

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Die Bedeutung von Proteasen bei altersbedingten Prozessen

verfasst von | submitted by

Maisam Aftab BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik

Mitbetreut von | Co-Supervisor:

Dr. Mohammed Aufy

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik und bei Dr. Mohammed Aufy für deren Unterstützung beim Schreiben meiner Masterarbeit bedanken. Ich bin sehr dankbar, dass ich die Gelegenheit hatte mich mit diesem Thema, an dem aktuell sehr viel geforscht wird, auseinandersetzen zu dürfen.

Ich bin auch sehr dankbar für meine Freunde, Familie und alle weiteren Angehörige, die mir während der letzten Semester stets zugehört, mich während stressigen Phasen aufgebaut und grenzenlos motiviert haben.

Kurzfassung

Zu Beginn meiner Literaturrecherche ist mir zunächst klar geworden, um was für ein umfangreiches und komplexes Thema es sich hierbei handelt.

Diese Arbeit hat lediglich versucht die wissenschaftlichen Erkenntnisse und Fortschritte der modernen Proteasenforschung während der letzten Jahre zu analysieren, interpretieren und weitestgehend zusammenzufassen. Es wurden Querverbindungen zum physiologischen Alterungsprozess gemacht, um diesen mithilfe des Einsatzes der einzelnen Proteasen geschickt umgehen zu können, damit man in (naher) Zukunft eine effektivere und gezieltere Herangehensweise an all jene Erkrankungen hat, die üblicherweise mit hohem Alter in Verbindung gebracht werden. Auch Therapien könnten im Falle dessen viel mehr bezwecken, indem sie tatsächliche Ursachen behandeln und nicht nur Symptome bekämpfen bzw. unterdrücken, unabhängig davon, ob es sich bei den Diagnosen nun um Krebs, Neurodegeneration oder kardiometabolische Erkrankungen, den sogenannten „*Silent Killers*“, handelt.

Proteasen könnten also mehr oder minder mit wertvollen Diamanten verglichen werden: Sie sind in der Forschung heißbegehrte Themengebiete, für den Ablauf gewisser Regulationsmechanismen im menschlichen Organismus absolut unerlässlich und gelten als äußerst „facettenreich“, da sie für die diversesten Aufgabenbereiche zuständig sind und ergo eine multifunktionale Rolle einnehmen.

Trotz der Überfülle an bis dato vorhandener Literatur stellt unser momentaner Wissensstand aber gerade einmal die Spitze des Eisbergs dar. An Proteasen wird aktuell sehr viel geforscht – und das wird in den kommenden Jahren revolutionäre Veränderungen im Verständnis der Pathologie von Gesundheitsproblemen bewirken.

Abstract

At the beginning of my research, it became evident to me that this topic is both extensive and complex in its nature. This work merely tried to analyze, interpret and summarize the scientific findings and advances in modern protease research over the past few years. Furthermore, connections were made between the physiological aging process and the use of individual proteases, allowing for a more effective and targeted approach to diseases commonly associated with aging. In the event that this is the case, therapies could achieve a greater number of beneficial outcomes by addressing the underlying causes of disease rather than suppressing or fighting symptoms, regardless of whether the diagnoses in question might be cancer, neurodegeneration or cardiovascular-metabolic disorders, often referred to as "*silent killers*."

Proteases could be compared to valuable diamonds in that sense: They are highly sought-after in research, indispensable for proper functioning of certain regulatory mechanisms inside the human body and are regarded as multifaceted as they are responsible for a multitude of tasks and thus possess very versatile roles.

Despite the abundance of existing literature, our current understanding has only scratched the tip of the iceberg thus far. At present, there is a great deal of research being conducted on proteases, which will have a significant impact on our understanding of pathological processes in health conditions in the upcoming years.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Grundlagen des Alterungsprozesses	1
1.2	Oxidativer Stress	1
1.3	Mitochondriale Dysfunktion	3
1.4	Inflammaging	3
2	Einführung in Proteasen und ihre Funktionen bei altersbedingten Erkrankungen.....	4
3	Calpaine.....	5
3.1	Atherosklerose.....	6
3.2	Krebs.....	7
3.2.1	Kontroverse Ergebnisse aus der Literatur	8
3.2.2	Tumormarker für diagnostische Zwecke	9
3.3	Neurodegeneration.....	10
3.3.1	Calpaine und Morbus Alzheimer	10
3.3.2	Calpaine und Morbus Parkinson	11
3.3.3	Die Aktivierung der Mikroglia über Calpainproteasen	12
3.3.4	T _{reg} -Zellen und Morbus Parkinson	14
3.4	Herzmuskelhypertrophie.....	14
3.4.1	Der Einfluss von RAAS, Katecholaminen und Integrinen auf die Calpain-1-Aktivität	15
3.4.2	Aktuelle Forschungsarbeiten im Rahmen der Calpainhemmung	16
4	Caspasen.....	16
4.1	Caspase-6 und Neurodegeneration.....	16
4.2	Apoptose, Nekroptose und Pyroptose	17
4.2.1	Antineoplastika, Caspase-6 und Krebs (Teil I).....	18
4.2.2	Antineoplastika, Caspase-6 und Krebs (Teil II)	19
5	Matrixmetalloproteinasen.....	20
5.1	Matrixmetalloproteinasen bei Arthrosen	20
5.2	Matrixmetalloproteinase 3 bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose.....	21
6	Cathepsine	21
6.1	Cathepsin B und dessen multifunktionale Rollen im Körper.....	22
6.1.1	Cathepsin B bei der Krebsentstehung.....	22
6.1.2	Cathepsin B und kompensatorische Effekte bei Tumoren	23

6.2	Cathepsin C.....	24
6.2.1	Cathepsin C und Neutrophile Elastase (NE) bei Lungenerkrankungen im Alter	24
6.2.2	Cathepsin C und die indirekte Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen	25
6.3	Cathepsin D.....	26
6.4	Cathepsin K.....	26
6.4.1	Cathepsin K und Osteoporose	27
7	Mitochondriale Lon-Proteasen (LonP1).....	27
7.1	Pro-Aging und Anti-Aging durch Mitoproteasen	29
7.2	Neurodegeneration.....	30
8	Serinproteasen	30
8.1	Serinproteasen bei Krebserkrankungen und in der Diagnostik.....	30
8.1.1	Matriptase.....	30
8.1.2	Hepsin	31
8.1.3	Prostasin	31
8.1.4	Testisin	32
8.1.5	Human airway trypsin-like protease (HAT)	32
8.1.6	Urokinase Plasminogen Activator (uPA)	32
8.2	Serinproteasen bei Arthritis	33
8.3	Serinproteasen bei Zystischer Fibrose (CF).....	34
9	Zusammenfassung.....	36
10	Literaturverzeichnis.....	39

1 Einleitung

1.1 Biologische Grundlagen des Alterungsprozesses

Um den Alterungsprozess genauer zu verstehen und gegen die neun „Hallmarks of Aging“ gezielter vorzugehen, muss man sich zunächst dessen bewusst sein, dass es sich beim Altern um keine pathologische Erkrankung per se handelt, sondern lediglich um ein normales, zu erwartendes und unausweichliches Naturgeschehen. Physiologische Vorgänge wie oxidativer Stress bzw. eine oxidative Grundbelastung, mitochondriale Fehlfunktionen sowie Inflammationsgeschehen und epigenetische Veränderungen können nämlich niemals vollkommen vermieden werden.

Die neun Hallmarks bzw. Kennzeichen des Alterungsprozesses umfassen Genominstabilitäten, epigenetische Veränderungen, Telomerverkürzungen, molekulare Zellalterungsprozesse, mitochondriale Regulationsstörungen, Ausschöpfung von Stammzellen sowie Veränderungen der intrazellulären Kommunikationswege und natürlich den Proteostaseverlust. Nahezu jeder dieser Vorgänge wird von niederschwelligen Entzündungsreaktionen begleitet (López-Otín et. al., 2013; Medawar, 1952).

Eine der bekanntesten und nennenswertesten Alterungstheorien in diesem Kontext ist die „Mutations-Akkumulations-Theorie“ von dem bereits in dieser Arbeit erwähnten Nobelpreisträger Peter Medawar aus 1951, die besagt, dass sich im Laufe des Lebens immer mehr und mehr geschädigtes Erbmaterial in den Zellen anhäuft und dies schlussendlich zu Funktionsstörungen im Organismus führt. Nichtsdestotrotz lassen sich gewisse Alterungsprozesse, wenn auch bis dato nicht in vollem Ausmaß, zu einem hohem Grad sehr wohl steuern (Medveded, 1990).

