein Vergleich der erhaltenen QC-Aktivitäten im Pankreas nach Induktion einer Caerulein-Hyperstimulation ist in folgender Abbildung zu sehen. Es ist zu erkennen, dass der sehr distinkte Aktivitätspeak in nicht-stimulierten Mäusen (0 h) nach Caerulein-Stimulation (3 h, 8 h und 24 h) sich deutlich verbreitert, ohne dass sich die Gesamtaktivität wesentlich verändert. Diese Beobachtung ist am ehesten mit einer zunehmenden Inhomogenität des Golgi-Apparates zu erklären; ein Phänomen, welches für die Caerulein-Pankreatitis schon beschrieben wurde [152].

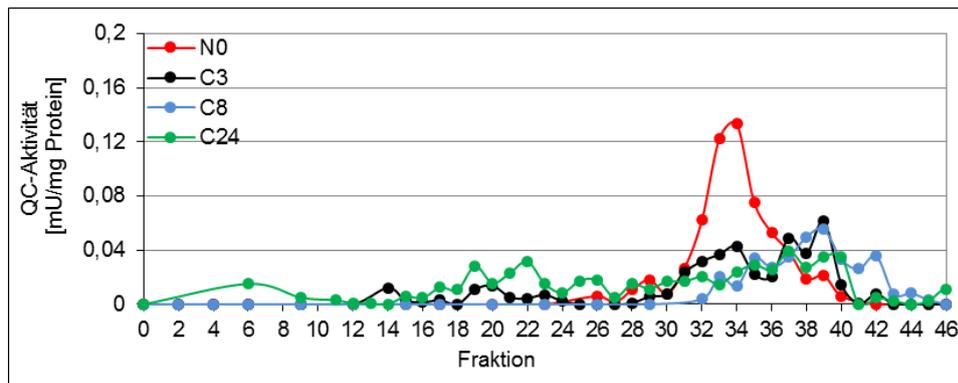


Abbildung 15: QC-Aktivität im Percoll-Dichtegradienten nach Caerulein-Stimulation

QC-Aktivität in Percoll-Dichtegradienten-Fractionen der Pankreata von IsoQC-WT-Mäusen nach Caerulein-Stimulation (N - Kontrolle, C - Caerulein-Stimulation nach 3 h, 8 h und 24 h).

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass im exokrinen Pankreasgewebe eine Golgi-assoziierte QC-Aktivität vorhanden ist, die in der milden Caerulein-Pankreatitis und unter stimulierten Bedingungen vollständig durch die IsoQC repräsentiert wurde.

3.2 Nachweis der Wirkungsspezifität von PQ529 als QC-Inhibitor

3.2.1 Stimulus-Sekretions-Kopplung an isolierten Azinuszellen

Die Strategie des Einsatzes des QC-Inhibitors zielt auf eine mögliche Reduzierung der Entzündungsreaktion bei AP ab, was zu einer Verringerung der Pankreas-Schädigung führen würde. Das Modell der hormonellen Hyperstimulation beruht auf einer gestörten Stimulus-Sekretions-Kopplung in den Azinuszellen, und zwar als Sekretionshemmung im Bereich unphysiologisch hoher Caerulein-Konzentrationen (10^{-9} mol/l und höher). Daher war zu testen, ob der QC-Hemmstoff eine direkte Wirkung auf Azinuszellen und damit der Stimulus-Sekretions-Kopplung erzielt. Dazu wurde die α -Amylase-Sekretion aus den isolierten Azinuszellen in Abhängigkeit der Caerulein-Konzentration (Konzentrationsbereich: 10^{-12} bis 10^{-7} mol/l) bestimmt.

In je drei Experimenten wurde mit und ohne PQ529 (Abbildung 16) getestet, ob der Inhibitor einen Effekt auf die Amylase-Sekretion der Zellen hatte.

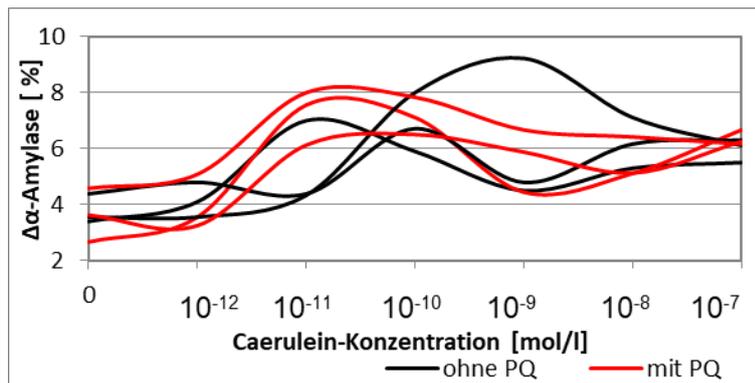


Abbildung 16: Stimulus-Sekretions-Kopplung an isolierten Azinuszellen
 α -Amylase-Sekretion ins Medium innerhalb von 30 min.

Abbildung 16 zeigt die α -Amylase-Sekretion innerhalb von 30 min. Beim Vergleich mit und ohne Hemmstoff-Gabe von PQ529 sind keine Unterschiede in den prinzipiellen Charakteristika der Kurven – Stimulation der Sekretion bei niedrigen Caerulein-Konzentrationen (im Bereich um 10^{-11} mol/l) und Sekretionshemmung bei hohen Konzentrationen (ab 10^{-9} mol/l) – zu erkennen. Der Hemmstoff hatte demzufolge keine Auswirkungen auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung. Daher ist davon auszugehen, dass mögliche Effekte der Abschwächung einer experimentellen Pankreatitis durch die QC-Hemmung nicht auf einer direkten Wirkung auf die Pankreatitis-Induktion beruhen.

Die Caerulein-Hyperstimulation der Mäuse in dieser Arbeit erfolgte mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}$ Caerulein/kg Körpergewicht in einer stündlichen intraperitonealen Gabe.

3.2.2 Wirkung auf pankreatische Enzyme der Aktivierungskaskade

Ein Charakteristikum der AP stellt die Aktivierung proteolytischer Zymogene dar, die zur Zellschädigung beiträgt. Um auszuschließen, dass der Inhibitor PQ529 direkt auf die beteiligten Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin oder die Cystein-Proteinase Cathepsin B (CTSB) wirkt, wurde im folgenden Experiment das Wirkspektrum des Inhibitors PQ529 getestet. Hierzu wurden die Trypsin-, Chymotrypsin-, CTSB- und die QC-Aktivitäten isolierter Enzyme in Gegenwart des Hemmstoffes getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

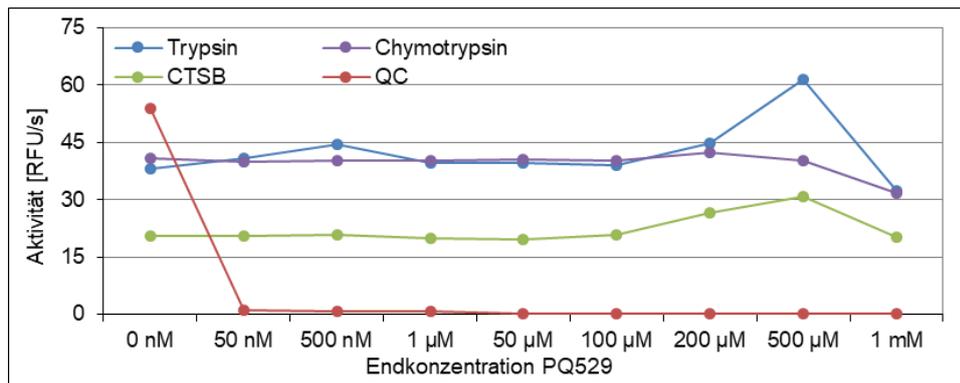


Abbildung 17: Einfluss von PQ529 auf pankreatische Enzyme der Aktivierungskaskade
Einfluss des Inhibitors PQ529 auf Trypsin, Chymotrypsin, Cathepsin B und Glutaminylylzyklase.

Das Experiment hat gezeigt, dass der Inhibitor PQ529 bereits bei einer Konzentration von 50 nM die QC-Aktivität deutlich hemmt. Auf die Trypsin-, Chymotrypsin- und CTSB-Aktivität hatte das PQ in den gezeigten Konzentrationen keinen Einfluss. In den *in-vivo*-Untersuchungen wurde eine Konzentration von 100 mg PQ529/kg KG verwendet, dies entspricht einer Stoffmengen-Konzentration von 38,5 mM.

3.3 Wirkung von PQ529 auf Parameter der akuten Pankreatitis

Um eine schwere Pankreatitis zu erzeugen, wurde das Modell der Taurocholat-induzierten Pankreatitis gewählt, welches eine nekrotisierende Pankreatitis auslöst.

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass innerhalb von 24 h nach Taurocholat-Injektion eine Induktion von Zytokinen und Chemokinen wie MCP-1, Interleukin (IL)-6, TNF- α , IL-1 β und weiterer erfolgt. Die Pankreas-Schädigung ist dann deutlich ausgeprägt. Deshalb wurde der Zeitpunkt 24 h nach Taurocholat-Induktion als geeigneter Untersuchungszeitpunkt festgelegt.

3.3.1 Prophylaktische Gabe des QC-Hemmstoffes bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis

Die Untersuchungen der QC-Inhibitor-Wirkung wurden zunächst als prophylaktische Gabe des Hemmstoffes durchgeführt. Die orale Applikation erfolgte 1 h vor der Pankreatitis-Induktion und eine zweite Gabe 5 h nach Pankreatitis-Induktion zur Aufrechterhaltung des PQ529-Spiegels. Es sollte die Arbeitshypothese untersucht werden, ob eine QC-Hemmung zu einer verminderten inflammatorischen Reaktion führt und im Kontext einen Einfluss auf die Pankreas-Schädigung zeigt.

Um die Schädigung des Pankreas zu bestimmen, wurde der Austritt von α -Amylase und Lipase in das Serum gemessen, siehe Abbildung 18. Die Versuchsgruppen sind in Tabelle 9 dargestellt.

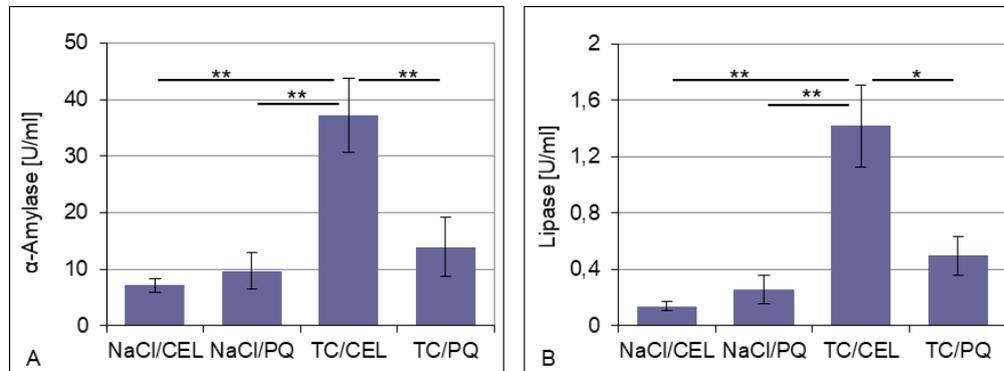


Abbildung 18: Serum-Lipase und -Amylase bei prophylaktischer Applikation von PQ529

Effekt einer prophylaktischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Serum-Aktivitäten von A) α -Amylase und B) Lipase bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis (TC- und NaCl-Kontroll-Gruppen $n = 6-9$, Mittelwert \pm SEM).

Abbildung 18 zeigt, dass die Applikation des QC-Inhibitors PQ529 die Spiegel von α -Amylase und Lipase signifikant reduzierte. Unter Berücksichtigung der Kontrollen war eine Verringerung um ca. 80 % durch den Hemmstoff zu erkennen.

Zur Charakterisierung der inflammatorischen Reaktion wurden das Chemokin MCP-1, welches als Target für den QC-Inhibitor anzusehen ist, und das über dieses Chemokin induzierte Zytokin IL-6 bestimmt, siehe Abbildung 19.

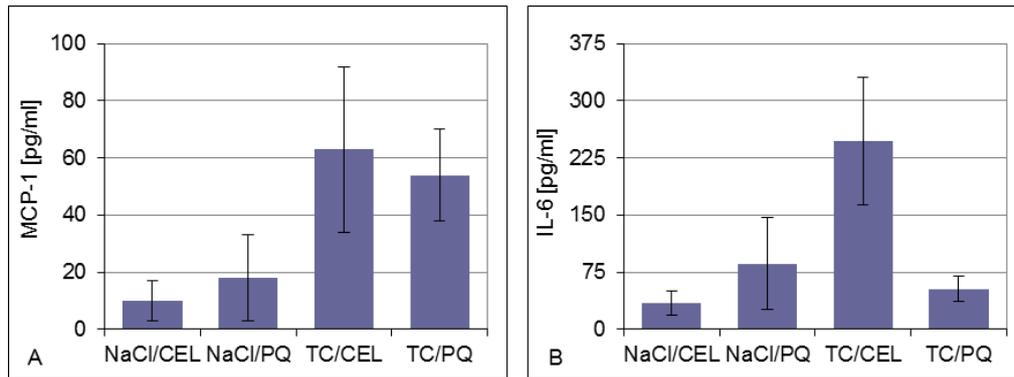


Abbildung 19: Serum-MCP-1 und -IL-6 bei prophylaktischer Applikation von PQ529
Effekt einer prophylaktischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf das Serum-Level von A) MCP-1 und B) IL-6 bei Taurochololat-induzierter Pankreatitis (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 18).

Der Spiegel von IL-6 im Serum war nach QC-Inhibitor-Behandlung deutlich reduziert, ohne jedoch ein statistisches Signifikanzniveau zu erreichen. Die Wirkung auf den MCP-1-Spiegel war weniger deutlich ausgeprägt.

Die Azinuszellen und die gewebeständigen Entzündungszellen tragen auch zu einer lokalen Erhöhung der ins Pankreasgewebe freigesetzten Chemokine und Zytokine bei. Aus diesem Grund wurde zudem die mittlere Konzentration von MCP-1 und IL-6 im Pankreas-Homogenat bestimmt. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse zu sehen.

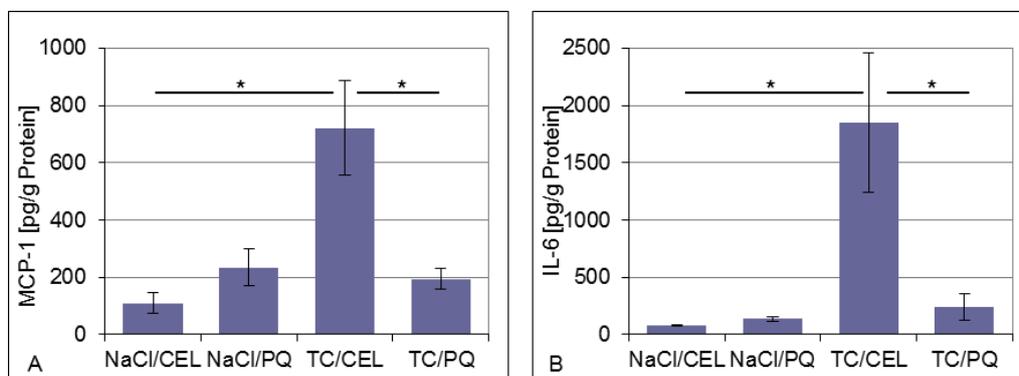


Abbildung 20: Pankreas-MCP-1- und -IL-6 bei prophylaktischer Applikation von PQ529
Effekt einer prophylaktischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die intrapancreatische Konzentration von A) MCP-1 und B) IL-6 bei Taurochololat-induzierter Pankreatitis (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 18).

Der Einfluss von PQ529 auf die Chemokin-/Zytokin-Konzentration im Pankreasgewebe war deutlich ausgeprägt. Es wurde eine signifikante Absenkung der Konzentration von IL-6 und MCP-1 erreicht, die in dem Niveau mit den NaCl-Kontrolltieren vergleichbar war.

3.3.2 Therapeutische Gabe des Hemmstoffes nach Taurocholat-induzierter Pankreatitis

Die im Punkt 3.3.1 gezeigten Ergebnisse belegen die prinzipielle Wirksamkeit einer QC-Hemmung für die Linderung der Auswirkungen einer experimentellen schweren AP. Um der klinischen Situation besser Rechnung zu tragen, sollte ein Wirkstoff auch bei therapeutischer Gabe einen solchen Effekt zeigen. Es wurden daher Untersuchungen begonnen, bei denen die erste QC-Inhibitor-Gabe mindestens 1 h nach Induktion der TC-Pankreatitis erfolgte. Das Ziel war es, ein therapeutisch günstiges Zeitfenster nach Beginn der Pankreatitis-Symptomatik zu bestimmen, um die AP erfolgreich zu behandeln.

3.3.2.1 Inhibitor-Gabe 1 h und 5 h nach Induktion einer Taurocholat-induzierten Pankreatitis

In diesem Modell erhielten die Mäuse den Inhibitor bzw. die Vehikel-Lösung, Hydroxyethyl-Cellulose, 1 h und 5 h nach Induktion einer Taurocholat-Pankreatitis. Zum Vergleich wurden NaCl-Kontroll-Mäuse mitgeführt. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse dargestellt.

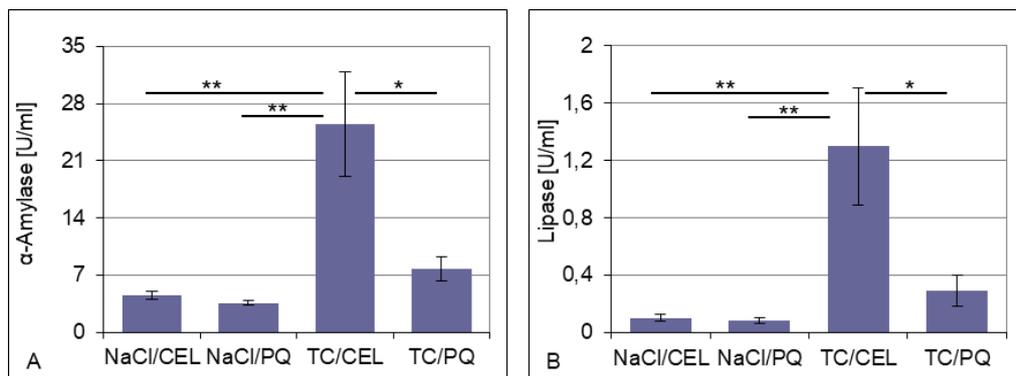


Abbildung 21: Serum-Amylase und -Lipase bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529

Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Serum-Aktivitäten von A) α -Amylase und B) Lipase bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 1 h und 5 h (TC-Gruppen: $n=18-21$, Kontroll-Gruppen: $n=6$, Mittelwert \pm SEM).

Die Auswertung der α -Amylase- und Lipase-Werte zeigte, dass durch die Inhibitor-Gabe deren Spiegel signifikant um mind. 70 % sanken. Da das Ausmaß der Reduktion der Pankreasenzyme im Serum mindestens so groß wie bei prophylaktischer Applikation war, kann geschlussfolgert werden, dass auch eine therapeutische Intervention mit PQ529 nach Ausbruch einer schweren AP ebenso wirksam ist. Die Auswirkungen auf MCP-1 und IL-6 sind in folgender Abbildung dargestellt.

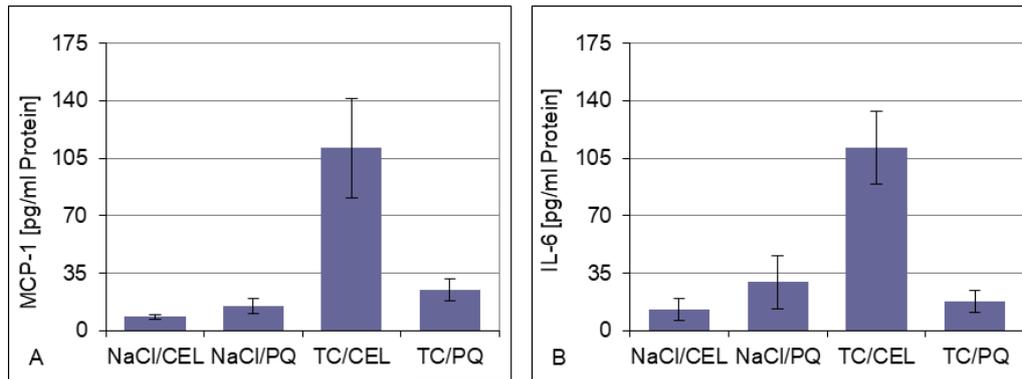


Abbildung 22: Serum-MCP-1 und -IL-6 bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529. Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Serum-Level von A) MCP-1 und B) IL-6 bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 1 h und 5 h (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 21).

Abbildung 22A und B zeigen, dass der Inhibitor in der Lage war, die MCP-1- und IL-6-Spiegel auf Kontroll-Niveau, um ca. 80 %, abzusenken.

In diesem Versuch wurde zusätzlich für die weitere Charakterisierung der inflammatorischen Reaktion der Mediator TNF- α im Serum bestimmt, siehe Abbildung 23. Dieser sollte Aufschluss über die Entzündungsreaktion geben. Zu erkennen ist, dass durch die Gabe des Inhibitors der TNF- α -Spiegel signifikant gesenkt wurde.

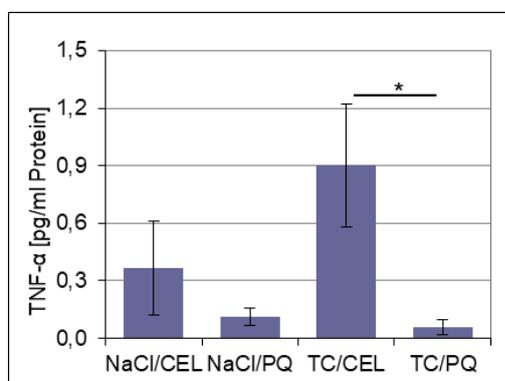


Abbildung 23: Serum-TNF- α bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529. Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Serum-Level von TNF- α bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 1 h und 5 h (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 21).

Welchen Einfluss der Inhibitor auf MCP-1, IL-6 und TNF- α im Pankreas hat, sind in Abbildung 24 und Abbildung 25 zu sehen.

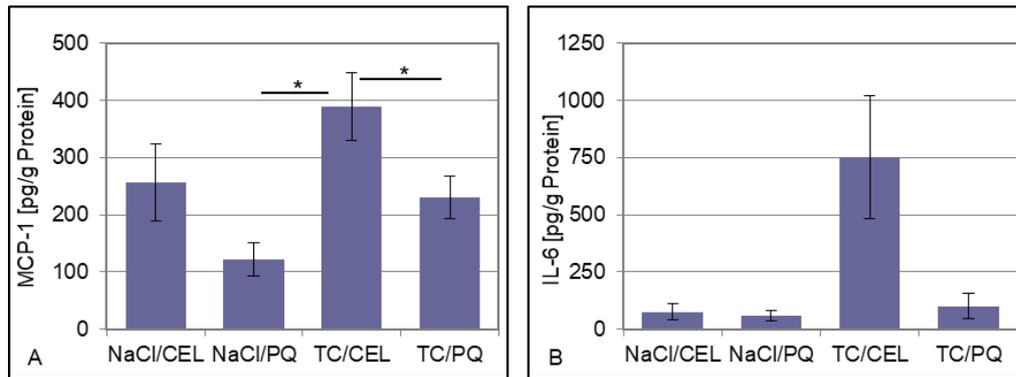


Abbildung 24: Pankreas-MCP-1 und -IL-6 bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529

Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Pankreas-Level von A) MCP-1 und B) IL-6 bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 1 h und 5 h (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 21).

In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass sich durch die Wirkung des Inhibitors PQ529 die intrapankreatische Konzentration an den Entzündungsmediatoren MCP-1- und IL-6 zum Teil signifikant verringerten und die Werte das Niveau der Kontroll-Tiere erreichten.

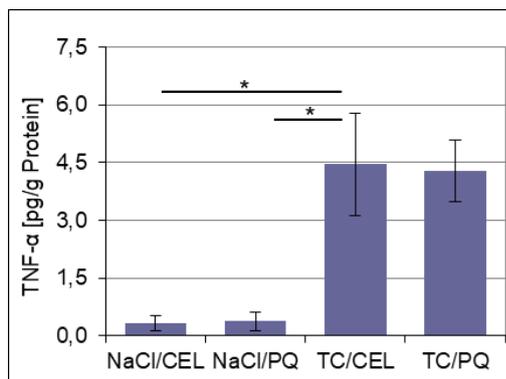


Abbildung 25: Pankreas-TNF-α bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529

Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Pankreas-Level von TNF-α bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 1 h und 5 h (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 21).

Der Inhibitor hatte auf das TNF-α im Pankreasgewebe keinen Einfluss.

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Marker-Enzym der neutrophilen Granulozyten. Er wurde als biochemischer und quantitativer Marker zur Bestimmung der Infiltration an Neutrophilen als Entzündungszellen im Pankreas eingesetzt, Abbildung 26.

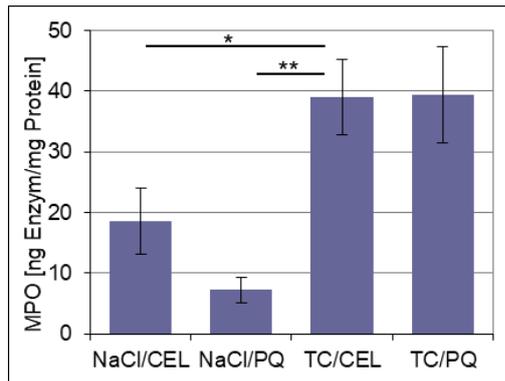


Abbildung 26: Pankreas-MPO bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529
 Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Pankreas-Level von MPO bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 1 h und 5 h (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 21).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die TC-induzierte Pankreatitis zu einer Erhöhung des MPO-Wertes im Pankreas führte. Eine therapeutische Behandlung mit PQ529 zeigte jedoch keine Wirkung für eine Reduktion dieser erhöhten MPO-Aktivität im Pankreas. Ein Grund dafür könnte darin bestehen, dass bei einer hauptsächlich auf das MCP-1 gerichteten Wirkung einer QC-Hemmung vor allem die Makrophagen-/Monozyten-Einwanderung ins Pankreasgewebe beeinflusst ist. Andererseits spricht dieser Befund dafür, dass der QC-Inhibitor PQ529 keinen Einfluss auf die Rekrutierung oder Verringerung der Aktivität von Neutrophilen im Pankreas im Verlauf einer schweren AP ausübt.

Histologisch wurde die Schädigung des Pankreas nach dem Spormann-Score bestimmt. Hierbei wurde das Augenmerk auf die mikroskopisch zu beobachtenden Parenchymnekrosen, Entzündungszellen und Ödeme gelegt, weshalb der maximal erreichbare Wert des Spormann-Scores bei 13 liegt [151]. In Abbildung 27 sind beispielhaft gesundes und geschädigtes Gewebe mit Parenchymnekrosen, Entzündungszellen und Ödemen zu erkennen.

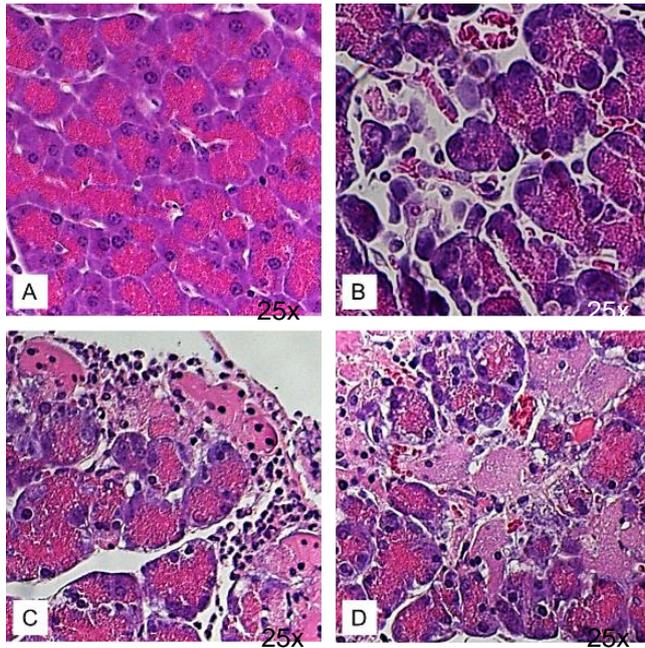


Abbildung 27: HE-Färbung von Pankreas-Schnitten

HE-Färbung von Pankreas-Schnitten zur histologischen Beurteilung mittels Lichtmikroskopie: Das gesunde Gewebe (A) zeigt eine kompakte Gewebestruktur. Die histologischen Schnittbilder der TC-induzierten Pankreatitis sind in B-D zu sehen. (B) zeigt ödematös verbreitete Interzellularräume, bei einer mit PQ529 behandelten Maus (B). In Bild (C) ist ödematöses Gewebe mit Entzündungszellinfiltration zu erkennen. Bild (D) zeigt Parenchymnekrosen und Entzündungszellen.

In Abbildung 28 sind Pankreaskopf und Pankreasschwanz in der histologischen Auswertung dargestellt. Diese Unterscheidung wurde gemacht, da durch die Methodik das TC direkt in den Pankreaskopf instilliert wurde, währenddessen der Pankreasschwanz weniger betroffen war.

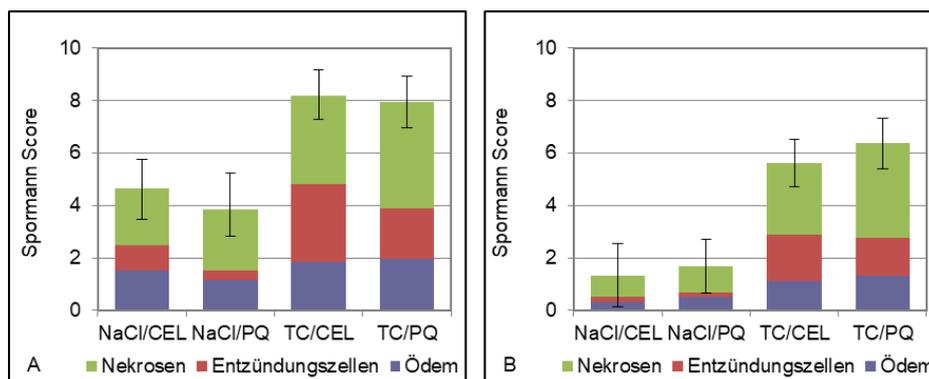


Abbildung 28: Auswertung der Histologie bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529

Histologische Auswertung A) des Pankreaskopfes und B) des Pankreasschwanzes bei TC-induzierter Pankreatitis mit therapeutischer Inhibitor-Gabe nach 1 h und 5 h (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 21).

In der Abbildung 28 ist zu erkennen, dass der Score in allen Versuchsgruppen im Pankreasschwanz niedriger war als im Pankreaskopf. Auffällig war, dass in den NaCl-Kontrollen bereits hohe Scores für Ödeme und Nekrosen vorzufinden waren, jedoch weniger für eingewanderte Entzündungszellen. Diese erhöhten Werte waren vermutlich auf die Intervention und Flüssigkeitsinstillation in den Pankreasgang zurückzuführen, da hauptsächlich der Pankreaskopf betroffen war. Durch die TC-Instillation wanderten vor allem Granulozyten ins Gewebe ein. Auch war zu beobachten, dass die Taurocholat induzierte Pankreatitis das Pankreas geschädigt hat und so der Score von den Normal-Tieren zu den TC-Tieren sich mindestens verdoppelte. Deutlich ist zu erkennen, dass das PQ529 keinen Einfluss auf die Pankreas-Schädigung hatte, da auch die Anzahl der im Pankreasgewebe vorhandenen Entzündungszellen nicht gesenkt werden konnte. In der HE-Färbung stellte sich dies vor allem als Granulozyten dar, wodurch sich auch die fehlende Wirkung von PQ529 zur Verringerung der Granulozyten-Aktivität und MPO im entzündeten Pankreas erklären lässt.

3.3.2.2 Inhibitor-Gabe 2 h und 5 h nach Induktion einer Taurocholat-Pankreatitis

In den weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob das Zeitfenster der ersten Inhibitor-Gabe von +1 h auf +2 h (Abbildung 29) erweitert und gegebenenfalls auf +4 h (Abbildung 30) ausgedehnt werden kann. Alle anderen Bedingungen wurden wie in der Versuchsreihe mit der Inhibitor-Gabe 1 h und 5 h nach TC-Induktion durchgeführt.

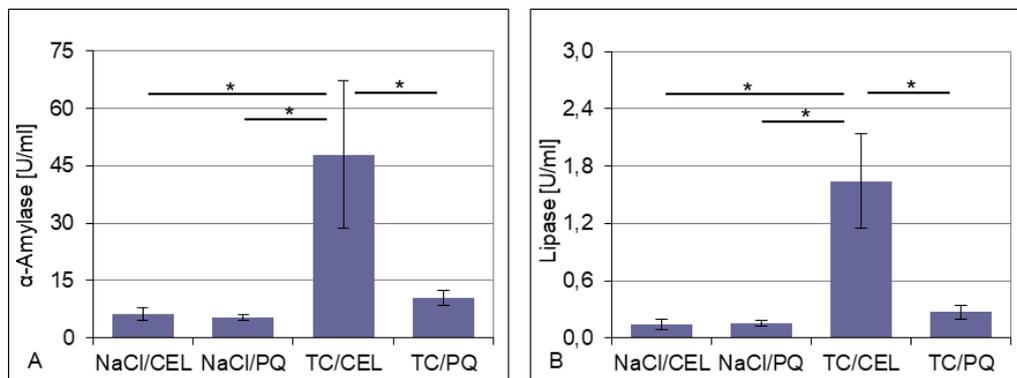


Abbildung 29: Serum-Amylase und -Lipase bei therapeutischer Applikation (+2 h/+5 h) von PQ529

Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Serum-Aktivitäten von A) α -Amylase und B) Lipase bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 2 h und 5 h (TC-Gruppen: $n=3-5$, Kontroll-Gruppen: $n=3$, Mittelwert \pm SEM).

In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass 2 h nach Induktion der TC-Pankreatitis die Gabe des Inhibitors PQ529 zu einem signifikant verringerten Austritt der α -Amylase und der Lipase führte.