1.1.1 Oxidativer Stress

Eine der gängigsten Alterungstheorien ist die Theorie der freien Radikale, die sich – in anderen Worten – mit oxidativem Stress im Organismus auseinandersetzt: Diesen Radikalen, welche mit ROS (*reactive oxygen species*) und RNOS (*reactive nitrogen species*) abgekürzt werden, liegt ein singuläres Elektron in ihrer äußersten Elektronenhülle zugrunde, welches nach einem zweiten Elektron sucht und demnach äußerst reaktiv mit Molekülen, also möglichen

Angriffspunkten, in Kontakt tritt, die ihm potentiell einen Bindungspartner zur Verfügung stellen könnten. Bei diesen Angriffspunkten muss es sich nicht nur um Makomoleküle handeln, sondern es können genauso gut auch Phospholipide attackiert werden, was in weiterer Folge die Permeabilität und Fluidität von Zellmembranen negativ beeinflussen kann (Kelly, 2011). Lipide wie LDL-Cholesterin können ebenfalls ein ROS-Target sein, wobei diese im Zuge dessen oxidiert werden, was wiederum zu verstärkten Entzündungsprozessen und der typischen Einlagerung in den arteriellen Gefäßen führt. Das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wird signifikant erhöht (Moeller et al., 2010).

Dieses für Radikale aggressive Reaktionsverhalten führt jedenfalls immer dazu, dass die attackierten Zielstrukturen geschädigt werden und sich schlussendlich selbst als freie Radikale auf Elektronensuche begeben. Diese Zellschädigungen häufen sich mit der Zeit an, was den zellulären Alterungsprozess auslöst (Curtin et al. 2002).

Zahlreiche Faktoren können die Entstehung von Radikalen begünstigen. Insbesondere hat sich längerfristige UV-Strahlung als eine der zweifellos gefährlichsten exogenen Noxen etabliert. Auch endogene Noxen, wie beispielsweise die Nebenprodukte der mitochondrialen Atmungskette, können einen Einfluss auf die Entstehung freier Radikale haben (Kelly 2011).

Freie Radikale führen zu Schädigungen des genetischen Erbmateri als innerhalb der Zelle (Moeller et al., 2010). Üblicherweise werden diese DNA-Schäden von DNA-Reparaturmechanismen rechtzeitig entdeckt, sodass aktiv dagegen vorgegangen werden kann. Falls sie aber übersehen werden, kann es zu DNA-Doppelstrangbrüchen kommen, was zur Mutation oder gar Krebsentstehung führen kann. Basierend auf dieser Radikaltheorie sollte es eigentlich möglich sein den durch oxidativen Stress induzierten Schäden mithilfe von Antioxidantien entgegenzuwirken: Insbesondere die Supplementierung mit hohen Dosen an Vitamin C und E galt zunächst als eine der ersten Hypothesen des medizinischen Anti-Agings. Die „finnische Raucherstudie“ aus 1990 lieferte jedoch äußerst kontroverse Ergebnisse: Dabei konnte gezeigt werden, dass Antioxidantien das Auftreten von Bronchialkarzinomen bei Probanden mit Risikofaktoren (Tabakrauchern) kaum verhindern konnten. Stattdessen wurde sogar ein leichter Anstieg der Mortalität protokolliert (Miller et al., 2005; Bjelakovic et. al, 2007).

Nichtsdestotrotz haben ROS auch einen äußerst wichtigen physiologischen Nutzen im Organismus. Sie spielen eine bedeutende Rolle im Rahmen der Immunabwehr, indem sie nicht nur fremde Erreger bekämpfen, sondern auch die Apoptose von entarteten Zellen sowie

intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden und Angiogenese induzieren (Finkel, 2011).

1.2 Mitochondriale Dysfunktion

Mitochondrien sind Hauptlieferanten von freien Radikalen in Lebewesen. Die sogenannten „Kraftwerke der Zellen“ sind zugleich aber auch ein weiteres Radikaltarget. Das, was im Wesentlichen mit dem Begriff „Zellalterung“ gemeint wird, ist größtenteils der Funktionsverlust des Mitochondriums (Miquel et al., 1980).

Die mitochondriale Kernfunktion ist die Synthese von Energie in Form von ATP im Kontext der oxidativen Phosphorylierung der zellulären Atmungskette, die auch als Elektronenflussskette bezeichnet wird (Siekevitz, 1967). Darin sind Lücken vorzufinden, aus denen Elektronen austreten können. Die entkommenen Elektronen werden anschließend auf Sauerstoffmoleküle transferiert. Auf diese Weise können noch mehr ROS gebildet werden, die nicht nur Makromoleküle schädigen, sondern auch Mitochondrien selbst (Luft und Landau, 1995). Mitochondriales Erbmateriel, welches übrigens keine protektiven Histone besitzt, ist wesentlich anfälliger für oxidativen Stress als nukleäre DNA, die sowohl Histone als auch eine stabilere Doppelhelixstruktur hat. Im Laufe des Lebens können nicht mehr funktionstüchtige Mitochondrien durch Autophagie nur noch unzureichend zersetzt und entfernt werden, was den zellulären Alterungsprozess noch weiter verstärkt (Wang et al., 2009).

1.3 Inflammaging

Sinn und Zweck des Auftretens einer Entzündung mitsamt all ihren proinflammatorischen Zytokinen ist es den Körper auf eingedrungene Infektionserreger bzw. Gewebsschädigungen aufmerksam zu machen. Inflammation kann aber unter Umständen auch ohne Pathogene bzw. sonstigen Schäden auf einem geringen Level fortbestehen. Degenerative Krankheiten können sich so über mehrere Jahre manifestieren, ohne dass eindeutige Symptome auftreten. Niederschwellige Entzündungen tragen zu guter Letzt auch zum biologischen Alterungsprozess bei: Man spricht von Inflammaging (Franceschi et al., 2000).

Chronische Entzündungen begünstigen in diesem Sinne auch das Auftreten von Krebsarten. Mehr als 20% aller weltweit diagnostizierten Fälle gehen auf chronische Inflammation zurück (Balkwill und Coussens, 2004).

An dieser Stelle ist vor allem der Darm mit seinem eigenen Mikrobiom wichtig zu erwähnen. Auch dieses Organ ist vom biologischen Alterungsprozess betroffen. Mit der Zeit ist es nämlich üblich, dass Mikroorganismen und die von ihnen gebildeten Toxine die Darmwand durchdringen und dort temporäre Entzündungen hervorrufen (Biagi et al., 2011). Die Immunfunktion lässt nicht nur immer mehr nach, sondern auch die Inflammation wird mit der Zeit chronisch und Pathogene können sich besser im Darm ansiedeln. Dieses Phänomen der abnehmenden Immunabwehr mit zunehmendem Alter wird als Immunoseneszenz beschrieben (Larbi et al., 2008).

2 Einführung in Proteasen und ihre Funktionen bei altersbedingten Erkrankungen

In einem gesunden, jungen Organismus kann man sich auf dessen Fähigkeit zur Ausübung der Proteostase verlassen. Sie gewährleistet die Beseitigung all jener Proteine, die einen Schaden erlitten haben bzw. deren Faltung Fehler aufweist. Zur Proteostase zählt man nicht nur die Systeme des Ubiquitinproteasoms und des Lysosoms, sondern auch gewisse körpereigene Enzyme, die in diesem Sinn eine prägende Funktion besitzen: Proteasen. Unser Genom kodiert durchschnittlich für über 600 dieser Proteasen. Sie sind in nahezu allen Zellkompartimenten beheimatet. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Proteolyse, also der proteolytischen Spaltung, der unterschiedlichsten Substrate, was zur veränderten Aktivität und Funktion führen kann und infolgedessen zweifellos die Zellalterung beeinflusst. Proteasen haben vor allem – wenn es um zelluläre Seneszenz, mitochondriale Dysfunktion sowie Entzündungsgeschehen geht – eine immens prägende Rolle.

Insbesondere im späteren Lebensabschnitt ist dies absolut unerlässlich, da Proteostasestörungen mit steigendem Alter wesentlich häufiger auftreten. Sie sind ein Merkmal des biologischen Alterungsprozesses, welcher mannigfaltige Probleme im Körper verursachen kann: Von neurodegenerativen Prozessen (Morbus Parkinson, Huntington Chorea und Morbus Alzheimer), bis hin zu einem malignen Tumor. Wichtig ist auch zu erwähnen, dass die Anwesenheit einer Protease nicht zwingend mit Krankheit im Alter assoziiert werden muss, denn gewisse Enzyme können sogar eine protektive Wirkung ausüben. Mit anderen Worten lässt sich aber jedenfalls sagen, dass Proteasen einen massiven Einfluss auf die Entstehung und Progression von altersbedingten Erkrankungen haben (Rai et al., 2022).