3.3.2.3 Inhibitor-Gabe 4 h und 7 h nach Induktion einer Taurocholat-Pankreatitis

Zur Bestimmung des optimalen Zeitfensters einer therapeutischen Intervention mit PQ529 im Zeitverlauf der Taurocholat-Pankreatitis wurde der Inhibitor in analogen Versuchsansätzen und Bedingungen jeweils zu einem um 2 h späteren Zeitpunkt, daher 4 h und 7 h nach Pankreatitisinduktion appliziert.

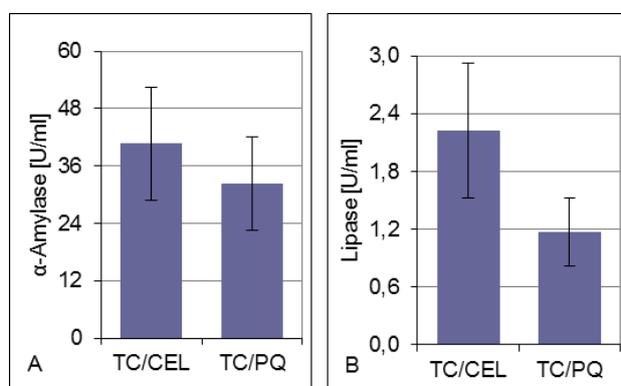


Abbildung 30: Serum-Amylase und -Lipase bei therapeutischer Applikation (+4 h/+7 h) von PQ529

Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Serum-Aktivitäten von A) α -Amylase und B) Lipase bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 4 h und 7 h (TC-Gruppen: $n=6-10$, Mittelwert \pm SEM). Auf eine Untersuchung der Kontroll-Tiere wurde verzichtet.

Im Gegensatz zur Inhibitor-Gabe nach +2 h/+5 h ging von der Intervention mit PQ529 zu einem späteren Zeitpunkt nach +4 h/+7 h nur eine wesentlich geringere Wirkung zur Reduktion der Amylase- und Lipase-Konzentrationen im Serum aus. Diese Untersuchung zeigte, dass der späte Einfluss des Inhibitors mit einer Gabe nach 4 h und 7 h nur zu einer nicht signifikanten Verringerung der α -Amylase- und Lipase-Spiegel führte und damit das optimale Zeitfenster für eine effektive Therapie vermutlich überschritten wurde.

3.4 Untersuchungen zur Ausprägung einer Taurocholat-induzierten Pankreatitis an QC-k.o.-Mäusen

Für diese Versuchsreihe wurden wie auch im Punkt 3.1 sowohl QC1- als auch IsoQC-defiziente-Mäuse eingesetzt. Die Experimente zu diesem Punkt hatten daher den Charakter

einer ‚*Proof-of-Principle*‘-Untersuchung, in dem die Deletion der QC-Isoenzyme letztlich dem Zustand der Enzymhemmung entspricht.

Die Untersuchungen wurden, wie in Punkt 2.4.2 beschrieben durchgeführt und das Pankreas, wie in Punkt 2.5.1 beschrieben, aufgearbeitet. Die Induktion der Pankreatitis erfolgte nur in IsoQC-WT- und –k.o.-Mäusen, da nicht genügend QC1-k.o.-Mäuse für diese Untersuchungen zur Verfügung standen.

Die therapeutische Verabreichung von PQ529 und dem Lösungsmittel CEL erfolgte +1 h und +5 h nach Induktion der Pankreatitis. Die Effekte auf die α -Amylase und Lipase im Serum sind in Abbildung 31 und Abbildung 32 zu sehen.

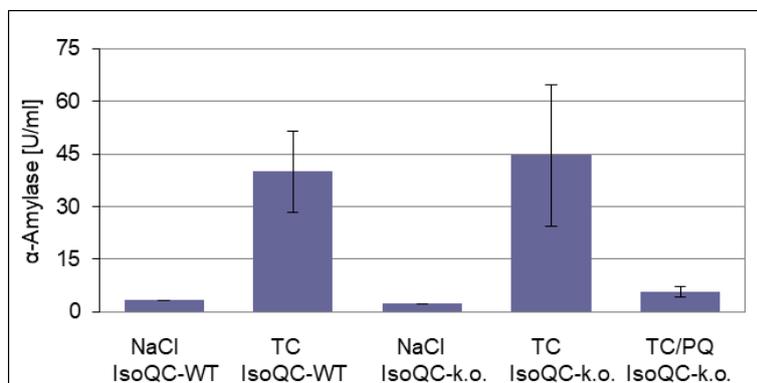


Abbildung 31: Serum-Amylase von IsoQC-WT- und –k.o.-Mäusen

Effekt einer TC-induzierten Pankreatitis und Wirkung einer therapeutischen Gabe von PQ529 auf die pankreatische α -Amylase-Konzentration im Serum von IsoQC-WT- und –k.o.-Mäusen (TC-Gruppen: $n=3-4$, Kontroll-Gruppe: $n=1$, Mittelwert \pm SEM).

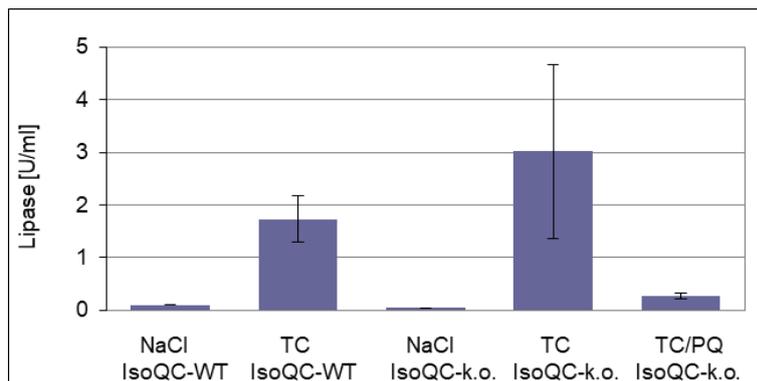


Abbildung 32: Serum-Lipase von IsoQC-WT- und –k.o.-Mäusen

Effekt einer TC-induzierten Pankreatitis und Wirkung einer therapeutischen Gabe von PQ529 auf die Serum-Lipase von IsoQC-WT- und –k.o.- (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 31).

Die Ausschüttung von Pankreas-Enzymen, gemessen anhand der Spiegel von Amylase und Lipase im Serum, waren in den IsoQC-knock-out-Tieren gegenüber den WT-Kontrollmäusen nicht signifikant erhöht (Abbildung 31 und Abbildung 32). Es zeigte sich jedoch, dass die im

Verlauf der TC-induzierten Pankreatitis in IsoQC-k.o.-Mäusen auftretende Erhöhung der Amylase und Lipase-Spiegel im Serum durch die therapeutische Gabe des QC-Inhibitors gesenkt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits mit NMRI-Mäusen (siehe Abbildung 21, Punkt 3.3.2) erzielt, die als WT-Maus keine Defizienz zur Expression von IsoQC aufweisen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die IsoQC-Deletion keinen signifikanten Einfluss auf eine Reduktion der Serumspiegel für Amylase und Lipase im Verlauf der Taurocholat-Pankreatitis hatte, die auf eine Milderung des Krankheitsverlaufes auf Basis dieser Daten schließen lassen. Diese Ergebnisse wurden durch die Messungen des IL-6 im Serum gestützt (Abbildung 33).

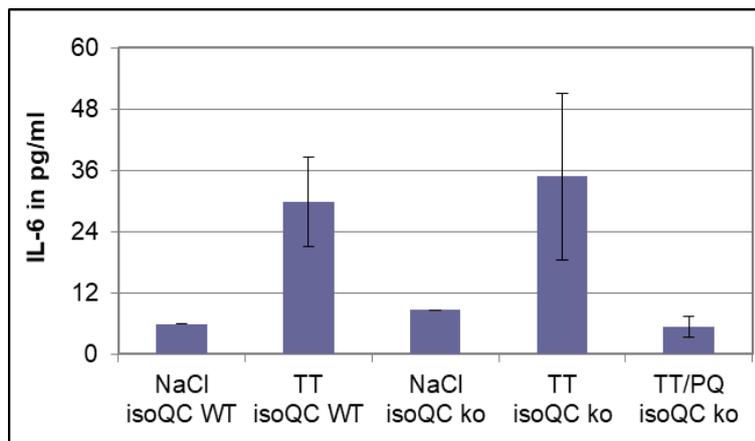


Abbildung 33: Serum-IL-6 von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen

Effekt einer TC-induzierten Pankreatitis auf den Serum-IL-6-Leveln von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 31).

Die Hemmstoff-Gabe von PQ529 bei IsoQC-k.o.-Mäusen führte jedoch zu einer deutlichen Verringerung des IL-6-Spiegels im Serum

In Abbildung 34 war zu erkennen, dass der QC-Inhibitor in den IsoQC-k.o.-Mäusen (mit TC) nur einen geringen Einfluss auf den MCP-1-Spiegel, im Vergleich zu den IsoQC-k.o.-Mäusen (mit TC) ohne Inhibitor hatte. Werden die IsoQC-WT-Mäuse (mit TC) betrachtet, ist eine nicht signifikante Reduzierung des MCP-1 Spiegels zu den IsoQC-k.o.-Mäusen zu erkennen.

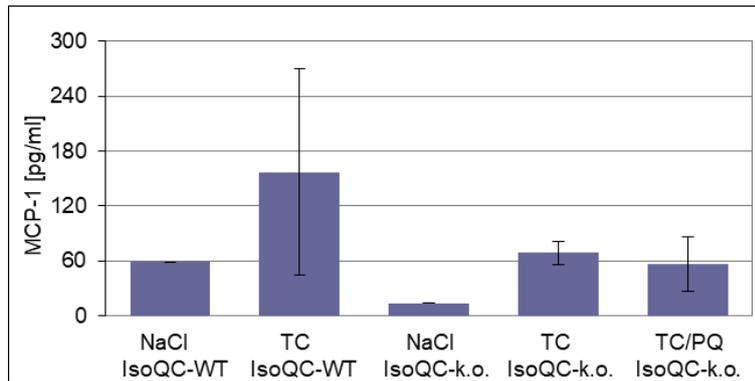


Abbildung 34: Serum-MCP-1 von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen

Effekt einer TC-induzierten Pankreatitis auf das Serum-MCP-1-Level von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 31).

Zur histologischen Befundung der Pankreas-Schädigung wurden im Anschluss die HE-gefärbten Gewebeschnitte des Pankreaskopfes und des Pankreasschwanzes bei den IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen mit Hilfe des modifizierten Spormann-Scores ausgewertet (siehe Abbildung 35).

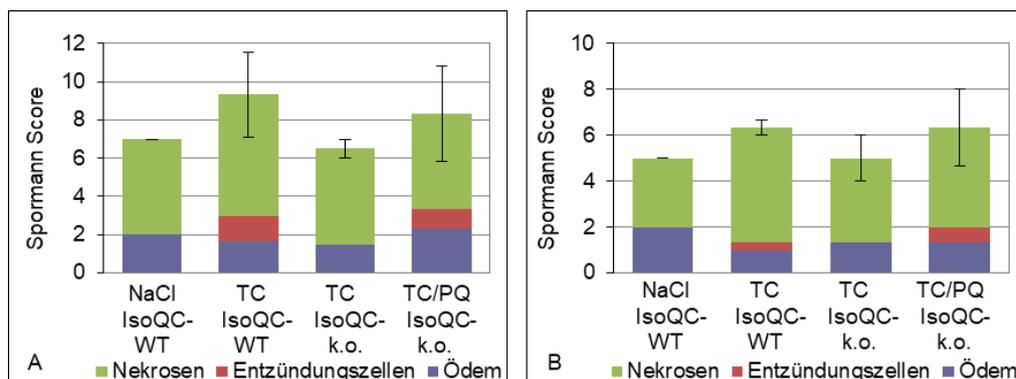


Abbildung 35: Auswertung der Histologien von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen

Histologische Auswertung des A) Pankreaskopfes und des B) Pankreasschwanzes von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen bei TC-induzierter Pankreatitis (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 31).

Die histologische Beurteilung der Pankreas-Schädigung zeigte keine Unterschiede zwischen den Knock-out-Tieren und den WT-Tieren. So ist zu erkennen, dass die Schädigung nahezu identisch ist zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Im Pankreasschwanz ist die Schädigung leicht geringer, ähnlich wie in Abbildung 35.

Der MPO-Spiegel im Pankreas bei den IsoQC Knock-out-Tieren und WT-Tieren ist in Abbildung 36 zu sehen.

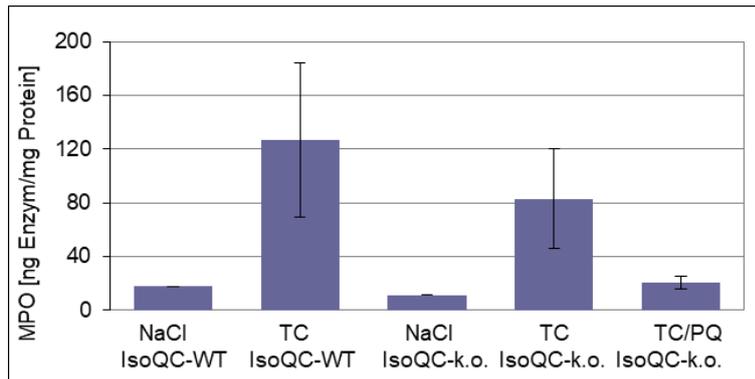


Abbildung 36: Pankreas-MPO von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen

Effekt einer TC-induzierten Pankreatitis auf das Pankreas-MPO-Level von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 31).

Die Untersuchungen zur Myeloperoxidase im Pankreas zeigten, dass die Werte in den Mäusen mit einer Taurocholat-Pankreatitis im Vergleich zu den NaCl-Kontroll-Tiere deutlich erhöht waren. Es wurde jedoch ersichtlich, dass eine IsoQC-Defizienz unter den Bedingungen einer schweren AP keinen Einfluss auf die Neutrophilen im Pankreas zeigte und daher nicht zu einer signifikanten Verringerung der pankreatischen MPO gegenüber den WT-Mäusen führte (siehe Abbildung 36). Eine Wirkung von PQ529 zur Reduktion der pankreatischen MPO in IsoQC-Mäusen wurde dennoch bestimmt, auch wenn diese nicht auf einem Signifikanzniveau lag.

3.5 Trypsinogen-Aktivierung

Die Messung der Trypsin-Aktivität im Pankreasgewebe wurde als Maß für die pathophysiologische Zymogen-Aktivierung verwendet.

3.5.1 Bei prophylaktischer Gabe des Inhibitors PQ529

Die Inhibitor-Gabe erfolgte 1 h vor und 5 h nach Induktion einer Taurocholat-Pankreatitis bei NMRI-Mäusen. Die gemessene Trypsin-Aktivität ist in Abbildung 37 dargestellt.

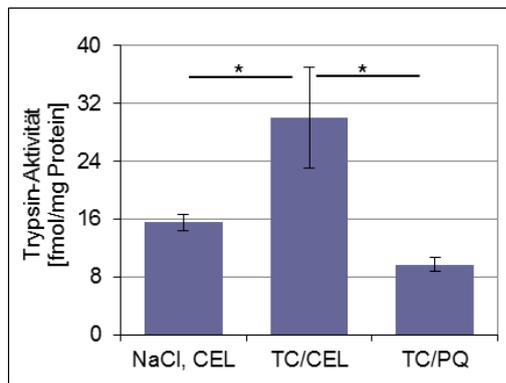


Abbildung 37: Pankreas-Trypsin-Aktivität bei prophylaktischer Applikation von PQ529
Effekt einer prophylaktischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Pankreas-Trypsin-Aktivität bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 18).

Die in Abbildung 37 aufgeführten Werte der Trypsin-Aktivität im Pankreas von Taurocholat- und NaCl-stimulierten NMRI-Mäusen zeigt, dass der QC-Inhibitor eine signifikante Reduktion der Trypsinogen-Aktivierung bewirkte.

3.5.2 Bei therapeutischer Gabe des Inhibitor PQ529

Die Inhibitor-Gabe erfolgte 1 h und 5 h nach Induktion einer Taurocholat-Pankreatitis bei NMRI-Mäusen. Die gemessene Trypsin-Aktivität im therapeutischen Versuchsmodell ist in Abbildung 38 dargestellt.

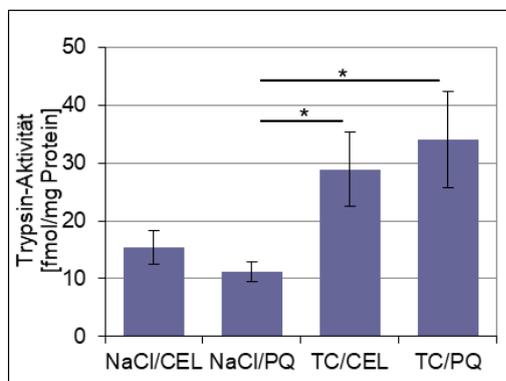


Abbildung 38: Pankreas-Trypsin-Aktivität bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529

Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Pankreas-Trypsin-Aktivität bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 1 h und 5 h (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 21).

Es zeigte sich, dass im therapeutischen Modell bei einer Inhibitor-Gabe 1 h und 5 h nach der Induktion der TC-Pankreatitis keine Reduktion der Trypsin-Aktivität erfolgte. Im Vergleich zu den Untersuchungen in Punkt 3.3.2.1 war zu erkennen, dass die Trypsinogen-Aktivierung per se zu einem früheren Zeitpunkt einsetzt und der Inhibitor bei therapeutischer Gabe nach 1 h

und 5 h zu einer Verringerung der α -Amylase, Lipase und den Entzündungsmediatoren (IL-6, MCP-1 und TNF- α) im Serum führte.

In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte die Inhibitor-Gabe therapeutisch 4 h und 7 h nach Induktion einer Taurocholat-Pankreatitis bei NMRI-Mäusen, siehe Abbildung 39.

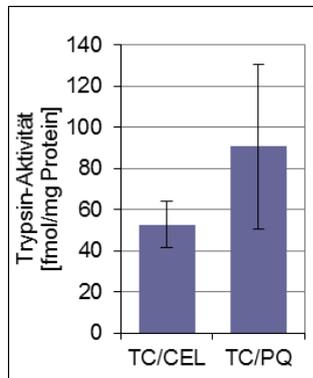


Abbildung 39: Pankreas-Trypsin-Aktivität bei therapeutischer Applikation (+4 h/+7 h) von PQ529

Effekt einer therapeutischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Pankreas-Trypsin-Aktivität bei Taurocholat-induzierter Pankreatitis nach 4 h und 7 h (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 30).

Erwartungsgemäß wurde auch zu diesem späteren Zeitpunkt keine Verringerung der Trypsin-Aktivität nachgewiesen.

In der folgenden Abbildung ist die Trypsin-Aktivität bei der TC-induzierten Pankreatitis in den IsoQC-Mäusen mit und ohne QC-Inhibitor dargestellt. Die Tiere erhielten 1 h und 5 h nach TC-Induktion den Inhibitor bzw. das Lösungsmittel.

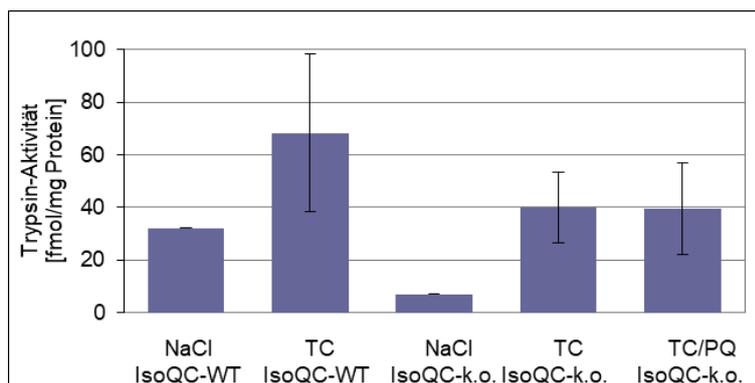


Abbildung 40: Pankreas-Trypsin-Aktivität von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen

Effekt einer TC-induzierten Pankreatitis im Zeitverlauf nach 24h auf die Pankreas-Trypsin-Aktivität von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen (Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 31).

In Abbildung 40 ist zu erkennen, dass eine IsoQC-Defizienz im Zeitverlauf einer schweren AP nach 24 h nicht zu einer signifikanten Verringerung der Trypsinogen-Aktivierung im Vergleich

zu den IsoQC-WT-Mäusen führte. Auch die Gabe des QC-Inhibitors zeigte keinen Einfluss, der eine Verringerung der Trypsin-Aktivität bewirkte.

3.5.3 Darstellung der subzellulären Lokalisation der durch PQ beeinflussten Trypsin-Aktivität

In dieser Versuchsreihe wurden vier NMRI-Mäuse mit Caerulein, wie im Punkt 2.4.1 beschrieben, über 8 h stimuliert. Die Tiere wurden zusätzlich prophylaktisch eine Stunde vor und vier Stunden nach der ersten Caerulein-Injektion mit PQ529 bzw. Hydroxyethyl-Cellulose (-1 h/+4 h) behandelt. Das Pankreas wurde, wie in Punkt 2.5.2 beschrieben, aufgearbeitet. In Abbildung 41 ist repräsentativ die subzelluläre Verteilung der intrapankreatischen Trypsin-Aktivität nach Auswertung von vier unabhängigen Versuchsreihen dargestellt.

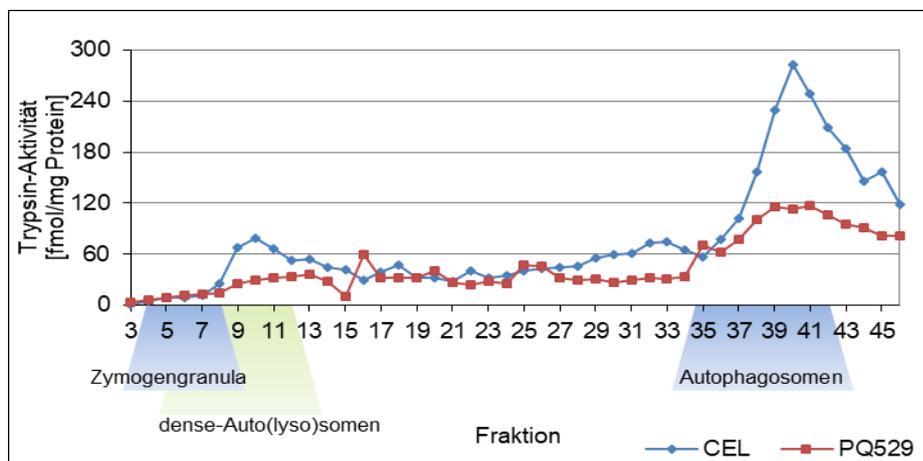


Abbildung 41: Trypsin-Aktivität im Percoll-Dichtegradienten der subzellulären Fraktionen Effekt einer prophylaktischen Applikation des QC-Inhibitors PQ529 auf die Pankreas-Trypsin-Aktivität bei Caerulein-induzierter Pankreatitis. Die Darstellung zeigt die subzellulären Fraktionen die aus dem Percoll-Dichtegradienten gewonnen wurden.

Im Zeitverlauf einer Caerulein-Pankreatitis nach 8 h wurde ein maximaler Peak für die Trypsin-Aktivität in der Verteilung um Fraktion 40 ermittelt, die auf eine Lokalisation in autophago(lyso)somalen Kompartimenten hindeutet und als spätes Ereignis im autophagosomalen Pathway erscheint (Halangk/Wartmann, persönliche Mitteilung). Eine Behandlung der NMRI-Mäuse mit PQ529 führte zu einer bis zu 2-fachen Verringerung dieser maximalen Trypsin-Aktivität in den autophago(lyso)somalen Fraktionen 34-42 (um Fraktion 40) gegenüber den Kontrolltieren ohne Inhibitor. Es ist daher zu schlussfolgern, dass der QC-Inhibitor PQ529 auch einen Einfluss auf die „späte“ autophagosomale Protease-Aktivierung wie die Trypsinogen-Aktivierung aufweist.

4 Diskussion

Die adäquate, befundgerechte und erfolgreiche Behandlung von Patienten mit schwerer AP ist auch heute noch eine der größten klinischen Herausforderungen. Ein Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass es bis zum jetzigen Zeitpunkt für die AP noch keine spezifische Therapie gibt [153]. Die Einleitung einer Schmerztherapie, die Beherrschung des Krankheitsverlaufs und insbesondere die Behandlung der Komplikationen, die eine schwere AP mit sich bringen, sind nach wie vor von zentraler Bedeutung [154]. Viele Versuche, den möglichen pathophysiologischen Ursachen entgegen zu wirken, waren nicht erfolgreich. Einerseits wurde versucht, die pankreatische Enzymsynthese und -sekretion zu verringern. So wurde unter anderem versucht, mit CCK-Rezeptorantagonisten, Glukagon und pankreatischen Polypeptid, der Enzym-Sekretion entgegen zu wirken und diese zu inhibieren [155, 156, 157, 158]. Andererseits sollte eine Verminderung des oxidativen Stresses die Pankreatitis lindern. Experimentelle Studien, bei denen Radikalfänger und Antioxidantien eingesetzt wurden, konnten keine positive Veränderung im Verlauf der Pankreatitis herbeiführen [159]. Zudem wurden unphysiologisch aktivierte Proteasen inhibiert. In früheren Studien wurden Protease-Inhibitoren wie Aprotinin, Gabexat-Mesilat oder Nafamostat eingesetzt. Diese zeigten prophylaktisch eine gute Wirkung, konnten aber bei therapeutischen Studien nicht überzeugen [10, 160, 161].

Die AP wird primär nicht chirurgisch therapiert. Die Chirurgie kommt bei Intervall-Cholezystektomie, ggf. bei Nekrosektomie, Abszessentlastung und symptomatischer Pseudozysten-Entlastung bzw. –Drainage-Operation zum Einsatz [10]. Diese Eingriffe beheben mögliche Ursachen oder deren Komplikationen, die zur Pankreatitis geführt haben, aber sie führen nicht unmittelbar zur Ausheilung der Pankreas-Schädigung.

Heute ist es akzeptiert, dass die AP in den Azinuszellen beginnt. Ein sehr frühes Ereignis bei experimenteller AP ist die Störung des ‚calcium signaling‘. Die unphysiologische Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration ist eng verbunden mit der Aktivierung von pankreatischen Zymogenen, insbesondere von Proteasen [44]. Das führte zur Hypothese, dass aktivierte Zymogene für die Azinuszell-Schädigung und Pankreasnekrose verantwortlich sind. Es ist noch nicht abschließend geklärt, welche Rolle eine Entzündung mit dem Potenzial vermehrt gebildeter Chemokine und Zytokine sowie aktivierter Entzündungszellen hat und wie diese inflammatorischen Ereignisse mit der Zymogen-Aktivierung verbunden sind.

Inzwischen wurde sicher nachgewiesen, dass Azinuszellen auch Chemokine und Zytokine produzieren können [38, 67, 100, 162].

Während die Vorgänge der Zymogen-Aktivierung ausgiebig untersucht wurden, rücken viele neue Studien zur Behandlung einer AP die Entzündungsvorgänge in den Fokus und zielen auf die Reduktion bzw. auf die Verhinderung der Chemokin- und Zytokin-Produktion ab [38, 94, 163]. Dabei steht besonders das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2/ MCP-1) im Mittelpunkt. Bis heute war eine therapeutische Blockade von CCL2 nicht von Erfolg gekrönt gewesen. Ein möglicher Grund für unerwartete Nebenwirkungen und die mangelnde Wirksamkeit in der Klinik könnte in der sich abzeichnenden Komplexität der Auswirkungen von CCL2 auf das Verhalten von Immunzellen sein [76].

Das N-terminale Glutamin (Gln) von MCP-1 wird durch IsoQC zu Pyroglutamat (pGlu) zyklisiert, wodurch das Protein stabilisiert und vor proteolytischem Abbau geschützt wird [96, 130]. Aufgrund der nachgewiesenen Wirkung, durch die Hemmung der Glutaminylzyklase die Menge an MCP-1 zu verringern [95, 98], ist die Etablierung eines QC-Inhibitors zur therapeutischen Behandlung einer AP als entzündliche Erkrankung mit monozytärer Beteiligung das Ziel.

Deshalb wurde die Arbeitshypothese geprüft, ob eine Hemmung der Glutaminylzyklase zu einer Abschwächung der inflammatorischen Kaskade und zu einer Verbesserung der Pankreatitis-Symptome führt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob im weiteren Krankheitsverlauf einer induzierten Taurocholat-Pankreatitis eine Reduktion der inflammatorischen Kaskade unabhängig und ohne primäre Beeinflussung der intraazinen Vorgänge, welche zu Zymogen-Aktivierung und damit verbundener Zell-Schädigung führen, erreicht werden kann. Zudem besteht die Möglichkeit, das Ausmaß des durch die Entzündungszellen hervorgerufenen Pankreas-Schadens zu bestimmen.

Daher sollte die Glutaminylzyklase als ein neuartiges Target zur Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen wie z.B. der AP untersucht werden. Mit der Entwicklung eines Medikamentes, das therapeutisch wirkt, könnte vielen Patienten geholfen werden.

Zur Beantwortung dieser Frage war es zunächst erforderlich, das Vorkommen und die Lokalisation der Glutaminylzyklasen zu ermitteln und die prinzipielle Wirksamkeit des QC-Inhibitors bei prophylaktischer Applikation zu testen.

4.1 Nachweis von Glutaminylzyklasen im Pankreas

Die Glutaminylzyklasen beeinflussen das Entzündungsgeschehen [95]. Um einen möglichen Einfluss bei der AP zu untersuchen, sind Versuche am Gesamtorganismus notwendig. Untersuchungen am Menschen gestalten sich jedoch als schwierig (siehe Abschnitt 1.1.2), deshalb erfolgten die Experimente an Mäusen.

Es war bisher nichts zum Vorkommen von QC im Pankreas bekannt. Um die Rolle von QC zu charakterisieren, war es zunächst wichtig zu wissen, wo die QC1 lokalisiert ist und ob sich die Lokalisation bei AP verändert. Diese Fragestellungen werden am besten an Modellen einer milden Pankreatitis geklärt, da Modelle der schweren Pankreatitis einen fulminanten Verlauf haben und das Gewebe stark an Integrität verliert [108]. Das Caerulein-Modell hat den Vorteil, dass das azinäre Gewebe keine wesentliche Nekrotisierung zeigt.

In den letzten Jahren konnte festgestellt werden, dass in verschiedenen Geweben neben der QC1 noch eine zweite Isoform, die IsoQC, existiert [95]. Deshalb war es erforderlich, die QC-Aktivität im Pankreasgewebe nachzuweisen und ihre intrazelluläre Lokalisation zu bestimmen. Die Isoenzyme QC1 und IsoQC lassen sich jedoch mittels Aktivitätsmessung nicht unterscheiden und es existieren keine spezifischen Hemmstoffe.

Deshalb wurde zuerst in den zur Verfügung stehenden k.o.-Mäusen das Vorkommen an QC-Aktivität aufgezeigt. Im nächsten Schritt wurde durch einen Western-Blot mit spezifischen QC1- und IsoQC-Antikörpern gezeigt, ob und wie viel Protein vorhanden ist. Im letzten Schritt wurden die Zellfraktionen, gewonnen aus der Dichtegradienten-Zentrifugation, zusätzlich auf den Golgi-Marker p115 getestet (Abbildung 13 und Abbildung 14). In Fraktionen mit geringer Dichte wurde der Golgi-Komplex gefunden. Diese Fraktionen stimmen mit denen der gemessenen QC-Aktivität und auch der im Western-Blot gefundenen Proteine überein. Daraus ist deutlich zu erkennen, dass Glutaminylzyklasen im Golgi-Apparat des exokrinen Pankreas exprimiert werden und die QC-Aktivität im gesunden Pankreas hauptsächlich durch das Isoenzym IsoQC und nicht durch QC1 repräsentiert sind.

4.2 Wirkung des Glutaminylzyklase-Inhibitors auf Azinuszell spezifische Enzyme und Pathways

Das Vorkommen der IsoQC bzw. der QC1 im exokrinen Pankreasgewebe war die Voraussetzung für die weiteren Experimente zur Testung eines QC-Inhibitors bei AP. Zur Bestätigung der Hypothese, dass die QC1/IsoQC über die Modifikation von Entzündungsmediatoren wirkt, musste ausgeschlossen werden, dass erstens der Hemmstoff eine Wirkung auf die Enzyme bzw. auf die Prozesse, die bei der Schädigung der AP eine Rolle spielen, hat. Im Zuge dieses Experimentes wurde gezeigt, dass enzymatische Aktivitäten von Trypsin, Chymotrypsin und Cathepsin B in Anwesenheit von PQ529 nicht beeinflusst werden.

Als Zweites galt es auszuschließen, dass der QC-Hemmstoff die AP dadurch abschwächt, dass er die Induktion einer experimentellen Pankreatitis beeinträchtigt. Beim Modell der hormonellen Hyperstimulation mit Caerulein war eine Sensitivität der Azinuszellen gegenüber

einer Stimulation mit dem CCK8-Analogen eine wichtige Voraussetzung. Daher wurden an isolierten Azinuszellen die Eigenschaften des Hemmstoffes auf mögliche Veränderungen und Beeinträchtigungen im Sekretionsverhalten gegenüber einer Caerulein-Stimulation untersucht.

Der Hemmstoff hatte keine direkte Wirkung auf das Stimulus-Sekretions-Verhalten in den Azinuszellen. Vor allem zeigte sich kein Einfluss auf die Sekretionshemmung bei sehr hohen Caerulein-Konzentrationen (Abbildung 16). Somit war eine Wirkung auf die Reaktionen, die vor allem bei der Induktion und Pathogenese einer Caerulein-Pankreatitis ablaufen, wenig wahrscheinlich.

4.3 Einfluss der QC-Inhibition auf die Ausprägung der Pankreatitis

Das Modell einer milden Pankreatitis ist für Therapiestudien, die auf das Pankreas gerichtet sind, eher weniger geeignet. Ein Therapieeffekt kann deshalb am ehesten bei Tierexperimenten mit einer schweren AP beobachten werden. Diese Vorgehensweise trägt auch der klinischen Situation Rechnung, dass vor allem schwere Pankreatitiden einer wirksamen Therapie bedürfen.