3 Calpaine

Die Superfamilie der Calpaine umfasst Cysteinproteasen, die auf zellulären Stress antworten und bei zahlreichen, insbesondere altersbedingten Erkrankungen, eine Rolle spielen. Arterielle Gefäßwunderkrankungen sowie Diabetes mellitus Typ 2 und Lebererkrankungen sind die nennenswertesten Beispiele (Ono et al., 2016). Die wichtigsten Calpaine sind die Isoformen 1 und 2, die auch als „konventionelle Calpaine“ bezeichnet werden (Goll et al., 2003; Ono et al., 2012). Diese konventionellen Varianten können, indem sie an ihre S1-Untereinheit binden, Heterodimere bilden und sind außerdem Calcium gegenüber sehr empfindlich, worauf auch die Silbe „Cal“ im Namen andeuten soll. Sie reagieren auf extrazelluläre Stressoren wie die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Miyazaki et al., 2018). Aminosäuresequenzen können von diesen Calpainen jedoch nicht erkannt werden (Shinkai et al., 2016).

Bei Calpastatin handelt es sich um einen Calpainhemmer, der stets zusammen mit der Protease vorzufinden ist (Miyazaki et al., 2015; Maki et al., 1987; Takano et al., 1982). Ein Ungleichgewicht zwischen dieser Cysteinprotease und ihrem Inhibitor kann das Auftreten von Morbus Alzheimer, Chorea Huntington und Retinopathien im fortgeschrittenen Alter führen (Morales et al., 2012; Sato et al., 2011; Higuchi et al., 2011; Miyazaki et al., 2015).

Auch zwei „unkonventionelle Calpaine“ können die Entwicklung dieser Krankheiten begünstigen:

- Calpain-6 weist im Gegensatz zu allen anderen Cysteinproteasen sowohl strukturelle als auch funktionelle Unterschiede auf. Cystein im aktiven Zentrum der proteolytischen Domäne wurde durch Lysin ersetzt, wodurch ein Proteinabbau nicht möglich ist. Dieses Enzym kann außerdem nicht an die S1-Untereinheit binden, wie es sonst bei Calpainen üblich ist (Gol et al., 2002; Ono et al., 2012).

In Mäusen konnte auch gezeigt werden, dass Schäden der Skelettmuskulatur bei nichtvorhandenem Calpain-6-Gen schneller regeneriert wurden, weil die proteolytische Domäne fehlte (Dear et al., 1997).

- Calpain-10 wird hauptsächlich in den Beta-Zellen der Langerhans-Inseln der Pankreas gebildet und spielt bei der Entstehung von Diabetes Mellitus Typ II eine Rolle (Ling et

al., 2009; Horikawa et al., 2000; Bayramci et al., 2017; Karambataki et al., 2016). Verstärkte Calpain-10-Aktivität sorgt für eine geringere Aufnahme von überschüssiger Glucose in die Adipozyten und Skelettmuskeln, wodurch das Risiko einer längerfristigen Hyperglykämie ansteigt (Brown et al., 2007).

3.1 Atherosklerose

Bei Atherosklerose manifestieren sich hartnäckige Plaques an der Intima der Blutgefäße. Dadurch nimmt der Gefäßdurchmesser zu und weniger Blut kann durch die Arterien fließen. Bei den Plaques handelt es sich um Ablagerungen aus Cholesterin, abgestorbenem Zellmaterial sowie Calciumionen, die zu hartnäckigen Verkalkungen führen (Ross, 1999). Auch Makrophagen, die sehr viele Lipide bzw. Cholesterin aufgenommen haben und im Zuge der Apoptose zu Schaumzellen werden, kommen darin vor (Bäck et al., 2019). Es entstehen über die Jahre immer mehr Läsionen, die den Plaques Stabilität verleihen. Schaffen es aber Plaques sich von der inneren Gefäßwand zu lösen, werden sie mit dem Blutfluss weitertransportiert, verstopfen die Koronararterien und führen so zum Auftreten von koronaren Herzkrankheiten (Ridker et al., 2017).

Die Endothelzellen der Blutgefäße bestehen aus Adherens Junctions, Gap Junctions und Tight Junctions. Die ersteren zwei Zellkontaktmöglichkeiten sind, was die Barrierenfunktionen der Epithelien anbelangt, am allerwichtigsten (Mehta und Malik, 2006).

Vaskuläre Endothel-Cadherine, auch als VE-Cadherine abgekürzt, sind Moleküle, aus denen die Adherens Junctions aufgebaut sind (Bobryshev et al., 1999; Foteinos et al., 2008). In diesem Kontext wichtig zu erwähnen sind jene zwei VE-Cadherine, die für die Calpainproteasen sehr anfällig sind, nämlich epitheliale Cadherine (E-Cadherine) und neuronale Cadherine (N-Cadherine) (Rios-Doria et al., 2003; Jang et al., 2009). Die Calpaine sind in der Lage VE-Cadherine in den Blutgefäßen proteolytisch zu zerlegen und auf diese Weise die endotheliale Barriere zu zerstören. Die Adherens Junctions werden durch diesen Schritt instabiler, wodurch die Barrierefunktion der Epithelien stetig abnimmt. (Su und Kowalczyk; 2017; Friedrich et al., 2019; Guo et al., 2021; Sun et al., 2020).

Studien konnten auch beweisen, dass Calpainhemmstoffe das Fortschreiten von Atherosklerose aufhalten können, aber keinen Einfluss auf erhöhte Blutfettwerte haben. Calpainproteasen wirken im Umkehrschluss also atherogen (Miyazaki et al., 2011). Auch Simvastatin

funktioniert ähnlich wie ein Calpaininhibitor, was auch die vasoprotektive Wirkung dieses Statins bestätigt (Yang et al., 2016; Yin et al., 2017).

Aktuelle Studien haben auch belegen können, dass ein beeinträchtigt Lymphgefäßsystem ebenfalls das Auftreten bzw. Fortschreiten einer Atherosklerose fördern kann. Dyslipidämien werden dadurch besonders verstärkt (Lim et al., 2013).

Mittels selektiver Hemmung konventioneller Calpaine, insbesondere in lymphatischen Endothelzellen, kann die Entstehung von Atherosklerose in der Aorta abgebremst und gleichzeitig die TGF- β 1-Konzentration sowie die Anzahl an frei im Blut zirkulierenden regulatorischen T-Lymphozyten angekurbelt werden. Das beruht aber nicht nur auf die Proteaseninhibition, sondern auch auf den durch Calpain ausgelösten Abbau von MEKK1 (Mitogen-aktivierter Proteinkinase-Kinase-Kinase 1), die in der Signaltransduktionskaskade von TGF- β 1 vorkommt. Durch die geringen Mengen an Calpain steigt auch die Expression gewisser Zytokine an, wie beispielsweise dem Interleukin-10 (Miyazaki et al., 2023).

3.2 Krebs

Die bis dato noch nicht erwähnten calciumabhängigen Cysteinproteasen Calpain-1 und Calpain-2 sind klassische Vertreter dieser Proteasenfamilie. Deren Substrate spielen auf zellulärer Ebene vor allem bei der Transkription, Translation und Apoptose eine bedeutende Rolle. Kommt es jedoch zu Beeinträchtigungen in ihrer Aktivität, können sich oftmals Tumore bilden. Im Umkehrschluss bedeutet das aber auch, dass Calpaine therapeutisch wertvolle Targetmoleküle darstellen (Shapovalov et al., 2022).

Dazu wurden frühe klinische Studien gegen Ende der 90er-Jahre herangezogen, in denen Calpain-1 erforscht wurde: Hohe Plasmaspiegel dieses Enzyms in Nierenzellkarzinomen wurden mit einer höchst aggressiven Metastasierung jener Tumore in Verbindung gebracht (Braun et al., 1999). Anhand zeitgenössischer Metaanalysen konnte wiederum bestätigt werden, dass höhere Calpain-1-Konzentrationen im Körper krebskranker Studienteilnehmer mit einer wesentlich kürzeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert werden. Dies war vor allem bei Darmkrebs, Eierstockkrebs sowie bei malignen Hirntumoren der Fall (Tang et al., 2019). Eine andere Studie konnte beweisen, dass eine verstärkte Calpain-1-Expression zu aggressiver

Bildung von Tochtergeschwülsten und ebenfalls einer verringerten Überlebenszeit bei Magenkrebspatienten führte (Zhao et al., 2020).

Mithilfe histologischer Methoden wie der Immunfärbung hat man gesehen, dass auch Darmkrebspatienten eine wesentlich schlechtere Prognose hatten, wenn in ihren Karzinomen ein hoher Gehalt an Calpain-1 und zugleich nur geringe Mengen von Filamin-A (FLNA), einem Calpainsubstrat, nachweisbar waren (Xu et al., 2019). Auch bei Prostatakrebs spaltet Calpain-1 dieses Substrat nur unzureichend (Huang et al., 2017). Bei der Tumorgenese von Prostatakrebs ist aber nicht nur die Calpain-1-Protease, sondern auch Calpain-2 involviert. Calpain-2 ist nämlich imstande den Promotor des Collapsin Response Mediator Protein 4 (CRMP4) zu methylieren, was wiederum Metastasierung triggert (Gao et al., 2018).