Zur Austestung des Glutaminylyklase-Inhibitors PQ529 wurde das Taurocholat-Modell verwendet, um eine schwere AP bei der Maus zu erzeugen [109, 110, 111]. Dieser wurde im prophylaktischen und anschließend im therapeutischen Modell oral appliziert und seine Wirkung anhand bestimmter Pankreatitis-Marker beurteilt. Der Einsatz eines QC-Inhibitors zielt darauf ab, die Wirksamkeit und/oder Produktion der posttranslational modifizierten Entzündungsmediatoren in den zunächst gewebeständigen inflammatorischen Zellen zu erniedrigen. Deshalb wurden diese Mediatoren im Serum sowie im Pankreasgewebe gemessen. Im Mittelpunkt stand dabei das MCP-1. Die Hemmung der QC-Aktivität sollte bewirken, dass das Pyroglutamat am N-Terminus des Chemokins MCP-1 nicht gebildet wird. Dies sollte dann in eine Verringerung der Aktivität und gegebenenfalls in einer Abnahme der MCP-1-Konzentration münden, so dass dies in einer Abschwächung der Entzündungsreaktion resultiert [95].

Der oral applizierte QC-Hemmstoff, prophylaktische und therapeutische Gabe, bewirkte eine Reduktion der MCP-1-Spiegel im Serum sowie im Pankreas (Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 22 und Abbildung 24). Dieser Befund ist insofern interessant, da er zeigt, dass MCP-1 als Protein verringert ist, da der Antikörper des ELISA sowohl die native als auch das zyklisierte MCP-1 detektiert. Das der PQ529 Inhibitor ein guter Ansatzpunkt für die Reduzierung des MCP-1 Spiegels ist, wurde auch durch Kanemitsu et al. bestätigt, die am

Beispiel des Ratten-Modells die MCP-1 Spiegel erfolgreich bei der chronischen Nieren Krankheit reduzieren konnten [91]. Das MCP-1 gilt als früher Mediator in der Entzündungsantwort der AP. Dieses bindet an die Zellen, die den CCR2-Rezeptor exprimieren, und aktiviert diese [67, 164]. Ein hoher MCP-1-Spiegel führt dementsprechend zu einem schwereren Verlauf der AP [70]. Jedoch ist MCP-1 nur eins von vielen Chemokinen, die während der Pankreatitis hochreguliert werden.

Mit der Gabe des Hemmstoffes PQ529 konnte zudem beobachtet werden, dass die IL-6-Level in Serum und Gesamtpankreas bei den prophylaktischen und therapeutischen Versuchsmodellen abgenommen haben. Eine hauptsächliche Komplikation der schweren AP ist die nach IL-6-Expression entstehende akute Lungenerkrankung (ALI). Die Signalkaskade, die bei ALI auftritt, ist noch nicht vollständig verstanden. Ein erhöhter IL-6-Serum-Level ist jedoch ein zuverlässiger Marker für den Schweregrad der Krankheit [21].

Neben dem proinflammatorischen Zytokin IL-6 ist auch TNF- α ein Mediator, der den Schweregrad der AP bestimmt. Deshalb wurde auch dieses Zytokin in dem therapeutischen Ansatz untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die TNF- α -Spiegel im Serum mit der Gabe des Hemmstoffes deutlich abgenommen haben. Im Pankreas-Gewebe ist keine Verringerung des TNF- α -Spiegels zu beobachten. TNF- α ist deshalb von besonderer Bedeutung, da es die Synthese und die Freisetzung von weiteren Zytokinen induziert und die alveolaren Makrophagen aktiviert [165].

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die QC-Hemmung die im Pankreas vorhandenen und möglicherweise aktiven Chemokine und Zytokine sehr wirksam beeinflussen kann. Überraschenderweise demonstrierten diese Untersuchungen, dass sich durch eine QC-Hemmung nicht nur die Chemokin- und Zytokin-Spiegel reduzieren lassen, sondern auch die Pankreas-Schädigung vermindert werden kann. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass der größte Teil der Pankreas-Schädigung, zumindest in diesem Model der AP, durch Effekte dieser Mediatoren vermittelt sein muss.

Als direktes Maß für die Schädigung des Pankreasgewebes werden die Marker und Charakteristika – Austritt von Amylase und Lipase ins Serum und mikroskopisch nachweisbare Veränderungen im Pankreasgewebe – verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der QC zu einer signifikanten Verringerung der Azinuszell-Schädigung führt, da der α -Amylase- und Lipase-Austritt ins Serum (Abbildung 18, Abbildung 21, Abbildung 29, Abbildung 31 und Abbildung 32) signifikant verringert wurde.

Aus den gewonnenen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die generelle Wirksamkeit des Hemmstoffes gezeigt wurde. Im prophylaktischen und auch im therapeutischen Modell (+1 h und +5 h) wurden die Level von α -Amylase, Lipase, MCP-1, IL-6 und TNF- α zum Teil signifikant verringert. Wenn die NF κ B-Signalkaskade aktiviert wurde und der Hemmstoff auch zu einem späteren Zeitpunkt nach Induktion noch wirksam ist, ist davon auszugehen, dass spätere Ereignisse der Zytokin-Synthese gehemmt werden.

Zur Evaluierung eines therapeutisch wirksamen Fensters wurde das PQ529 zu späteren Zeitpunkten appliziert. Als Marker wurden die Serum-Lipase- und der α -Amylase-Spiegel untersucht. Es hat sich gezeigt, dass selbst bei einer ersten Gabe nach zwei Stunden ein positiver Effekt gefunden wurde. Zu beobachten ist, dass die Abschwächung der Pankreatitis nach Erst-Gabe des Inhibitors nach vier Stunden keine eindeutig positiven Effekte mehr zeigte und offensichtlich die Inflammation nicht mehr aufgehalten werden konnte.

In dem gewählten Versuchstiermodell, dem Modell der retrograden Gang-Perfusion mit Natrium-Taurocholat, werden neben Pseudozysten, Pankreas-Abszessen und Fettgewebsnekrosen vor allem Hämorrhagien und Nekrosen im Pankreas gefunden [109, 110, 111]. Eine morphologische Klassifizierung des Pankreatitis-Schweregrades erfolgte durch die mikroskopisch zu beobachtenden Entzündungszellen, Parenchymnekrosen und Ödeme. Ein darauf basierender Score wurde von Spormann beschrieben [151]. In den Ergebnissen (Abbildung 28) wurde eine deutlich nachweisbare Einwanderung der Entzündungszellen bei der Taurocholat-induzierten Pankreatitis beobachtet. Zwischen den Hemmstoff-behandelten Tieren und den Pankreatitis-Kontrollen ist kein histologisch sichtbarer Unterschied in der Menge der eingewanderten Entzündungszellen zu sehen, obwohl die Pankreatitis-Marker in den behandelten PQ529-Mäusen im Serum und im Pankreas deutlich verringert sind. Dies könnte seine Ursache darin haben, dass vor allem Granulozyten angefärbt werden, während dessen MCP-1 und das TNF- α die Makrophagen- und Monozyten-Population beeinflussen würden.

Mit der Gabe des Hemmstoffes wurde keine nachweisbare Verbesserung der mikroskopisch sichtbaren Schädigung erzielt. Allerdings sind schon hohe Score-Werte bei den Kontroll-Tieren vorhanden. Hier zeigt sich die methodische Problematik des TC-Modells. Eine zu schnelle Flüssigkeitsinstillation in den Pankreasgang führt zu erhöhten Scores der Kontroll-Tiere. Es muss eine langsame Instillation der Injektionslösung erfolgen, um eine druckinduzierte Pankreatitis zu vermeiden. Dieser Aspekt ist der wesentliche Nachteil des TC-Modells [113, 114]. Um ein langsames und gleichmäßiges Instillieren der Kontrolllösung bzw. der Taurocholatlösung zu gewährleisten, sollte eine Infusionspumpe verwendet werden. Mit dem Infundieren über 5-10 min kann eine druckinduzierte Pankreatitis vermieden werden.

Die Deletion der QC (QC1 bzw. der IsoQC) sollte einer ‚*Proof-of-Principle*‘-Untersuchung dienen, die dem Zustand der Enzymhemmung entspricht. Durch das Verwenden von QC-1 bzw. IsoQC-k.o.-Mäusen im Vergleich zu den Wildtype-Mäusen konnte gezeigt werden, dass im gesunden Pankreas der Maus die QC-Aktivität hauptsächlich durch die IsoQC repräsentiert wird (Abbildung 13 und Abbildung 14). Deshalb war es umso erstaunlicher, dass ein k.o. der IsoQC allein nicht ausreicht, um die Effekte des Hemmstoffes PQ529 widerzuspiegeln. Es konnten keine signifikanten Reduzierungen in den untersuchten Parametern (MCP-1, α -Amylase, Lipase, MPO, Trypsin bzw. IL-6) ermittelt werden. Erst mit der zusätzlichen Hemmstoffapplikation bei den Knock-out-Tieren zeigte sich im Taurocholat-Modell der gleiche Effekt wie bei den NMRI-Tieren (siehe Ergebnisse Punkt 3.3 Wirkung von PQ529 auf Parameter der akuten Pankreatitis).

Eine Ursache könnte in der spontanen Zyklisierung von Gln zu pGlu des MCP-1 sein [166]. Weiterführende Untersuchungen zeigten in diesem Zusammenhang, dass durch den Effekt der Induktion einer Entzündung im TC-Modell die QC-Aktivität kompensatorisch, durch das sezernierte QC1, hochreguliert wurde. Dementsprechend kann durch die Gabe des Inhibitors ein weiterer Effekt beobachtet werden. Auch besteht die Möglichkeit, dass die vorhandene Aktivität für die Bildung des aktiven, zyklisierten MCP-1 ausreicht (persönliche Mitteilung, Th. Wartmann).

Aufgrund von Zuchtproblemen und der eng begrenzten Anzahl an Mäusen, konnten die QC1-k.o.-Mäuse für die aufgeführten Untersuchungen zur Taurocholat-Pankreatitis in dieser Arbeit nicht eingesetzt werden. Auch konnten keine weiteren Untersuchungen mit IsoQC-k.o.-Mäusen durchgeführt werden, sodass keine weiteren Daten, die für eine statistische Analyse nötig wären, generiert werden konnten.

4.4 Effekt einer QC-Inhibitor-Gabe auf die Trypsinogen-Aktivierung

Die in der Arbeit dargestellten Experimente sollten in ihrer ursprünglichen Konzeption die bis dahin offene Fragestellung klären, welcher Anteil an der Pankreas-Schädigung jeweils durch die intrazellulären Vorgänge der Zymogen-Aktivierung bzw. der entzündlichen Reaktionen hervorgerufen wird. Mit dem QC-Inhibitor stand ein Tool zur Verfügung, mit dem der Anteil durch Entzündungszellen abgeschätzt werden konnte.

Ausgehend vom Schema von Sah und Saluja 2011 (siehe Abbildung 4) wurde in Abbildung 42 eine differenzierte Erweiterung vorgenommen (persönliche Mitteilung, W. Halangk).

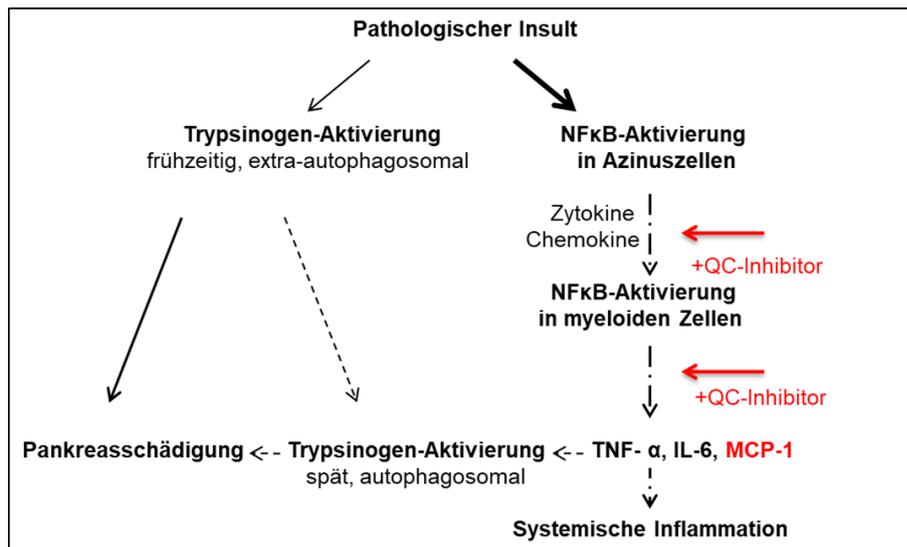


Abbildung 42: Erweiterung der Hypothese zu grundlegenden Pathomechanismen der Entstehung einer AP und Effekt des QC-Inhibitors

Erweiterung der Hypothese zu grundlegenden Pathomechanismen der Entstehung einer AP und Effekt des QC-Inhibitors

Die rot gekennzeichneten Effekte sind die aus dieser Untersuchungsreihe gewonnenen Erkenntnisse. Es zeigt, inwieweit die Inhibierung der QC die Signalkaskade beeinflusst.

Die in Abbildung 42 in schwarz dargestellten Reaktionswege zeigen, wie aus einem pathologischen Insult eine Pankreas-Schädigung entsteht. Einerseits erfolgt früh die Zymogen-Aktivierung und andererseits kommt es zur Initiierung der NFκB-Signalkaskade. Nach der NFκB-Aktivierung werden Chemokine und Zytokine unter anderem auch MCP-1 in den Azinuszellen synthetisiert und aktiviert. Daraus resultiert über das MCP-1 die NFκB-Aktivierung in den myeloiden Zellen, wobei weitere Chemokine und Zytokine, z.B. MCP-1, TNF-α und IL-6, gebildet werden und in einer Verstärkung der Inflammation münden. Das äußert sich klinisch in SIRS oder MOF. Spätere Effekte zeigen, dass die Zytokine auf die Azinuszellen wirken und eine „zweite Welle“ der Trypsinogen-Aktivierung hervorrufen. Dies wurde durch die Arbeitsgruppe um Sandler beschrieben, in dem diese aufzeigten, dass CTSSB und TNF-α darin involviert sind [63]. Es ist heute akzeptiert, dass die pathophysiologische Zymogen-Aktivierung in den Kompartimenten des Autophagosoms stattfindet [167].

Aufgrund dieser Hypothese wurde ein Ansatz für die Limitierung der Entzündungsreaktion gewählt, der nicht nur über die lokale und systemische Inflammation erfolgt, sondern der die intrazelluläre Zymogen-Aktivierung und den Azinuszell-Schaden mindern sollte. Durch die Verwendung des QC-Hemmstoffes wurde verhindert, dass das Pyroglutamat am MCP-1 zyklisiert und das Chemokin damit aktiviert wird. Im prophylaktischen Modell hat sich das erweiterte Schema der Pathomechanismen bestätigt. Die Schädigung der Zellen erfolgte

durch den Stimulus mit Taurocholat, siehe Kontroll-Tiere und TC-Tiere. Dieser Stimulus führte zum Start der Entzündungskaskade, welcher in einer Rekrutierung der Entzündungszellen mündet. Wirkt jetzt der Hemmstoff auf die Entzündung (siehe Absinken der Chemokin- und Zytokin-Spiegel), wird auch die Trypsinogen-Aktivierung herabgesetzt. Das impliziert, dass die inflammatorische Reaktion auch intrazelluläre Vorgänge beeinflusst. Die Betrachtung des Ursache-Wirkung-Prinzips zeigt, dass der QC-Inhibitor zunächst die post-translationale Modifizierung von MCP-1 hemmt, so dass postuliert werden kann, dass die Pankreas-Schädigung und die Zymogen-Aktivierung in diesem Pankreatitis-Modell, zumindest zum großen Teil, durch die Entzündung getriggert wird. Resultierend aus dieser Hypothese besteht die Möglichkeit, durch die QC-Hemmung nicht nur die inflammatorische Kaskade über die Reduktion des MCP-1-Spiegels und dadurch auch anderer möglicher Chemokine und Zytokine zu drosseln, sondern auch die Pankreas-Schädigung abzuschwächen. Zudem wurde bestätigt, dass die Verminderung der Trypsin-Aktivität im Autophagosom erfolgte (Abbildung 41, Caerulein-Experiment 8 h, mit PQ529 Gabe).

Zusammenfassend untermauern die Ergebnisse die in Abbildung 42 aufgezeigten Zusammenhänge und die Relevanz der zugrundeliegenden Mechanismen der Zymogen-Aktivierung, Entzündungsreaktion und Azinuszell-Schädigung in der Pathogenese der akuten Pankreatitis.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Die Reduktion der Entzündung ist die entscheidende Option zur Behandlung einer AP und zwar nicht nur für die Inflammation *per se*, sondern auch für die Pankreas-Schädigung.

Der Einsatz eines effektiven Hemmstoffes für die QC ist aussichtsreich, da:

1. IsoQC ein Enzym ist, das wesentlich an der posttranslationalen Modifikation des pro-inflammatorischen Chemokins MCP-1 beteiligt ist.
2. Im Verlauf einer experimentellen AP die Wirksamkeit der QC-Inhibition auch bei deutlich späterer Gabe von PQ529 noch gegeben ist. Damit erfüllt es die Voraussetzungen eines wirksamen Medikaments in der klinischen Situation.
3. Die Beeinflussung der posttranslationalen Modifikation den Vorteil bietet, dass klinisch zu einem späteren Zeitpunkt der Pankreatitis eingegriffen werden kann und eine Verringerung der MCP1-Konzentration bzw. pro-inflammatorischen Reaktion erzielt wird. Andere Strategien sind dagegen auf eine Verminderung der wirksamen MCP-1-Spiegel durch eine Hemmung der Expression dieses Chemokins ausgerichtet (Synthese-Hemmung).
4. Er spezifisch und effizient die QC-Aktivität hemmt, die potenziell zu einer Verringerung der proteolytischen Stabilität, Verkürzung der Halbwertszeit und/oder verminderten biologischen Wirksamkeit von MCP-1 führen. Daher ist die Wahrscheinlichkeit einer guten therapeutischen Wirkung gegeben.

Durch Nutzung des QC-Inhibitors konnten auch neue Erkenntnisse zur Pathogenese der AP gewonnen werden:

1. Die Trypsinogen-Aktivierung wird durch den QC-Inhibitor PQ529 gehemmt. Dadurch wird gezeigt, dass diese im Verlauf einer AP auftretende frühe unphysiologische Zymogenaktivierung einen deutlichen Anteil an der Azinuszell-Schädigung aufweist.
2. Unter physiologischen Bedingungen ist die QC-Aktivität im Golgi-Apparat des Pankreas lokalisiert und wird dabei hauptsächlich durch IsoQC und nicht durch QC1 repräsentiert.

Ausblick

Es wurde gezeigt, dass bei experimenteller AP die Hemmung der QC zu einer Verminderung der Chemokin- und Zytokin-Produktion, vor allem des MCP-1, und damit zu einer deutlich schwächeren Ausprägung der Erkrankung führte. Damit stellt sich die Frage, ob die Verringerung der Inflammation durch Hemmung der QC auch therapeutisch bei chronischer Pankreatitis eingesetzt werden kann. Die chronische Pankreatitis erfährt in den Industrieländern eine steigende Inzidenz. Zudem tragen die Patienten ein erhöhtes Risiko bei der Entstehung eines Pankreaskarzinoms. Die Konzeption einer Langzeitgabe von QC-Inhibitoren ist attraktiv, da sie keine allgemeine Immunsuppression hervorruft [95]. Damit wäre auch ein klinischer Einsatz bei der chronischen Pankreatitis oder anderen chronischen Entzündungskrankheiten sehr vielversprechend. Erste Ergebnisse belegen, dass eine QC-Inhibition den Verlauf von chronischen Entzündungskrankheiten, bedingt durch Einwanderung von Monozyten, modifiziert werden konnte [168].

Die Verringerung des IL-6-Levels, die durch die Abnahme des NF κ Bs bedingt ist, vermindert das Risiko, an akuter Lungenerkrankung (ALI) zu erkranken und evtl. an den Folgen zu versterben. Die Mortalitätsrate könnte durch eine geeignete Behandlung der AP deutlich verringert werden. Da diese Arbeit gezeigt hat, dass der IL-6-Level abgesenkt wurde, könnte der QC-Inhibitor auch bei ALI unabhängig von der AP in Studien ausgetestet werden.

Es wurde gezeigt, dass die Trypsinogen-Aktivierung durch die QC-Inhibierung gehemmt wird. Damit könnte der QC-Hemmstoff für die Aufklärung der autosomalen Trypsinogen-Aktivierung eingesetzt werden. Offen ist, welche Reaktionswege, die vom extrazellulären Zytokin (TNF- α) in Gang gesetzt werden, zur intrazellulären, autophagosomalen Trypsinogen-Aktivierung führen.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die hauptsächliche Glutaminylyklase-Aktivität von der Isoform IsoQC ausgeht. Deshalb ist bei einem QC1-k.o. keine Veränderung im Vergleich zum WT zu erwarten. Erst durch eine zusätzliche Inaktivierung der Isoform IsoQC, durch den QC-Hemmstoff sind die beschriebenen Ergebnisse zu erwarten. Diese Hypothese konnte bereits durch Becker et al. bestätigt werden, da sie gezeigt haben, dass IsoQC hauptsächlich CCL2 beeinflusst [143]. Zudem haben Sie gezeigt, dass QC1 und IsoQC die einzigen Glutaminylyklasen in Säugetieren sind.

6 Abkürzungsverzeichnis

AK/AB	Antikörper/Antibody
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
AP	Akute Pankreatitis
A β	β -Amyloid-Protein
Boc-Gln-Ala-Arg-AMC	N-tert-Butoxycarbonyl-Glutamin-Alanin-Arginin-7-Amino-4-Methylcoumarin
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrom
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Gln	Glutamin/ Glutamylrest (Gln)
HE	Hämatoxylin/Eosin
HS	Homogenisationslösung
k.o.	knock-out
IL-6	Interleukin-6
i. p.	Intraperitoneal
IsoQC	Iso-Glutaminylylase, Isoform 2
LDL	Low Density Lipoprotein
MCP-1/CCL2	Monocyte Chemoattractant Protein 1/ CC-Chemokine Ligand 2
MOF	multi organ failure, Multiorganversagen
MW	Molekulargewicht

NFκB	Nuclear Factor 'kappa light chain enhancer' of activated B Cells
pGAP	Pyroglutamyl-Aminopeptidase
pGlu, pE	Pyroglutamat
QC1	Glutaminylzyklase, Isoform 1
QC	Glutyminylykolasen
RFU	Relative Fluorescence Units, relative Fluoreszenz-Einheit
rpm	Rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SBTI	Soybean Trypsin Inhibitor, Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TC	Taurocholat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
WT	Wild-Typ

Einige Fachtermini wurden nicht aus dem Englischen übersetzt, da deren Benutzung auch in der deutschsprachigen Literatur etabliert ist.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der biphasischen Krankheitsverläufe und Schweregrade einer AP	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des humanen Pankreas	4
Abbildung 3: Intra- und extrapankreatische Ereignisse in der AP	7
Abbildung 4: Grundlegende Pathomechanismen der Entstehung einer AP	8
Abbildung 5: Proinflammatorische Reize, die auf MCP-1 sezernierende Zellen wirken	10
Abbildung 6: Pankreas-Signalkaskade nach Noxen-Wirkung	13
Abbildung 7: Zyklisierung des Glutamins (N-terminal) zu Pyroglutamat durch Glutaminylzyklase (QC), unter Abspaltung von NH ₃	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Caerulein-/NaCl-Injektion	26
Abbildung 9: Ligatur des Pankreasgangs mittels Aneurysma-Mini-Clips	27
Abbildung 10: Instillation von Trypanblaulösung zur demonstrativen Darstellung in den Pankreasgang	28
Abbildung 11: Schema zur Herstellung der Pankreas-Homogenate zur subzellulären Fraktionierung mit Hilfe der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation	30
Abbildung 12: Darstellung des gekoppelten QC-Assays mit Gln-AMC als Substrat	33
Abbildung 13: Verteilung der QC-Aktivität und der Proteine QC1 und IsoQC in den Fraktionen nach subzellulärer Fraktionierung des Pankreas von QPCT-(„QC1“)-k.o. vs. WT- Kontrollmäusen.	41
Abbildung 14: Verteilung der QC-Aktivität und der Proteine QC1 und IsoQC in den Fraktionen nach subzellulärer Fraktionierung des Pankreas von QPCTL-(„IsoQC“)-k.o. vs. WT-Kontrollmäusen.	41
Abbildung 15: QC-Aktivität im Percoll-Dichtegradienten nach Caerulein-Stimulation	43
Abbildung 16: Stimulus-Sekretions-Kopplung an isolierten Azinuszellen	44
Abbildung 17: Einfluss von PQ529 auf pankreatische Enzyme der Aktivierungskaskade	45

Abbildung 18: Serum-Lipase und -Amylase bei prophylaktischer Applikation von PQ529.....	46
Abbildung 19: Serum-MCP-1 und -IL-6 bei prophylaktischer Applikation von PQ529	47
Abbildung 20: Pankreas-MCP-1- und -IL-6 bei prophylaktischer Applikation von PQ529.....	47
Abbildung 21: Serum-Amylase und -Lipase bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529.....	48
Abbildung 22: Serum-MCP-1 und -IL-6 bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529.....	49
Abbildung 23: Serum-TNF- α bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529.....	49
Abbildung 24: Pankreas-MCP-1 und -IL-6 bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529.....	50
Abbildung 25: Pankreas-TNF- α bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529	50
Abbildung 26: Pankreas-MPO bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529	51
Abbildung 27: HE-Färbung von Pankreas-Schnitten.....	52
Abbildung 28: Auswertung der Histologie bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529.....	52
Abbildung 29: Serum-Amylase und -Lipase bei therapeutischer Applikation (+2 h/+5 h) von PQ529.....	53
Abbildung 30: Serum-Amylase und -Lipase bei therapeutischer Applikation (+4 h/+7 h) von PQ529.....	54
Abbildung 31: Serum-Amylase von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen.....	55
Abbildung 32: Serum-Lipase von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen.....	55
Abbildung 33: Serum-IL-6 von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen	56
Abbildung 34: Serum-MCP-1 von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen	57
Abbildung 35: Auswertung der Histologien von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen.....	57
Abbildung 36: Pankreas-MPO von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen.....	58

Abbildung 37: Pankreas-Trypsin-Aktivität bei prophylaktischer Applikation von PQ529	59
Abbildung 38: Pankreas-Trypsin-Aktivität bei therapeutischer Applikation (+1 h/+5 h) von PQ529	59
Abbildung 39: Pankreas-Trypsin-Aktivität bei therapeutischer Applikation (+4 h/+7 h) von PQ529	60
Abbildung 40: Pankreas-Trypsin-Aktivität von IsoQC-WT- und -k.o.-Mäusen	60
Abbildung 41: Trypsin-Aktivität im Percoll-Dichtegradienten der subzellulären Fraktionen ...	61
Abbildung 42: Erweiterung der Hypothese zu grundlegenden Pathomechanismen der Entstehung einer AP und Effekt des QC-Inhibitors	69

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Von Azinuszellen des Pankreas sezernierte Enzyme und Proteine.....	5
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 3: Geräte.....	19
Tabelle 4: Operationszubehör	20
Tabelle 5: Chemikalien	21
Tabelle 6: Substrate, Enzyme und Inhibitoren	23
Tabelle 7: Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 8: Antikörper für den Western-Blot.....	25
Tabelle 9: Untersuchungsgruppen Taurocholat-induzierte akute Pankreatitis.....	29
Tabelle 10: Reaktions- und Probenlösung für QC-Aktivitätsmessung.....	34
Tabelle 11: Probenansätze zur Bestimmung der QC-Aktivität	34
Tabelle 12: Zusammensetzung für ein diskontinuierliches SDS-PAA-Gel.....	37
Tabelle 13: Probenvorbereitung für Gel-Elektrophorese	37
Tabelle 14: Quantifizierung histologischer Veränderungen im Pankreas [151]	39

9 Literaturverzeichnis

- [1] W. Halangk und M. M. Lerch, „Early events in acute pancreatitis.“ *Gastroenterol Clin North Am* 33, pp. 717-731, 2004.
- [2] B. Göke und C. Belinger, *Gastroenterologie systematisch*, Bremen, 2. Auflage: UNI-MED Verlag AG, 2007, p. 124.
- [3] M. S. Petrov und D. Yadav, „Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis.“ *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 16(3), pp. 175-184, 2019.
- [4] H. Chiari, „Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas.“ *Zeitschrift für Heilkunde* 17, pp. 69-96, 1896.
- [5] M. L. Steer und J. Meldolesi, „The cell biology of experimental pancreatitis.“ *N Engl J Med* 316, pp. 144-150, 1987.
- [6] C. A. Hernández und M. M. Lerch, „Sphincter stenosis and gallstone migration through the biliary tract.“ *Lancet* 341, pp. 1371-1373, 1993.
- [7] J. Maléth, A. Balázs, P. Pallagi, Z. Balla, B. Kui, M. Katona, L. Judák, I. Németh, L. V. Kemény, Z. Rakonczay Jr., V. Venglovecz, I. Földesi, Z. Pető, Á. Somorác, K. Borka, D. Perdomo, G. L. Lukacs, M. A. Gray und S. Monterisi, „M. Zaccolo, M. Sendler, J. Mayerle, J.-P. Kühn, M. M. Lerch und M. Sahin-Tóth, "Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis.“ *Gastroenterology* 148(6), pp. 427-439, 2015.
- [8] W. Steinberg und S. Tenner, „Acute pancreatitis.“ *N Engl J Med* 330, pp. 1198-1210, 1994.

- [9] C. E. Forsmark, S. Swaroop Vege und C. M. Wilcox, „Acute Pancreatitis.“ *N Engl J Med* 375, Nr. 1972-1981, pp. 1972-1981, 2016.
- [10] H. U. Schulz, M. Ebert, T. Manger, G. Weiß und H. Lippert, „Akute Pankreatitis.“ *Viszeralchirurgie* 33, Nr. 96-105, pp. 96-105, 1998.
- [11] M. B. Pepys, „The acute phase response and C-reactive protein,“ Oxford, UK, Oxford University Press:1527–1533, 1995, p. In: Weatherall D. J.; Ledingham J. G. G.; Warrell D. A.; eds. *Oxford Textbook of Medicine*. 2nd ed. .
- [12] S. M. van Dijk, N. D. L. Hallensleben, H. C. van Santvoort, P. Fockens, H. van Goor, M. J. Bruno, B. M. G. und D. P. S. Group, „Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials.“ *Gut* 66, pp. 2024-2032, 2017.
- [13] A. M. Kaiser, A. K. Saluja, A. Sengupta, M. Saluja und M. L. Steer, „Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis.“ *Am J Physiol* 269, pp. C1295-C1304, 1995.
- [14] L. M. Schwartz, S. W. Smith, J. M. E. E. und B. A. Osborne, „Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?“, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, pp. 980-984, 1993.
- [15] L. E. Gerschenson und R. J. Rotello, „Apoptosis: a different type of cell death.“ *FASEB J.* 6, pp. 2450-2455, 1992.
- [16] A. H. Wyllie, J. F. Kerr und A. R. Currie, „Cell death: the significance of apoptosis.“ *Int Rev Cytol* 68, pp. 251-306, 1980.
- [17] J. Mayerle, P. Simon, M. Kraft, T. Meister und M. M. Lerch, „Internistische Therapie der akuten Pankreatitis.“ *Med klin* 98, pp. 744-749, 2003.
- [18] T. H. Baron und D. E. Morgan, „Acute necrotizing pancreatitis.“ *N Engl J Med* 340, pp. 1412-1417, 1999.

- [19] C. M. Pastor und J. L. Frossard, „Are genetically modified mice useful for the understanding of acute pancreatitis.“ *Faseb J* 15, pp. 893-897, 2001.
- [20] K. I. Halonen, V. Pettila, A. K. Leppaniemi, E. A. Kemppainen, P. A. Puolakkainen und R. K. Haapiainen, „Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis.“ *Crit Care Med* 30(6), pp. 1274-1279, 2002.
- [21] D. C. Whitcomb, „Clinical practice. Acute pancreatitis.“ *N Engl J Med* 354(20), pp. 2142-2150, 2006.
- [22] R. S. Hotchkiss, Monneret, G. und D. Payen, „Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy.“ *Nat Rev Immunol* 13, pp. 862-874, 2013.
- [23] R. S. Hotchkiss, Monneret, G. und D. Payen, „Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach.“ *Lancet Infect Dis* 13, pp. 260-268, 2013.
- [24] A. Dummer, F. U. Weiss, M. Sendler, C. Pötschke, T. Sparwasser, W. Halangk, B. M. Bröker, M. M. Lerch und J. Mayerle, „Regulatorische T-Zellen vermitteln das kompensatorische Anti-Inflammations-Syndrom (CARS) in der schweren akuten Pankreatitis.“ *Z Gastroenterol* 48, p. 571, 2010.
- [25] M. Jaakkola und I. Nordback, „Pancreatitis in Finland between 1970 and 1989.“ *Gut* 34(9), pp. 1255-1260, 1993.
- [26] C. S. Pitchumoni, N. M. Patel und P. Shah, „Factors influencing mortality in acute pancreatitis: can we alter them?“ *J Clin Gastroenterol* 39(9), pp. 798-814, 2005.
- [27] S. Bank, P. Singh, N. Pooran und B. Stark, „Evaluation of factors that have reduced mortality from acute pancreatitis over the past 20 years.“ *J Clin Gastroenterol* 35(1), pp. 50-60, 2002.