Studien zufolge ist es – zumindest beim Prostatakarzinom – möglich mithilfe modifizierter RNA das Calpain-1-Enzym zu inhibieren, was die Geschwindigkeit der Proliferation und Invasion in vitro drastisch reduzieren kann (Yu et al., 2019).

Calpain-2 ist außerdem ein bewährter prädiktiver Tumormarker in Patientinnen mit Ovarialkarzinomen. Eine hohe Expression dieses Enzyms im Tumor erschwert die Chemotherapie mit platinhaltigen Zytostatika, da sich mit höherer Wahrscheinlichkeit potentielle Resistenzen ausbilden können (Storr et al., 2012).

Hemmstoffe der Calpaine sorgen durch ihre inhibierende Wirkung auch für eine geringere Aufnahme von überschüssiger Glucose in Skelettmuskeln, wodurch das Risiko einer längerfristigen Hyperglykämie ansteigt (Brown et al., 2007).

Hohe Calpain-1- und Calpain-2-Expressionen sorgen auch bei HER2-positivem Mammakarzinom für ein negatives Outcome (Storr et al., 2011). Selbst eine Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab kann zu keiner längerfristigen Tumorfreiheit führen, wenn gleichzeitig verstärkt Calpain-1 exprimiert wird (Pu et al., 2016).

3.2.1 Kontroverse Ergebnisse aus der Literatur

Aber auch widersprüchliche Ergebnisse wurden in der Literatur dokumentiert, in welchen Calpainenzyme sogar protumoral wirkten: Beispielsweise waren in einer klinischen Studie Patientinnen mit nur schwacher Aktivierung des Calpain-9-Gens nicht lange rezidivfrei, auch wenn sie sich einer Hormonbehandlung unterzogen haben lassen (Davis et al., 2014).

Darüber hinaus beschreibt eine andere Studie die Beziehung zwischen vorhandenem Ausmaß an Cysteinproteasen und ihrem im Körper befindlichen Inhibitor bei Brustkrebs und stellt die Unterschiede gegenüber:

- Krebskranke Frauen mit entzündlichem Brustkrebs, die sowohl hohe Calpain-1- als auch Calpastatin-Niveaus aufweisen, können in der Regel mit weitaus günstigeren Prognosen rechnen als jene Frauen, die erniedrigte Levels hatten.
- Bei nichtentzündlichem Brustkrebs ist das Verhältnis wiederum anders: Hier sind die Überlebenschancen höher, wenn man es mit einer hohen Calpain-2-Konzentration und nur geringen Mengen an vorhandenem Calpastatin im Karzinom zu tun hat (Storr et al., 2016).

Auch Pankreaskarzinome verhalten sich bei niedrigen Calpain-1- sowie Calpain-2-Spiegeln maligner und aggressiver (Storr et al., 2012).

3.2.2 Tumormarker für diagnostische Zwecke

Bei FLNA handelt es sich um Filamin A, einem bereits erwähnten Substrat von Calpain-1, das gleichzeitig auch als Tumormarker dient (Xu et al., 2019). Auch hier gibt es sehr konträre Belege für dessen Aussagefähigkeit: In-vitro-Studien konnten zeigen, dass im Falle von Glioblastomen verstärkt Apoptose induziert wird, wenn FLNA proteolytisch abgebaut wird, was wiederum zu einer besseren Überlebensprognose führte als in Krebspatienten mit unversehrtem FLNA in hohen Konzentrationen (Cai et al., 2020). Calpainsubstrate sind aber nicht nur Tumormarker, sondern spielen eine sehr breitgefächerte Rolle in verschiedenen Bereichen der Diagnostik. Unter Anderem gelten Abbauprodukte von Troponin I als ein bedeutender Marker für Herzmuskelschädigungen (Mair et al., 2018). Diese kamen nämlich über die Proteolyse des Calpains überhaupt zustande (Kositprapa et al., 2000). Ein durch Calpain-2 beeinflusstes Abbauprodukt der Tyrosinphosphatase PTPN13 kann auch als Marker für traumatische Verletzungen von Gehirnarealen dienen (Wang et al., 2021).

3.3 Neurodegeneration

3.3.1 Calpaine und Morbus Alzheimer

Bei Morbus Alzheimer handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, bei der sich Plaques im Hippocampus und Neocortex der Großhirnrinde von senilen Patienten bilden. In diesen Regionen kommt es zu einer starken Verminderung der Synapsenzahl. Schlussendlich bilden sich die für diese Krankheit typischen Läsionen, die zu neuromuskulären Beeinträchtigungen führen. Was die Pathogenese der Erkrankung betrifft, haben auch hier die Calpaine eine wesentliche Funktion: Aufgrund der bei der Morbus Alzheimer gestörten Regulation der Calciumhomöostase kommt es nämlich zu einer längerfristigen Aktivierung dieser Calciumabhängigen Enzyme, die nicht nur im Rahmen der Zellproliferation, sondern auch bei der Axonregulation beteiligt sind (Ferreira, 2012). Diese regulatorischen Mechanismen nehmen aber auch bei nichtbetroffenen Menschen im Laufe des Lebens stetig ab (Averna et al., 2001).

Wie Studien zeigen konnten, scheinen Calpaine insbesondere unter krankhaften Bedingungen, wie beispielsweise starker Neurodegeneration im fortgeschrittenen Alter, übermäßig aktiviert zu sein (Saito et al., 1993). Dies ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen, unter Anderem auf einen Anstieg der zellulären Calciumkonzentration und eine der Calpastatinabnahme. A β -Protein, welches die für Alzheimer typischen senilen Plaques entstehen lässt, führt zu einem fünffachen Anstieg von Calciumionen in den Nervenzellen des Hippocampus (Kelly et al., 2005). Dieses Protein ist hauptverantwortlich für die Enzyminduktion, indem es den extrazellulären Zufluss an Calciumionen ankurbelt (Kelly et al., 2007).

NMDA-Rezeptoren sowie spannungsabhängige Calciumionenkanäle sind beide ebenfalls an dieser Regulation beteiligt (Qiu et al., 2003). NMDA-Rezeptorantagonisten wie MK801 und Memantin sind in der Lage den durch A β -Protein stimulierten Ionenanstieg zu reduzieren und somit in weiterer Folge die Calpainaktivierung zu hemmen (Huettner et al., 1988; Bullock, 2006).

Auch LDL-Cholesterin ist als Calpainregulator an diesem Mechanismus beteiligt (Nicholson und Ferreira, 2011). In anderen Worten stellt also auch das Cholesterin einen Risikofaktor für diese neurodegenerative Krankheit dar. Auch ein nur mäßig erhöhter Cholesterinplasmaspiegel in den mittleren Lebensjahren kann das die Inzidenz begünstigen (Kivipelto et al., 2001).

Cholesterin befindet sich aber nicht nur in Nahrungsmitteln, sondern ist auch ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembranen unseres Körpers und erhöht durch sein Vorhandensein die Empfindlichkeit gegenüber des A β -induzierten Calciumanstiegs. Dieser Schritt führt wiederum über Calpaingesteuerte Signalkaskaden zur Apoptose (Nicholson und Ferreira, 2011).

3.3.2 Calpaine und Morbus Parkinson

Bei Morbus Parkinson handelt es sich um eine progressive neurodegenerative Störung, von der insbesondere das zentrale Nervensystem (ZNS) in Mitleidenschaft gezogen wird.

Die Pathogenese umfasst mehrere Wege, die alle jedenfalls in Neuroinflammation sowie dem Verlust dopaminerger Neuronen im ZNS münden, genauer gesagt in den Nervenzellen des Gehirns sowie des Rückenmarks.

Calpainproteasen sind verantwortlich für die Proteolyse sowie Aggregation von α -Synuclein, einem neuronalen Protein, das in der Pathogenese der Parkinsonerkrankung eine ganz besondere Rolle spielt. Dies führt dazu, dass die Mitochondrien in ihrer Funktion gestört werden und dass oxidativer Stress ausgelöst wird, den zwei wichtigsten Faktoren, die den Alterungsprozess fördern. Durch diese Dysfunktion steigt die Konzentration an intrazellulärem Calcium an, wodurch die Enzymklasse der Calpaine aktiviert wird und mit Entzündungsreaktionen kontert. Auch die mitochondriale ATP-Produktion kann nicht mehr ablaufen (Abbildung 1; Gao et al., 2022).

Die Aggregate von α -Synuclein führen einerseits dazu, dass Lewy-Körperchen entstehen, welche wiederum noch mehr Neuronenschädigungen auslösen, indem sie nicht nur oxidativen Stress verursachen, sondern auch die Bluthirnschranke schädigen.