- [28] E. Bücheler, K. J. Lackner und M. Thelen, Einführung in die Radiologie: Diagnostik und Interventionen., Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 11. Auflage, 2006.
- [29] J. Dolenšek, M. S. Rupnik und A. Stožer, „Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas.,“ *Islets* 7(1), p. 1024405, 2015.
- [30] U. R. Fölsch, T. Arendt, K. H. Herzig, V. Keim, K. Kiehne, C. Löser, J. Mössner und J. M. S. F. Otte, Diagnostik und Therapie akuter und chronischer entzündlicher Pankreaserkrankungen., Bremen: Uni-Med Verlag AG, 1. Auflage, 1999.
- [31] G. Palade, „Intracellular aspects of the process of protein synthesis.,“ *Science* 189, pp. 347-358, 1975.
- [32] J. Mayerle, M. Sendler, E. Hegyi, G. Georg Beyer, M. M. Lerch und M. Sahin-Tóth, „Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis.,“ *Gastroenterology* 156(7), pp. 1951-1968, 2019.
- [33] H. Rinderknecht, „Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation.,“ *Dig Dis Sci* 31, pp. 314-321, 1986.
- [34] L. A. Kazal, S. D. S. und B. R. A., „Isolation of a crystalline trypsin inhibitoranticoagulant protein from pancreas.,“ *J Am Chem Soc* 70, pp. 3034-3040, 1948.
- [35] F. U. Weiss, P. Simon, H. Witt, J. Mayerle, V. Hlouschek, K. P. Zimmer, J. Schnekenburger, W. Domschke, J. P. Neoptolemos und M. M. Lerch, „SPINK1 mutations and phenotypic expression in patients with pancreatitis associated with trypsinogen mutations.,“ *J Med Genet* 40(4), p. e40, 2003.
- [36] H. Goebell, „The role of calcium in pancreatic secretion and disease.,“ *Acta Hepatogastroenterol* 23, pp. 151-161, 1976.

- [37] A. K. Saluja, S. Hashimoto, M. Saluja, R. E. Powers, J. Meldolesi und M. L. Steer, „Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis.“ *Am J Physiol* 253, pp. G508-G516, 1987.
- [38] M. Bhatia, F. L. Wong, Y. Cao, H. Y. Lau, J. Huang, P. Puneet und L. Chevali, „Pathophysiology of Acute Pancreatitis.“ *Pancreatology* 5, pp. 132-144, 2005a.
- [39] J. L. Frossard, A. Saluja, L. Bhagat, H. S. Lee, M. Bhatia, B. Hofbauer und M. L. Steer, „The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury.“ *Gastroenterology* 116, pp. 694-701, 1999.
- [40] B. Poch, F. Gansauge, B. Rau, U. Wittel, S. Gansauge, A. K. Nussler, M. Schoenberg und H. G. Beger, „The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation.“ *FEBS Lett* 461, pp. 268-272, 1999.
- [41] B. Vollmar und M. D. Menger, „Microcirculatory dysfunction in acute pancreatitis. A new concept of pathogenesis involving vasomotion-associated arteriolar constriction and dilation.“ *Pancreatology* 3, pp. 181-190, 2003.
- [42] G. J. Van Acker, E. Weiss, M. L. Steer und G. Perides, „Cause-effect relationships between zymogen activation and other early events in secretagogue-induced acute pancreatitis.“ *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(6), pp. G1738-G1746, 2007.
- [43] R. Makhija und A. N. Kingsnorth, „Cytokine storm in acute pancreatitis.“ *J Hepatobil Pancreat Surg* 9(4), pp. 401-410, 2002.
- [44] R. P. Sah und A. K. Saluja, „Molecular mechanisms of pancreatic injury.“ *Curr Opin Gastroenterol* 27, pp. 444-451, 2011.
- [45] J. B. Ward, R. J. S. A. Sutton und O. H. Petersen, „Progressive disruption of acinar cell calcium signaling is an early feature of cerulein-induced pancreatitis in mice.“ *Gastroenterology* 111, pp. 481-491, 1996.

- [46] B. Krüger, M. M. Lerch und W. Tessenow, „Direct detection of premature proteases activation in living pancreatic acinar cells.“ *Lab Invest* 78, pp. 763-764, 1998.
- [47] B. Krüger, E. Albrecht und M. M. Lerch, „The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis.“ *Am J Pathol* 157, pp. 43-50, 2000.
- [48] B. Hofbauer, A. K. Saluja, M. M. Lerch, L. Bhagat, M. Bhatia, H. S. F. J. L. Lee, G. Adler und M. L. Steer, „Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats.“ *Am J Physiol* 275, pp. G352-G362, 1998.
- [49] T. Otani, S. M. Chepilko, J. H. Grendell und F. S. Gorelick, „Codistribution of TAP and the granule membrane protein GRAMP-92 in rat caerulein-induced pancreatitis.“ *Am J Physiol* 275, pp. G999-G1009, 1998.
- [50] O. Gryshchenko, L. V. Gerasimenko, S. Shuang Peng, O. V. Gerasimenko und O. H. Petersen, „Calcium signalling in the acinar environment of the exocrine pancreas: physiology and pathophysiology.“ *J Physiol* 596 (14), pp. 2663-2678, 2018.
- [51] T. Grady, M. Mah'moud, T. Otani, S. Rhee, M. M. Lerch und F. S. Gorelick, „Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury.“ *Am J Physiol* 275, pp. G1010-G1017, 1998.
- [52] W. Halangk, M. M. Lerch, B. Brandt-Nedelev, W. Roth, M. Ruthenbuerger, T. Reinheckel, W. Domschke, H. Lippert, C. Peters und J. Deussing, „Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis.“ *J Clin Invest* 106, pp. 773-781, 2000.
- [53] M. Sendler, S. Maertin, D. John, M. Persike, F. U. Weiss, B. Krüger, T. Wartmann, P. Wagh, W. Halangk, N. Schaschke, J. Mayerle und M. M. Lerch, „Cathepsin B Activity Initiates Apoptosis via Digestive Protease Activation in Pancreatic Acinar Cells and Experimental Pancreatitis.“ *J Biol Chem* 291(28), pp. 14717-14731, 2016.

- [54] A. Geisz und M. Sahin-Tóth, „A preclinical model of chronic pancreatitis driven by trypsinogen autoactivation.“ *Nat Commun* 9, p. 5033, 2018.
- [55] J. Mayerle, S. R. Malla, M. Sendler, M. Ruthenbürger, F. U. Weiss und M. M. Lerch, „Die Rolle der Autophagie für den Verlauf der akuten Pankreatitis - Freund oder Feind?“, *Z Gastroenterol* 46, p. P173, 2008.
- [56] J. Mayerle, S. R. Malla, B. Krüger, T. Wartmann, M. Sendler, F. U. Weiss, W. Halangk und M. M. Lerch, „Autophagie ist weder eine Voraussetzung noch eine Folge der frühen Trypsin-Aktivierung in der Pankreatitis.“ *Z Gastroenterol* 48, p. P562, 2010.
- [57] K. N. Diakopoulos, M. Lesina, S. Wörmann, L. Song, M. Aichler, L. Schild, A. Artati, W. Römisch-Margl, T. Wartmann, R. Fischer, Y. Kabiri, H. Zischka, W. Halangk, I. E. Demir, C. Pilsak, A. Walch, C. S. Mantzoros und J. M. Steiner, „ M. Erkan, R.M. Schmid, H. Witt, J. Adamski, H. Algül, "Impaired autophagy induces chronic atrophic pancreatitis in mice via sex- and nutrition-dependent processes," *Gastroenterology* 148(3), pp. 626-638, 2015.
- [58] N. Mizushima und M. Komatsu, „Autophagy: Renovation of Cells and Tissues,“ *Cell* 147, pp. 728-741, 2011.
- [59] A. K. Saluja und M. L. Steer, „Pathophysiology of pancreatitis. Role of cytokines and other mediators of inflammation.“ *Digestion* 60, pp. 27-33, 1999.
- [60] H. Algül, M. Treiber, M. Lesina, H. Nakhai, D. Saur, F. Geisler, A. Pfeifer, S. Paxian und R. M. Schmid, „Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis.“ *J Clin Invest* 117, pp. 1490-1501, 2007.
- [61] I. Gukovsky, A. S. Gukovskaya, T. A. Blinman, V. Zaninovic und S. J. Pandol, „Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis.“ *Am J Physiol* 275(6), pp. G1402-G1414, 1998.

- [62] M. Treiber, P. Neuhöfer, E. Anetsberger, H. Einwächter, M. Lesina, M. Rickman, S. Liang, T. Kehl, H. Nakhai, R. M. Schmid und H. Algül, „Myeloid, but not pancreatic, RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis.“ *Gastroenterology* 141, pp. 1473-1485, 2011.
- [63] M. Sandler, A. Dummer, F. U. Weiss, B. Krüger, T. Wartmann, K. Scharffetter-Kochanek, N. V. Rooijen, S. R. Malla, A. Aghdassi, W. Halang, M. M. Lerch und J. Mayerle, „Tumour necrosis factor a secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice.“ *Gut* 62(3), pp. 430-439, 2013.
- [64] A. S. Gukovskaya, I. Gukovsky, V. Zaninovic, M. Song, D. Sandoval, S. Gukovsky und S. J. Pandol, „Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis.“ *J Clin Invest* 100, pp. 1853-1862, 1997.
- [65] R. M. Strieter, S. L. Kunkel und R. C. Bone, „Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation.“ *Crit Care Med* 21, pp. S447-S463, 1993.
- [66] B. Rau, K. Baumgart, C. M. Kruger, M. Schilling und H. G. Beger, „CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications.“ *Int Care Med* 29, pp. 622-629, 2003.
- [67] M. Bhatia, M. Brady, Y. Kyung Kang, E. Costello, D. J. Newton, S. Christmas, J. P. Neoptolemos und J. Slavin, „MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation.“ *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, pp. G77-G85, 2002.
- [68] M. O. Osman, B. Gesser, J. T. Mortensen, K. Matsushima, S. L. Jensen und C. G. Larsen, „Profiles of proinflammatory cytokines in the serum of rabbits after experimentally induced acute pancreatitis.“ *Zytokine* 17(1), pp. 53-59, 2002.

- [69] M. Brady, M. Bhatia, S. Christmas, M. T. Boyd, J. P. Neoptolemos und J. Slavin, „Expression of the Chemokines MCP-1/JE and Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant in Early Acute Pancreatitis.“ *Pancreas* 25(3), pp. 260-269, 2002.
- [70] G. I. Papachristou, D. A. Sass, H. Avula, J. Lamb, A. Lokshin, M. M. Barmada, A. Slivka und D. C. Whitcomb, „Is monocyte chemotactic protein-1 -2518G allele a risk factor for severe acute pancreatitis?“, *Clin Gastroenterol Hepatol* 3, pp. 475-481, 2005.
- [71] B. J. Rollins, „Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease.“ *Mol Med Today* 2, pp. 198-204, 1996.
- [72] L. Piemonti, B. E. Leone, R. Nano, A. Sacconi, P. Monti, P. Maffi, G. Bianchi, A. Sica, G. Peri, R. Melzi, L. Aldrighetti, A. Secchi, V. Di Carlo, P. Allavena und F. Bertuzzi, „Human Pancreatic Islets Produce and Secrete MCP-1/CCL2: Relevance in Human Islet Transplantation.“ *Diabetes* 51, pp. 55-65, 2002.
- [73] M. W. Carr, S. I. Roth, E. Luther, S. S. Rose und T. A. Springer, „Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9), pp. 3652-3656, 1994.
- [74] R. Alam, M. A. Lett-Brown, P. A. Forsythe, D. I. Anderson-Walters, C. Kenamore, C. Kormos und I. A. Grant, „Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for basophils.“ *J Clin Invest* 89, pp. 723-728, 1992.
- [75] K. Matsushima, C. G. Larsen, G. C. DuBois und J. J. Oppenheim, „Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.“ *J Exp Med* 169, pp. 1485-1490, 1989.
- [76] M. Gschwandtner, R. Derler und K. S. Midwood, „More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond.“ *Front. Immunol.* 10, p. 2759, 2019.

- [77] B. J. Rollins, T. Yoshimura, E. J. Leonard und J. S. Pober, „Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE.,“ *Am J Pathol* 136, pp. 1229-1233, 1990.
- [78] J. N. Barker, M. L. Jones, C. L. Swenson, V. Sarma, R. S. Mitra, P. A. Ward, K. J. Johnson, V. M. Fantone und B. J. Nickolof, „Monocytes chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN-gamma.,“ *J Immunol* 146, pp. 1192-1998, 1991.
- [79] W. Prodjosudjadi, J. S. Gerritsma, N. Klar-Mohamad, A. F. Gerritsen, J. A. Bruijn, M. R. Daha und L. A. van Es, „Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells.,“ *Kidney Int* 48, pp. 1477-1486, 1995.
- [80] B. H. Rovin, T. Yoshimura und L. Tan, „Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells.,“ *J Immunol* 148, pp. 2148-2153, 1992.
- [81] J. M. Wang, A. Sica, G. Peri, S. Walter, I. M. Padura, P. Libby, M. Ceska, I. Lindley, F. Collotta und A. Mantovani, „Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells.,“ *Arterioscler Thromb* 11, pp. 1166-1174, 1991.
- [82] T. Yoshimura, N. Yuhki, S. K. Moore, E. Appella, M. I. Lerman und E. J. Leonard, „Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE.,“ *FEBS Lett* 244, pp. 487-493, 1989.
- [83] B. S. Mulholland, M. R. Forwood und N. A. Morrison, „Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) Drives Activation of Bone Remodelling and Skeletal Metastasis.,“ *Current Osteoporosis Reports* 17, pp. 538 - 547, 2019.

- [84] J. R. Harrington, „The role of MCP-1 in atherosclerosis.,“ *Stem Cells* 18 (1), pp. 65-66, 2000.
- [85] D. J. Mahad und R. M. Ransohoff, „The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).“, *Seminars in Immunology* 15 (1), pp. 23-32, 2003.
- [86] C. Szalai, G. T. Kozma, A. Nagy, A. Bojszkó, D. Krikovszky, T. Szabo und A. Falus, „Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity.,“ *J Allergy Clin Immunol* 108, pp. 375-381, 2001.
- [87] A. Stankovic, V. Slavic, B. Stamenkovic, B. Kamenov, M. Bojanovic und D. Mitrovic, „Serum and synovial fluid concentrations of CCL2 (MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoid arthritis and osteoarthritis reflect disease activity.,“ *Bratisl. Lek. Listy*. 110, pp. 641-646, 2009.
- [88] B. Lu, B. J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo und N. W. Lukacs, „Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice.,“ *J Exp Med* 187, pp. 601-608, 1998.
- [89] A. D. Luster, „Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation.,“ *N Engl J Med* 338, pp. 436-445, 1998.
- [90] P. K. Peterson, S. Hu, J. Salak-Johnson und T. W. C. C. Molitor, „Differential production of and migratory response to beta chemokines by human microglia and astrocytes.,“ *J Infect Dis* 175, pp. 478-481, 1997.
- [91] N. Kanemitsu, F. Fumiko Kiyonaga, K. Mizukami, K. Maeno, T. Nishikubo, H. Yoshida und H. Ito, „Chronic treatment with the (iso-)glutaminyl cyclase inhibitor PQ529 is a novel and effective approach for glomerulonephritis in chronic kidney disease.,“ *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 394, pp. 751-761, 2021.