Auf der anderen Seite wird durch die Aggregatbildung des Synucleinproteins die Dopaminsynthese beeinträchtigt, da die Tyrosinhydroxylase (TH) phosphoryliert wird. Bei diesem Schlüsselenzym handelt es sich um jenes Molekül, dass die Umwandlung von Tyrosin in Levodopa ermöglicht, also der Dopaminvorstufe. Nimmt nun aufgrund dieser Phosphorylierung der Dopamingehalt ab, führt das zu einer veränderten Signalübertragung am Dopaminrezeptor. Dadurch werden proinflammatorische T-Lymphozyten aktiviert, die für noch mehr Entzündungsgeschehen sorgen. Zusammenfassend führt das zu einer langfristigen Inflammation der Nervenzellen, welche dann frühzeitig altern und letztendlich absterben.

Hohe Konzentrationen an gewissen Neurotoxinen lösen sowohl eine verstärkte Degeneration der dopamingergen Neuronen in der Substantia nigra sowie in den motorischen Nervenzellen des menschlichen Rückenmarks aus, zu denen man beispielsweise Umwelttoxine wie Rotenon oder 6-Hydroxydopamin zählt. Dies ist möglich, weil sie die Aktivität der Calpaine steigern, was die Neuroinflammation begünstigt. Das ist auch der Ansatzpunkt der Calpaininhibitoren als Antiparkinsonika. Calpain-vermittelte Entzündungsprozesse sowie die darauffolgende Neurodegeneration in der Substantia nigra und im Rückenmark sollen unterdrückt bzw. weitestgehend minimiert werden (Gao et al., 2022).

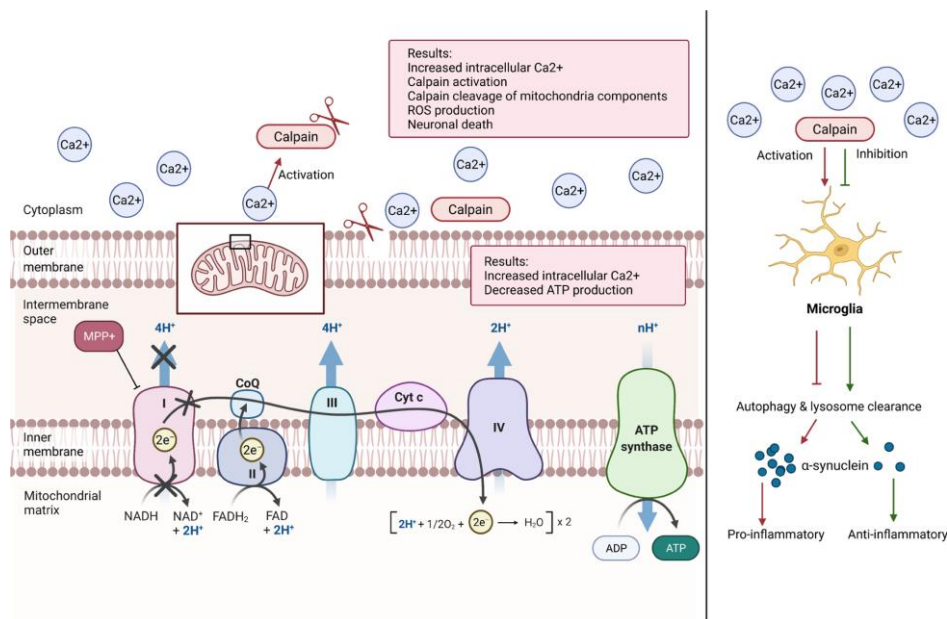


Abbildung 1: Calpain-induzierte Schädigung an Mitochondrien, welche in Neuroinflammation sowie -degeneration resultiert (Gao et al., 2022).

3.3.3 Die Aktivierung der Mikroglia über Calpainproteasen

Die durch Calpain ausgelöste Mikrogliaaktivierung bewirkt auch die Infiltration von T-Lymphozyten ins zentrale Nervensystem (Haque et al., 2020). Beim Begriff Mikroglia handelt es sich um Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems, die eine gewisse Ähnlichkeit zu den Makrophagen haben (Van Rossum und Hanisch; 2004). Sie tragen zur physiologischen Gehirnfunktion bei und sind daher unerlässlich. Sie werden auch als „Phagozyten des Gehirns“ bezeichnet (Wolf et al., 2017).

Mikroglia reagieren sehr empfindlich auf einen Anstieg der Calciumionenkonzentration, was ja von Calpainproteasen induziert wird. Daraufhin werden verstärkt MHC-Antigene sowie

entzündungsfördernde Zytokine ausgeschüttet, während die Synthese von neurotrophen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise dem Insulin-like Growth Factor (IGF1) gehemmt wird. (Liu et al., 2017; Wolf et al., 2018; Schetters et al., 2017). Die MHC-I- sowie MHC-II-Komplexe binden dann an die Oberfläche der APC (Antigen Presenting Cells), welche von CD4⁺-bzw. CD8⁺-T-Lymphozyten erkannt werden (Shams et al., 2019).

Die Aktivierung dieser Lymphozyten führt bei Erkrankten mit Morbus Parkinson zum Zelltod. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie B-Lymphozyten (B-Zellen) sind hingegen von diesem Effekt in den meisten Fällen unbeeinträchtigt (Brochard et al., 2009).

CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen waren in Studien mit Mäusen vor allem in der Substantia nigra wie auch im Rückenmark häufig vorzufinden. Die Mäuse wurden zuvor mit MPTP, einem in dieser Arbeit noch nicht erwähnten Neurotoxin, dessen Akronym für 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine steht, behandelt (Gao et al., 2022). Dieses Toxin kann Calpaine verstärkt aktivieren und somit schneller Neurodegeneration einleiten (Samantaray et al., 2015).

Die Zytotoxizität von CD4⁺-T-Lymphozyten wird von einem Liganden des FasL-Signalwegs, nämlich FasL, bestimmt (Zaman et al., 2021). Bei FasL handelt es sich um einen Liganden, der den apoptotischen Zelltod induzieren kann, indem er Caspasen, eine Proteasenklasse, auf welche diese Arbeit auch eingehen wird, aktiviert (Waring und Müllbacher; 1999).

Die Affinität von FasL zu seinem Fas-Rezeptor ist deutlich vermindert, wenn dieser Ligand Mutationen durchgemacht hat. Anhand von Mäusen mit mutiertem FasL konnte dies auch bestätigt werden. Dopaminerge Neuronen in der Substantia nigra gingen zugrunde, nachdem diese mit dem Neurotoxin MPTP behandelt wurden. Das Absterben von dopaminergen Neuronen durch CD4⁺-T-Helferzellen ist also abhängig von dem Fas-Liganden (Brochard et al., 2009).

Gewisse Studien konnten zeigen, dass die Anzahl der Natürlichen Killerzellen sowie B-Zellen bei den Betroffenen stark erhöht sind. Diese Immunzellen werden daher auch als Marker für Morbus Parkinson verwenden (Sun et al., 2019).

Genauso hat der Parkinsonkranke auch vermehrt T-Helferzellen im Blut (Thome et al., 2021). Insbesondere Th1- sowie Th17-Zellen sind hohem Ausmaß vorzufinden (Elgueta et al., 2019).

3.3.4 T_{reg}-Zellen und Morbus Parkinson

Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten können regulatorische T-Zellen (T_{reg}) dem Ausbruch der Calpain-induzierten Neurodegeneration der Parkinsonerkrankung vorbeugen. Dazu migrieren T_{reg}-Zellen zu den Läsionsorten und können mit den betroffenen Gliazellen in Kontakt treten, welche daraufhin aktiviert werden (Huang et al., 2020). Dieser Schritt leitet Inflammationskaskaden ein, wodurch den regulatorischen T-Zellen signalisiert wird, dass sie sich Richtung Substantia nigra bzw. Rückenmark begeben sollen, um ihre protektive Wirkung auszuüben.

Auch die Astrozyten sind hier von Bedeutung, indem sie neurotrophische Hirnfaktoren wie das BDNF (brain-derived neurotrophic factor) synthetisieren, um die Nervenzellen der Substantia nigra zu unterstützen bzw. vor Abbau zu schützen (Reynolds et al., 2007). Neuroinflammation kann auf diesem Wege abgebremst werden (Magistrelli et al., 2020; Anderson et al., 2014). Es lässt sich aus diesen Beobachtungen also schlussfolgern, dass Treg-Zellen nicht nur eine neuroprotektive Wirkung ausüben, indem sie die Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine stoppen, sondern auch die Produktion antiinflammatorischer Mediatoren stimulieren, die Th1- sowie Th17-Zellen in ihrer Funktion bremsen und auch eine Interaktion mit Mikroglia verhindern (Schwab et al., 2020).

Auch eine gezielte Gabe von T_{reg}-Zellen in Parkinsonmodellen konnte eine gezielte Unterdrückung der soeben erklärten pathogenen Mechanismen bezwecken, wie mehrere Studien belegten (Huang et al., 2020).

3.4 Herzmuskelhypertrophie

Die Herzmuskelhypertrophie ist in der Regel eine Folge von nichteingestelltem Blutdruck über einen längeren Zeitraum und kann unbehandelt sogar zu schwerwiegenden Herzinsuffizienzen führen. An reversiblen Umkehrmechanismen, mit denen man diese Art der Hypertrophie wieder rückgängig machen könnte, wird aktuell noch geforscht. In diesem Kontext scheinen aber Calpaine, was in präklinischen Studien bereits demonstriert werden konnte, definitiv einen Einfluss auf die Regulationsmechanismen der kardialen Hypertrophieentwicklung zu haben (Patterson et al., 2011).

Calpain-1 und Calpain-2 kommen in der quergestreiften Muskulatur, zu der die Skelettmuskulatur sowie auch der Herzmuskel zählen, in geringen Mengen vor (Kumamoto et al., 1992). Mithilfe von Herzmuskelzellkulturen wurde gezeigt, dass Calpain-1 bei physiologischen Calciumspiegeln stets aktiv ist, Calpain-2 jedoch nicht. Letztere Protease spielt daher auch bei der Entwicklung von kardialen Hypertrophien eine eher untergeordnete Rolle. Eine Hemmung von Calpain-1 bremst jedenfalls die Hypertrophie entweder komplett ab oder verlangsamt sie zumindest (Galvez et al., 2007).

Calpain-1 kann zahlreiche Pathways aktivieren und hemmen, welche im Rahmen der kardialen Hypertrophie auf diverse externe Stimuli reagieren können, wie beispielsweise auf reaktive Sauerstoffspezies, Integrine, gewisse G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Angiotensin-II-Rezeptor) sowie auf spezifische Transkriptionsfaktoren wie NF κ B (Patterson et al., 2011).

3.4.1 Der Einfluss von RAAS, Katecholaminen und Integrinen auf die Calpain-1-Aktivität

Angiotensin II, welches vor allem bei der Regulation des Blutdrucks über das RAA-System (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) eine Rolle spielt, löst – nachdem es an dessen Rezeptor, einem G-Proteingekoppelten Rezeptor, gebunden ist – ohnehin schon eine Myokardhypertrophie aus. Calpainprotease-1 wird daraufhin aktiviert und setzt im Anschluss den NF κ B-Signalweg in Gang (Rouet et al., 2000). Dadurch wird die Genexpression zusätzlicher Gene induziert, die auch „kardial prohypertroph“ wirken.

Eine Herzhypertrophie kann aber nicht nur durch die soeben genannten Faktoren gefördert werden, sondern auch über β -adrenerge Stimulation (Barry und Townsend, 2010). Katecholamine können nämlich ebenfalls Calpain aktivieren, was die Hypertrophie noch zusätzlich verstärkt. Außerdem sorgt die β -adrenerge Stimulation dafür, dass ein weiterer Signalweg, nämlich der eNOS/Akt-Signalweg, inhibiert wird. Eine Unterbindung dieser Signalkaskade fördert die Hypertrophie noch zusätzlich (Bhuiyan et al., 2009).

Auch Integrine wie β 3-Integrin können die Calpainaktivität ankurbeln, wodurch Kardiomyozyten der Apoptose entweichen können. Stattdessen werden die Herzmuskelzellen aufgrund der Integrine zur Hypertrophie verleitet (Brancaccio et al., 2006).

Reaktive Sauerstoffspezies können ebenso einen hypertrophen Effekt auslösen: Bei NADPH-Oxidase handelt es sich um membrangebundenes Enzym, welches Superoxid durch

Elektronenübertragung von NADPH auf molekulare Sauerstoffmoleküle bildet. Das gewonnene freie Radikal ist eine hochreaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche Calpain-1 verstärkt aktivieren kann. Hierzu gab es in der Literatur auch eine Studie, die an Herzmuskelzellen von adulten Ratten durchgeführt wurde. Wurden jene Zellen nämlich mit Noradrenalin, einem Katecholamin, stimuliert, so wurde die NADPH-Oxidase in ihrer Aktivität hinaufreguliert, was die Bildung von ROS deutlich verstärkte und letzten Endes für Calpain-1-bedingte Hypertrophie sorgte (Li et al., 2009).

3.4.2 Aktuelle Forschungsarbeiten im Rahmen der Calpainhemmung

Aktuelle Forschungsfragen müssen aber erst klären, ob die Calpainhemmung zu dauerhaften kardialen Nebenwirkungen führen kann. Präklinische Studien haben sich bis dato nämlich nicht ausreichend mit Langzeitergebnissen im Rahmen der Calpainhemmung auseinandergesetzt.

Des Weiteren muss auch erst geklärt werden, ob die Hemmung der Calpain-1 bei diagnostizierter Herzmuskelzellhypertrophie diese überhaupt wieder ausreichend umkehren kann, um die Morbidität sowie Mortalität der Betroffenen zu senken. Auch ist noch nicht ganz klar, ob eine erzwungene Inhibition der Calpainprotease sich womöglich negativ auf andere Organe auswirken könnte (Pietsch et al., 2010).

4 Caspasen

Caspasen sind ebenfalls Cysteinproteasen, die vor allem eine besondere Rolle bei der Apoptose und dem Entzündungsgeschehen spielen (Van Opdenbosch und Lamkanfi, 2019). Jede bis dato uns bekannte Caspase kann entweder den vorprogrammierten Zelltod einleiten oder diesen sogar durchführen (Graham et al., 2011).

4.1 Caspase-6 und Neurodegeneration

Caspase-6 ist die womöglich am besten erforschte Caspase. Sie ist nicht nur für die Apoptose wichtig, sondern unterscheidet sich von anderen Caspasen darin, dass sie einen ganz

besonderen Stellenwert hat, wenn es um Neurodegeneration geht. Daher wird sie in der Biochemie mit dem Auftreten von Chorea Huntington und Morbus Alzheimer assoziiert. Sie konnte insbesondere in Gehirnen von Erkrankten nach ihrem Ableben in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (Graham et al., 2011).

Im Falle von Morbus Huntington muss das mutierte Huntington-Protein an einer gewissen Stelle von Caspase-6 proteolytisch gespalten werden, damit die für die Erkrankung typischen neurologischen Symptome auftreten können. Caspase-6 ist außerdem bereits im Frühstadium von Morbus Alzheimer vorhanden und ist mitbeteiligt an der Entwicklung der Läsionen (Wang et al., 2017).

Während des Apoptosevorgangs spaltet die im Nukleus befindliche Caspase-6 nicht nur das Strukturprotein NUMA (nuclear mitotic apparatus-protein), sondern auch Laminproteine (Hirata et al., 1998; Orth et al., 1996). Dies proteolytischen Spaltungen führen dazu, dass der Zellkern zu schrumpfen beginnt und letztendlich fragmentiert.

Zahlreiche Transkriptionsfaktoren gelten außerdem als Caspase-6-Substrate. Dazu zählt beispielsweise auch NFκB und CBP (CREB-binding protein) (Rouaux et al., 2003; Nyormoi et al., 2001; Galande et al., 2001; Levkau et al., 1999).

Caspase-6 ist insbesondere im Gehirn vorzufinden. Das Enzym ist außerdem auch bei der neuronalen Gehirnentwicklung während der Schwangerschaft von Bedeutung (Simon et al., 2012). Knockout-Mäuse, die beispielsweise Nervenzellen mit einem Caspase-6-Knockout aufwiesen, waren in Studien vor neuronaler Degeneration geschützt. Mäuse mit einem Caspase-6-Mangel wiesen schwere Lerndefizite und Intelligenzverminderungen auf (Uribe et al., 2012).

4.2 Apoptose, Nekroptose und Pyroptose

„Programmed Cell Death“ (PCD) ist ein Begriff, der im deutschen Sprachgebrauch der Apoptose gleichgesetzt wird. Diese Art des Zelluntergangs ist aber noch wesentlich komplexer und umfasst auch die Nekroptose sowie Pyroptose (PANoptose). An diesen drei zellulären Mechanismen können Therapeutika effektiv ansetzen.

Caspase-6 kann beispielsweise die PANoptose steuern, indem sie diese über Gasdermin D reguliert. Gleichzeitig übt jene Caspase auch einen Einfluss auf die Nekroptose über das Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein (MLKL) aus (Qi et al., 2023):

- Bei dem Molekül Gasdermin D handelt es sich um ein körpereigenes Protein, welches im Falle von bakteriellen Infektionen mit einer Entzündungsreaktion kontert, um den Körper auf den eingedrungenen Erreger aufmerksam zu machen und dessen Elimination zu beginnen (Dai et al., 2023). Die Pyroptose (PANoptose), welche über Gasdermine reguliert wird, entspricht einer Nekrose, welche mit der Beschädigung von Zellmembranen, der Freisetzung von Zellorganellen und mit „Zellschwellung“ einhergeht (Shi et al., 2016).
- Nekroptose wiederum ist eine Form des Zelltods, der auf molekularer Ebene den Mechanismen der Apoptose sowie der Nekrose relativ ähnelt. Nekroptose aber erfordert stets das Vorhandensein von MLKL. (Dhuriya und Sharma; 2018). Bei MLKL handelt es sich um eine Pseudoproteinkinase, die nur nach Phosphorylierung die Rolle des Hauptakteurs der Nekroptose übernehmen kann (Cai et al., 2014). Ist die Nekroptose dysreguliert, kann dies im Organismus zu einer schwerwiegenden Entzündung kommen, welche zur Entstehung von Krebserkrankungen beitragen kann (Dhuriya und Sharma; 2018).