- [92] M. Bhatia, J. P. Neoptolemos und J. Slavin, „Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis.“ *Curr Opin Investig Drugs* 2, pp. 496-501, 2001.
- [93] M. Bhatia, C. Landolfi, F. Basta, G. Bovi, R. Devi Ramnath, A. Capezzone de Joannon und A. Guglielmotti, „Treatment with bindarit, an inhibitor of MCP-1 synthesis, protects mice against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis.“ *Inflamm Res* 57, pp. 464-471, 2005b.
- [94] H. F. Zhao, T. Ito, J. Gibo, K. K., T. Oono, T. Kaku, Y. Arita, Q. W. Zhao, M. Usui, K. Egashira und H. Nawata, „Anti-monocyte chemoattractant protein 1 gene therapy attenuates experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride in rats.“ *Gut* 54, pp. 1759-1767, 2005.
- [95] H. Cynis, T. Hoffmann, D. Friedrich, A. Kehlen, K. Gans, M. Kleinschmidt, J. U. Rahfeld, R. Wolf, M. Wermann, A. Stephan, M. Haegele, R. Sedlmeier, S. Graubner, W. Jagla, A. Müller, R. Eichentopf, U. Heiser, F. Seifert und P. H. A. Quax, „The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions.“ *EMBO Molecular Medicine* 3, pp. 545-558, 2011.
- [96] S. Schilling, T. M. S. Hoffmann, M. Hoffmann und H. U. Demuth, „Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions.“ *FEBS Lett* ,563(1-3), pp. 191-196, 2004a.
- [97] J. Gong und I. Clark-Lewis, „Antagonists of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Identified by Modification of Functionally Critical NH₂-terminal Residues.“ *J Exp Med* 181, pp. 631-640, 1995.
- [98] Y.-. L. Chen, K.-. F. Huang, W.-. C. Kuo, Y.-. C. Lo, Y.-. M. Lee und A. H.-. J. Wang, „Inhibition of glutaminyl cyclase attenuates cell migration modulated by monocyte chemoattractant proteins.“ *Biochem. J.* 442, pp. 403-412, 2012.
- [99] W. Uhl, A. Warshaw, C. Imrie, C. Bassi, C. J. McKay, P. G. Lankisch, R. Carter, E. Di Magno, P. A. Banks, D. C. Whitcomb, C. Dervenis, C. D. Ulrich, K. Satake, P. Ghaneh,

- W. Hartwig, J. Werner, G. McEntee, J. P. Neoptolemos und M. Büchler, „IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis.,” *Pancreatology* 2, pp. 565-573, 2002.
- [100] M. Bhatia, M. Brady, S. Shokuhi, S. Christmas, J. P. Neoptolemos und J. Slavin, „Inflammatory mediators in acute pancreatitis.,” *J Pathol* 190, pp. 117-125, 2000.
- [101] M. Shimada, A. Andoh, K. Hata, K. Tasaki, Y. Araki, Y. Fujiyama und T. Bamba, „IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators.,” *J Immunol* 168, pp. 861-868, 2002.
- [102] R. Pezzilli, R. Miniero, O. Cappelletti und B. Barakat, „Serum interleukin 6 in the prognosis of acute biliary pancreatitis.,” *Ital J Gastroenterol Hepatol* 30, pp. 291-294, 1998.
- [103] S. Suzuki, K. Miyasaka, A. Jimi und A. Funakoshi, „Induction of acute pancreatitis by cerulein in human IL-6 gene transgenic mice.,” *Pancreas* 21, pp. 86-92, 2000.
- [104] H. Zhang, P. Neuhöfer, L. Song, B. Rabe, M. Lesina, M. U. Kurkowski, M. Treiber, T. Wartmann, S. Regnér, H. Thorlacius, D. Saur, G. Weirich, A. Yoshimura, W. Halangk, J. P. Mizegerd, R. M. Schmid, S. Rose-John und H. Algül, „IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality.,” *J Clin Invest* 123(3), pp. 1019-1031, 2013.
- [105] M. L. Scott, T. Fujita, H. C. Liou, G. P. Nolan und D. Baltimore, „The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms.,” *Genes Dev* 7(7A), pp. 1266-1276, 1993.
- [106] M. S. Hayden und S. Ghosh, „Signaling to NF-kB.,” *Genes Dev* 18, pp. 2195-2224, 2004.
- [107] P. A. Baeuerle und D. Baltimore, „Molecular Aspects of Cellular Regulation, Hormonal Control Regulation of Gene Transcription.,” *Elsevier/North Holland Biomedical Press*,

- Amsterdam pp.*, Bde. %1 von %2Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam pp., pp. 409-432, 1991.
- [108] M. M. Lerch und G. Adler, „Experimental animal models of acute pancreatitis.“ *Int J Pancreatol* 15, pp. 159-170, 1994.
- [109] H. J. Aho, S. M. Koskensalo und T. J. Nevalainen, „Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis.“ *Scand J Gastroenterol* 15, pp. 411-416, 1980 a.
- [110] H. J. Aho, T. J. Nevalainen, R. L. Lindberg und A. J. Aho, „Experimental pancreatitis in the rat. The role of phospholipase A in sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis.“ *Scand J Gastroenterol* 15, pp. 1027-1031, 1980 b.
- [111] H. J. Aho, T. J. Nevalainen und A. J. Aho, „Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischaemia and oedema after intraductal sodium taurocholate injection.“ *Eur Surg Res* 15, pp. 28-36, 1983.
- [112] R. Mantke, D. Schubert, C. Röcken, I. Paege, W. Halangk, B. Peters, H. Lippert und H. U. Schulz, „Caerulein or taurocholate induced enzymatic and histologic alterations in the isolated perfused rat pancreas.“ *Langenbecks Arch Surg* 394, pp. 363-369, 2009.
- [113] K. Heinkel, „Die Ratte als Versuchstier in der experimentellen Pankreasdiagnostik. II. Mitteilung. Die Erzeugung einer akuten hämorrhagischen Pankreatitis durch Injektion von Gallensäure in den Ductus pancreaticus.“ *Klin Wochenschr* 31, p. 815, 1953.
- [114] P. Lankisch, K. Winckler, M. Bokermann, H. Schmidt und W. Creutzfeldt, „The influence of glucagon on acute experimental pancreatitis in the rat.“ *Scand J Gastroenterol* 9, pp. 725-729, 1974.
- [115] J. M. Laukkarinen, G. J. Van Acker, E. R. Weiss, M. L. Steer und G. Perides, „A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholol.“ *Gut* 56, pp. 1590-1598, 2007.

- [116] J. Schmidt, D. W. Rattner, K. Lewandrowski, C. C. Compton, U. Mandavilli, W. T. Knoefel und A. L. Warshaw, „A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy.,“ *Ann Surg* 215, pp. 44-56 , 1992.
- [117] G. Adler, A. Mullenhoff, I. Koop, T. Bozkurt, B. Goke, C. Beglinger und R. Arnold, „Stimulation of pancreatic secretion in man by a protease inhibitor (carnostate).“, *European Journal of Clinical Investigation* 18, pp. 98-104, 1988.
- [118] J. V. Gerasimenko, O. V. Gerasimenko und O. H. Petersen, „The role of Ca²⁺ in the pathophysiology of pancreatitis.,“ *J Physiol* 592, pp. 269-280, 2014.
- [119] A. K. Saluja, M. Saluja, H. Printz, A. Zaverchnik, A. Sengupta und M. L. Steer, „Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion (lysosomes/cathepsin B/exocrine secretion).“, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, pp. 8968-8971, 1989.
- [120] C. Niederau, L. D. Ferrell und J. H. Grendell, „Experimentelle akute Pankreatitis.,“ *Internist* 27, pp. 681-696, 1986.
- [121] S. P. Ding, J. Li und C. Jin, „A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide.,“ *World J Gastroenterol* 9(3), pp. 584-589, 2003.
- [122] M. Y. Gololobov, I. Song, W. Wang und R. C. J. Bateman, „Steady-state kinetics of glutamine cyclotransferase.,“ *Arch Biochem Biophys* 309, pp. 300-307, 1994.
- [123] M. Messer, „Enzymatic cyclization of L-glutamine and L-glutaminy peptides.,“ *Nature* 197, p. 1299, 1963.
- [124] T. Pohl, M. Zimmer, K. Mugele und J. Spiess, „Primary structure and functional expression of aglutaminy cyclase.,“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, pp. 10059-10063, 1991.

- [125] S. Schilling, A. J. Niestroj, J. U. Rahfeld, T. Hoffmann, M. Wermann, K. Zunkel, C. Wasternack und H. U. Demuth, „Identification of Human Glutaminyl Cyclase as a Metalloenzyme. Potent inhibition by imidazole derivatives and heterocyclic chelators.,“ *J Biol Chem* 278, pp. 49773-49779, 2003b.
- [126] W. H. Fischer und J. Spiess, „Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides.,“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, pp. 3628-3632, 1987.
- [127] W. H. Busby, J. Humm, J. S. Kizer, W. W. Youngblood und G. E. Quackenbush, „An enzyme(s) that converts glutaminyl-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes.,“ *J Biol Chem* 262, pp. 8532-8536, 1987.
- [128] I. Song, C. Z. Chuang und J. R. C. Bateman, „Molecular cloning, sequence analysis and expression of human pituitary glutaminyl cyclase.,“ *J Mol Endocrinol* 13, pp. 77-86, 1994.
- [129] J. Temple, I. Song, K. H. Burns und R. C. Bateman, „Absence of an Essential Thiol in Human Glutaminyl Cyclase: Implications for Mechanism.,“ *Korean J Biol Sci* 2, pp. 243-248, 1998.
- [130] S. Schilling, S. Manhart, T. Hoffmann, H. H. Ludwig, C. Wasternack und H. U. Demuth, „Substrate Specificity of GlutaminylCyclase from Plants and Animals.,“ *Biol Chem* 384, pp. 1583-1592, 2003a.
- [131] R. E. Booth, S. C. Lovell, S. A. Misquitta und R. C. Bateman, „Human glutaminylcyclase and bacterial zinc aminopeptidase share a common fold and active site.,“ *BioMedCentral Biology* 2, p. 2, 2004.
- [132] A. Kehlen, M. Haegle, L. Böhme, H. Cynis, T. Hoffmann und H. U. Demuth, „N-terminal pyroglutamate formation in CX3CL1 is essential for its full biologic activity.,“ *Biosci Rep*.37(4). , 2017.

- [133] H. Cynis, J. U. Rahfeld, A. Stephan, A. Kehlen, B. Koch, M. Wermann, H. U. Demuth und S. Schilling, „Isolation of an Isoenzyme of Human Glutaminy Cyclase: Retention in the Golgi Complex Suggests Involvement in the Protein Maturation Machinery.,“ *J Mol Biol* 379, pp. 966-980, 2008.
- [134] M. Hartlage-Rübsamen, A. Waniek, J. Meissner, M. Morawski, S. Schilling, C. Jäger, M. Kleinschmidt, H. Cynis, A. Kehlen, T. Arendt, H. U. Demuth und S. Rossner, „Isoglutaminy cyclase contributes to CCL-2 driven neuroinflammation in Alzheimer's disease.,“ *Acta Neuropathol* ,129(4), pp. 565-583, 2015.
- [135] P. A. Sykes, S. J. Watson, J. S. Temple und R. C. J. Bateman, „Evidence for tissue-specific forms of glutaminy cyclase.,“ *FEBS Lett* 455, pp. 159-161, 1999.
- [136] F. M. Batliwalla, E. C. Baechler, X. Xiao, W. Li, S. Balasubramanian, H. Khalili, A. Damke, W. A. Ortmann, A. Perrone, A. B. Kantor, P. S. Gulko, M. Kern, R. Furie, T. W. Behrens und P. K. Gregersen, „Peripheral blood gene expression profiling in rheumatoid arthritis.,“ *Genes Immun* 6(5), pp. 388-397, 2005.
- [137] Y. Ezura, M. Kajita, R. Ishida, S. Yoshida, H. Yoshida, T. Suzuki, T. Hosoi, S. Inoue, M. Shiraki, H. Orimi und M. Emi, „Association of multiple nucleotide variations in the pituitary glutaminy cyclase gene (QPCT) with low radial BMD in adult women.,“ *J Bone Miner Res* 19, pp. 1296-1301, 2004.
- [138] T. C. Saido, T. Iwatsubo, D. M. Mann, H. Shimada, Y. Ihara und S. Kawashima, „Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques.,“ *Neuron* 14, pp. 457-466, 1995.
- [139] Y. M. Kuo, M. R. Emmerling, A. S. Woods, R. J. Cotter und A. E. Roher, „Isolation, Chemical Characterization, and Quantitation of Ab 3-Pyroglutamyl Peptide from Neuritic Plaques and Vascular Amyloid Deposits.,“ *Biochem Biophys Res Commun* 237, pp. 188-191, 1997.

- [140] C. Russo, E. Violani, S. Salis, V. Venezia, V. Dolcini, G. Damonte, U. Benatti, C. D'Arrigo, E. Patrone, P. Carlo und G. Schettini, „Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival.,“ *J Neurochem* 82, pp. 1480-1489, 2002.
- [141] K. Huang, S. Liaw, W. Huang, C. Chia, Y. Lo, Y. Chen und A. Wang, „Structures of Human Golgi- resident Glutaminy Cyclase and Its Complexes with Inhibitors Reveal a Large Loop Movement upon Inhibitor Binding.,“ *J Biol Chem*, 286(14), pp. 12439-12444, 2011.
- [142] S. Schilling, S. Kohlmann, C. Bäuscher, R. Sedlmeier, B. Koch, R. Eichentopf, A. Becker, C. Cynis, T. Hoffmann, S. Berg, F. E. J., S. von Hörsten, S. Rossner, S. Graubner und H. U. Demuth, „Glutaminy cyclase knock-out mice exhibit mild hypothyroidism but no hypogonadism: implications for enzyme function and drug development.,“ *J Biol Chem* 286(16), pp. 14199-14208, 2011.
- [143] A. Becker, R. Eichentopf, R. Sedlmeier, A. Waniek, H. Cynis, B. Koch, A. Stephan, C. Bäuscher, S. Kohlmann, T. Hoffman, A. Kehlen, S. Berg, E. Freyse, A. Osmand, A. Plank, S. Roßner, S. von Hörsten, S. Graubner, H. Demuth und S. Schilling, „IsoQC(QPCTL) knock-out mice suggest differential substrate conversion by glutaminy cyclase isoenzymes.,“ *Biol Chem* ,397(1), pp. 45-55, 2016.
- [144] G. N. Abraham und D. N. Podell, „Pyroglutamic acid. Non-metabolic formation, function in proteins and peptides, and characteristics of the enzymes effecting its removal.,“ *Mol Cell Biochem* 38 Spec No, pp. 181-190, 1981.
- [145] C. Moret und M. Briley, „The "forgotten" amino acid pyroglutamate.,“ *Trends Pharmacol Sci* 9, pp. 278-279, 1988.
- [146] H. Schägger und G. V. Jagow, „Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrohoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDA.,“ *Anal Biochem* 166, pp. 368-379, 1987.

- [147] S. Schilling und H. U. Demuth, „Continuous assays of glutaminyl cyclase: From development to application,“ *Spectroscopy, in press*, 2004b.
- [148] S. Schilling, T. Hoffmann, M. Wermann, U. Heiser, C. Wasternack und H. U. Demuth, „Continuous spectrometric assays for glutaminyl cyclase activity.,“ *Anal. Biochem.*, Bd. 303, pp. 49-56, 2002.
- [149] U. K. Laemmli, „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.,“ *Nature* 227, pp. 680-685, 1970.
- [150] H. Towbin, T. Staehelin und J. Gordon, „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.,“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, pp. 4350-4354, 1979.
- [151] H. Spormann, A. Sokolowski und C. Letko, „Effect of temporary ischemia upon development and histological pattern of acute pancreatitis in the rat.,“ *Pathol Res Pract* 184, pp. 507-513, 1989.
- [152] I. A. Weber, I. Buchwalow, D. Hahn, W. Domschke, M. M. Lerch und J. Schnekenburger, „The potential role of kinesin and dynein in Golgi scattering and cytoplasmic vacuole formation during acute experimental pancreatitis.,“ *Cell Research* 20, pp. 599-602, 2010.
- [153] M. Sendler und M. M. Lerch, „Zelluläre Pathomechanismen.,“ *J. Gastroenterol. Hepatol. Erkr.* 18, pp. 102-109, 2020.
- [154] P. G. Lankisch und M. W. Büchler, „Akute Pankreatitis. Update: Diagnostik und Therapie 2000.,“ *Dt Ärztebl* 97, pp. A2106-A2112, 2000.
- [155] F. Larsen, D. Schlarman, C. C. Andrus und D. L. Kaminski, „The effect of the CCK receptor antagonist CR 1409 on bile reflux pancreatitis in the opossum.,“ *Pancreas* 6(3), pp. 291-297, 1991.

- [156] M. J. Knight, J. R. Condon und R. Smith, „Use of Glucagon in the Treatment of Pancreatitis.," *Br Med J* 1971 2(5759), pp. 440-442, 1971.
- [157] H. T. Debas, R. J. Hancock, P. Soon-Shiong, H. A. Smythe und M. M. Cassim, „Glucagon therapy in acute pancreatitis: prospective randomized double-blind study.," *Can J Surg* 23(6), pp. 578-580, 1980.
- [158] E. F. Coelle, I. L. Taylor, K. Lewin und N. Adham, „Beneficial effect of pancreatic polypeptide in experimental pancreatitis.," *Dig Dis Sci* 28(12), pp. 1083-1088, 1983.
- [159] M. Esrefoglu, „Experimental and clinical evidence of antioxidant therapy in acute pancreatitis.," *World J Gastroenterol* 18(39), pp. 5533-5541, 2012.
- [160] M. Büchler, P. Malfertheiner, W. Uhl, J. Schölmerich, F. Stöckmann, G. Adler, W. Gaus, K. Rolle und H. G. Berger, „Gabexate Mesilate in Human Acute Pancreatitis.," *Gastroenterology* 104, pp. 1165-1170, 1993.
- [161] J. Schölmerich, *Medizinische Therapie in Klinik und Praxis.*, Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2003.
- [162] M. Bhatia und S. Moochhala, „Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome.," *J Pathol* 202, pp. 145-156, 2004.
- [163] G. Malleo, E. Mazzon, A. K. Siriwardena und S. Cuzzocrea, „TNF- α as a therapeutic target in acute pancreatic – lessons from experimental models.," *The Scientific World Journal* 7, pp. 431-448, 2007.
- [164] C. Daly und B. J. Rollins, „Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies.," *Microcirculation* 10, pp. 247-257, 2003.

- [165] D. Closa, L. Sabater, L. Fernandez-Cruz, N. Prats, E. Gelpí und J. Roselló-Catafau, „Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver.“ *Ann Surg* 229, pp. 230-236, 1999.
- [166] F. Seifert, K. Schulz, B. Koch, S. Manhart, H. U. Demuth und S. Schilling, „Glutaminyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutaminyl substrates.“ *Biochemistry* ,48(50), pp. 11831-11833, 2009.
- [167] A. S. Gukovskaya und I. Gukovsky, „Autophagy and pancreatitis.“ *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303(9), pp. G993-G1003, 2012.
- [168] H. Cynis, A. Kehlen, M. Haegele, T. Hoffmann, U. Heiser, M. Fujii, Y. Shibazaki, H. Yoneyama, S. Schilling und H. U. Demuth, „Inhibition of Glutaminyl Cyclases alleviates CCL2-mediated inflammation of non-alcoholic fatty liver disease in mice.“ *Int J Exp Pathol* 94, pp. 217-225, 2013.

Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Schönebeck, 30.08.2021

Carina De Boni