Die Aktivität von Caspase-6 kann zu einem hohen Anteil von Antitumormitteln beeinflusst werden. Daraus lässt sich also schlussfolgern, dass Caspase-6 im Kontext der Kanzerogenese eine absolut fundamentale Schutzfunktion bietet: Sie kann nämlich entartete Zellen beseitigen (Qi et al., 2023).

4.2.1 Antineoplastika, Caspase-6 und Krebs (Teil 1)

Gewisse Antineoplastika bzw. Substanzen mit einer (teils) antineoplastischen Wirkung können in Kollaboration mit Caspain-6 einen bedeutenden Beitrag zu dessen Funktion leisten, indem sie dessen Aktivität erhöhen:

Bei Resveratrol handelt es sich um ein Polyphenol mit ausgeprägtem antioxidativen Potential (Salehi et al., 2018). Dessen mögliche antineoplastische Wirkung ist momentan auch Forschungsgrundlage in Studien. Fest steht jedoch, dass Resveratrol die Apoptose in menschlichen Kolonkarzinomzellen durch Caspase-6-Aktivierung induzieren kann. In weiterer Folge wird Lamin A von der Caspase gespalten. Hemmstoffe der Caspase-6 setzen wiederum

genau hier an und verhindern die durch Resveratrol-ausgelöste Lyse des Lamin A und damit auch die Zellapoptose, wodurch die Krebszellen überleben (Lee et al., 2006).

Andere Studien konnten belegen, dass das Zytostatikum 5-Fluorouracil durch Aktivierung der Caspase-6-Protease die Apoptose von entarteten Krebszellen triggern kann (Chan et al., 2020).

Auch Aloe-Emodin, eine Anthrachinonverbindung, ist in der Literatur vorgekommen und verfügt ebenso über antiproliferative Eigenschaften. Die Verbindung löst durch die Aktivierung zweier Caspasen, nämlich Caspase-6 und Caspase-9 den Zelltod von Krebszellen aus. Für die Apoptose ist aber lediglich Caspase-6 zuständig (Suboj et al., 2012).

Lobaplatin, ein weiteres Antineoplastikum, aktiviert wiederum Caspase-3, welche in Karzinomzellen des Darms den Vorgang der Pyroptose auslöst (Yu et al., 2019). Auch hier trägt Caspase-6 aber eine tragende Rolle, indem es den Pyroptoseprozess zusätzlich fördert, da das Enzym – genau wie Lobaplatin – die Caspase-3-Aktivität hochregulieren kann (Sun et al., 2017).

4.2.2 Antineoplastika, Caspase-6 und Krebs (Teil II)

Caspase-6 sorgt auch dafür, dass Zellen des hepatozellulären Karzinoms in Apoptose geschickt werden. Dieser Effekt kann ebenfalls mithilfe gewisser antineoplastischer Medikamente zusätzlich verstärkt werden:

ZBP-89 (Krüppel-like zinc finger protein) ist beispielsweise ein Transkriptionsfaktor, der das Zellwachstum sowie den Zelluntergang mitreguliert. Es kann dabei mit dem p53-Tumorsuppressorprotein interagieren und die Proliferation einer Zelle zum Stillstand bringen. Der Transkriptionsfaktor kann die antineoplastische Wirkung zahlreicher Tumortheraeutika verstärken (Zhang et al., 2010). Auch die Caspase-6 ist von diesem Effekt betroffen, denn ZBP-89 kann dessen Enzymaktivität ebenfalls ankurbeln, was wiederum zum Caspase-6-induzierten Tod der Zelle führt. Basierend auf diesen Mechanismus können auch hepatozelluläre Karzinomzellen in Apoptose geschickt werden (Chen et al., 2009).

Auch gewisse Cyclooxygenase-2-Hemmer wie Celecoxib funktionieren ähnlich, indem sie jene Protease aktivieren. Die Krebszellen der Leber werden daraufhin in ihrer Proliferation gebremst und apoptotisch abgetötet (Cervello et al., 2013). Im Gegensatz dazu steht AMPK

(Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase), die die Fähigkeit hat die Aktivierung von Caspase 6 zu verhindern, indem sie jene Protease phosphoryliert, was ihren Funktionsverlust in diesem Fall erklärt. Folglich überlebt das hepatozelluläre Karzinom (Zhao et al., 2020).

5 Matrixmetalloproteinasen

Bei Matrixmetalloproteinasen (MMP) handelt es sich um Endopeptidasen, die auf der einen Seite auf Calcium angewiesen sind und auf der anderen Seite Zink enthalten. Sie spielen eine fundamentale Rolle beim Remodelling der extrazellulären Matrix (ECM), zu welcher auch Kollagenproteine, Proteoglykane, Elastine sowie Gelatine zählen. Gebildet werden die Metalloproteinasen in erster Linie von Bindegewebszellen, aber auch von Osteoblasten und Immunzellen wie den Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Dabei liegen sie nicht gleich als Enzym vor, sondern als Zymogen, welche dann mithilfe proteolytischer Spaltungen von anderen Proteasen in ihre aktive Form übergeführt werden. Insbesondere bei der Behandlung altersbedingter Erkrankungen des Bewegungsapparats soll die spezifische Hemmung von MMP mithilfe von Inhibitoren positive Resultate liefern (Verma und Hansch, 2007).

5.1 Matrixmetalloproteinasen bei Arthrosen

Bei Arthrosen sind Matrixmetalloproteinasen insofern wichtig, weil gewisse katabole Zytokine wie TNF α (Tumornekrosefaktor α) sowie TGF β (Transforming Growth Factor β) die Enzymaktivität über degenerative Veränderungen erhöhen können (Mitchell et. al., 1996). Aktivierte Matrixmetalloproteinasen 1 und 13 zersetzen daraufhin schrittweise die Tripelhelixstruktur von Kollagen II, den wichtigsten Bausteins der Knorpelmatrix, der den Knorpeln Festigkeit verleiht. Kollagendefekte können in der Regel nicht wieder behoben werden, was wiederum heißt, dass der Knorpelschaden dauerhaft bestehen bleibt. Die Kollagenfragmente, die nach der MMP-Proteolyse vorliegen, sind die beiden Gelatinasen A und B, welche noch weiter gespalten werden (Billinghurst et. al., 1997).

5.2 Matrixmetalloproteinase 3 bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose

Andere Metalloproteinasen, insbesondere MMP-3, haben wiederum einen positiven Einfluss auf die Knochendichte sowie den Umbau der Knochen. Matrixmetalloproteinase 3 ist nämlich imstande die Knochenmasse der Trabekel zu erhöhen.

Obwohl die Expression von MMP-3 in den Knochen bei Weitem nicht übermäßig ist, spielt jene Metalloproteinase nichtdestotrotz eine grundlegende Rolle, wenn es um die Regulation der Östrogenwirkung auf das Knochenwachstum bzw. den Knochenabbau geht. Im Falle einer operativen Entfernung der Ovarien von weiblichen Mäusen konnte in einer Studie festgestellt werden, dass die Protease die Knochenmineraldichte auf einem stabilen Level hielt. Der Knochenverlust war, wie die Studie vermerkte, nur minimal, also bei Weitem nicht so massiv wie man ihn nach einer Ovariectomie erwarten würde. Dies kann man dadurch erklären, dass Matrixmetalloproteinase 3 die Knochenresorption hemmt. Analog dazu ist auch die Knochenmineraldichte von Frauen des höheren Alters abhängig von Promotor-Polymorphismen des MMP3-Gens.

6 Cathepsine

Cathepsine sind Proteasen, die der Papainfamilie angehören. Jene Familie umfasst 11 Mitglieder und stellt damit nur einen Bruchteil aller im Organismus befindlichen Enzyme dar (Lovinec und Lenarčič, 2013). Die Proteasen spielen bei vielen physiologischen Vorgängen im Organismus eine maßgebliche Rolle, wie der Antigenpräsentation, Knochenresorption und Synthese von Hormonen sowie gewissen Wachstumsfaktoren (Masuya und Teno, 2010). Cathepsine sind lysosomalen Enzyme. In der menschlichen Zelle findet man sie daher vor allem in lysosomalen Kompartimenten vorzufinden, wo sie Proteinabbau betreiben. Auch außerhalb des Lysosoms können sich Cathepsine befindlich machen. Dies ist aber eher bei Erkrankungen der Fall (Yadati et al., 2020). Eine Dysregulation dieser Enzyme kann außerdem schwerwiegende Folgen haben, wie kardiometabolische Erkrankungen und Invasion sowie Metastasierung von Tumoren (Lovinec und Lenarčič, 2013).

Cathepsine können nicht nur zu diagnostischen Zwecken, sondern auch als Targets für Therapeutika eingesetzt werden. Cathepsine, vor allem Cathepsininhibitoren, sind ein aktueller Schwerpunkt der Forschung (Yadati et al., 2020).

6.1 Cathepsin B und dessen multifunktionale Rollen im Körper

Cathepsin B ist ein besonders vielseitiges Enzym und verfügt über mehr Fähigkeiten als die Karzinogenese. Unter anderem handelt es sich dabei um ein körpereigenes neuroprotektives Protein, welches vor der Entstehung von Morbus Alzheimer schützen kann, indem es die Menge an in den Plaques vorkommenden A β -Proteinen mittels Proteolyse verringert. Davon ist vor allem die A β -Proteinspezies 42 betroffen: Dabei handelt es sich nämlich um jene Spezies, die sehr stark aggregiert und besonders große Plaques ausbilden kann (Mueller-Steiner et al., 2006). Auch das bei Morbus Huntington vorkommende Huntingtin-Protein wird durch das Ausüben von Makroautophagie in seiner Menge reduziert (Liang et al., 2011).

Cathepsin B wird eigentlich als Zymogen sezerniert, welches dann erst in eine aktive Protease konvertiert werden muss (McCormick, 1993). Der Sekretionsmechanismus von Cathepsin B an der Krebszellenoberfläche wurde noch nicht vollständig geklärt. Bereits fest steht allerdings, dass beispielsweise die Makrophagen im Lungengewebe sowohl Cathepsin B als auch H, L und S ausschütten können (Chapman et al., 1994). Genauso können auch die zytotoxischen Makrophagen, die im Nervengewebe des Gehirns vorzufinden sind, Cathepsin B wie auch L produzieren (Kreutzberg, 1995). Cathepsin B spielt auch von Relevanz bei der Knochenresorption (Katunuma, 1997).

6.1.1 Cathepsin B bei der Krebsentstehung

Cathepsin B spielt vor allem bei der Chemotherapie eine grundlegende Rolle. Das Enzym kommt insbesondere in Lysosomen vor, also in jenen eukaryotischen Zellorganellen, die bei der Autophagie aktiv mitwirken.

Studien konnten nämlich eindeutig beweisen, dass überexprimiertes Cathepsin B den Vorgang der Tumordinvasion sowie der Ausbildung von Metastasen beeinflussen kann. Sind die Regulationsmechanismen von Cathepsin B also gestört, können einst gesunde Zellen mit der Zeit zu kanzerogenen Zellen werden. Cathepsin B kann mittels Proteolyse die extrazelluläre Matrix zerstören. Dieser Vorgang kann verhindert werden, indem Cathepsin B rechtzeitig in

seiner Aktivität gehemmt wird. Auch gegen das invasive Verhalten des Tumors kann so vorgegangen werden. Einen ähnlichen Effekt erzielt man auch, wenn man mithilfe von Antisense-RNA die Überexpression dieses Cathepsins inhibiert, wodurch der Tumor auch in seinem Wachstum gestoppt wird. Abgesehen davon ist es auch möglich gegen den Tumor vorzugehen, wenn man die Protease sowie ihren Rezeptor in Kombination hemmt (Gondi und Rao, 2013).

Es wird angenommen, dass Cathepsin B RNA alternativ spleißen kann (Matas et al., 1997). Das Gen dieser Protease besteht aus 13 Exons, einschließlich der beiden Exons 2a und 2b (Fong et al., 1992).

Durch Proteomanalysen konnte festgestellt werden, dass Cathepsin B auch bei knapp über der Hälfte der Patienten mit Magenkrebs in erhöhter Konzentration vorliegt, welche mit fortschreitendem Stadium immer mehr zunahm (Ebert et al., 2005). Proteomanalysen bei Brustkrebspatientinnen sowie jenen Patienten, die gegen Darmkrebs sowie Schilddrüsenkrebs zu kämpfen hatten, zeigten in der Literatur ebenso eine verstärkte Expression des Cathepsins. (McKerrow et al., 2000; Srisomsap et al., 2002; Wulfschle et al., 2002).

Eine ältere Studie vor etwa 2 Dekaden konnte beweisen, dass auch B16a-Melanomzellen eine amplifizierte Expression des Cathepsins aufweisen (Qian et al., 1994). Es wurde auch belegt, dass mehrere Promotoren die Cathepsinexpression regulieren können und nicht nur einer. Dies verstärkt die Annahme, dass Cathepsin B die Fähigkeit hat alternatives Spleißen an den 5'- bzw. 3'-Enden zu betreiben, wofür es mehr als nur einen Promoter benötigen würde (Frosch et al., 1999; Berquin und Sloane, 1996).

6.1.2 Cathepsin B und kompensatorische Effekte bei Tumoren

In der Literatur kommt auch das Phänomen eines kompensatorischen Effekts vor: Bei forcierter Senkung der Aktivität eines Enzyms, wie beispielsweise des Cathepsin B, wird verstärkt ein „Ersatzenzym“ gebildet, um diesen Verlust weitestgehend auszugleichen.

Anhand von transgenen Mäusen mit einem Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse und erzwungener Downregulation dieses Cathepsin konnte im Rahmen einer Studie festgestellt werden, dass durch die nur mehr geringe Cathepsin B-Aktivität weniger bzw. langsamer prä-maligne Läsionen entstanden (Gopinathan et al., 2012). Als Kompensation wurde jedoch, wie beobachtet wurde, in diesen Tumoren Cathepsin L hochreguliert, um quasi das praktisch nichtvorhandene Cathepsin B in seiner Funktion zu ersetzen.

In einem Mausmodell für Brustkrebs wurde in einer anderen Studie, bei der ebenso die Aktivität von Cathepsin B gedrosselt wurde, das Enzym durch Cathepsin X an der Zelloberfläche des Tumors ersetzt (Vasiljeva et al., 2006). Bei Cathepsin X handelt es sich strukturell gesehen, wie es auch bei Cathepsin B der Fall ist, um eine Carboxypeptidase. Ersteres Enzym kann daher einfach den Verlust des letzteren Enzyms an der Zelloberfläche des Tumors kompensieren.

Denselben Effekt hat man auch bei murinen Darmpolypen beobachtet: Indem man Cathepsin B effektiv inaktiviert hatte, konnte man zwar dem Entstehen weiterer Gewebewucherungen, also der Polyposis, entgegenwirken, aber es wurde wiederum kompensatorisch mehr Cathepsin X als Ausgleich für den Cathepsin-B-Mangel gebildet (Gounaris et al., 2008).

6.2 Cathepsin C

Cathepsin C ist eine weitere Cysteinprotease, die in lysosomalen Kompartimenten der Zelle vorkommt. Insbesondere wenn es um Entzündungsreaktionen bei chronischen Erkrankungen geht, ist diese Proteinase von fundamentaler Bedeutung, da ihr eine entzündungsfördernde Wirkung zugeschrieben wird, wodurch neutrophile Serinproteinasen aktiviert werden. Abgesehen davon begünstigt Cathepsin C auch das Auftreten zahlreicher Tumore (Aghdassi et al., 2023).

Cathepsin C wird im menschlichen Organismus insbesondere in der Niere, Leber und Milz sowie Lunge synthetisiert, geringe Mengen werden auch im Darm und in der Bauchspeicheldrüse gebildet. Auch die zellulären Hauptakteure des Immunsystems wie Neutrophile Granulozyten sowie Monozyten bzw. Makrophagen können das Enzym exprimieren (Rao et al., 1997).

6.2.1 Cathepsin C und Neutrophile Elastase (NE) bei Lungenerkrankungen im Alter

Chronische Lungenkrankheiten nehmen mit zunehmendem Alter zu und sind weit verbreitet. In der Pathogenese von chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD), zystischer Fibrose (CF) sowie Bronchiektasie spielt Cathepsin C eine Schlüsselrolle. Bei all diesen Erkrankungen liegt nämlich eine Dysbalance zwischen der Aktivität und der Inhibition einer Neutrophilen Serinprotease (NSP) vor, nämlich von Neutrophiler Elastase (NE) (Korkmaz et al., 2010). Cathepsin C ist in der Lage die Aktivierung dieser

entzündungsfördernden Elastase, welche zunächst als Zymogene vorliegt, mittels proteolytischer Spaltung am N-Terminus mitzusteuern (Guarino et al., 2017).

Wird die Expression von Cathepsin C angekurbelt, regt das auch die Aktivität der Neutrophilen Elastase an. Dadurch werden im Falle von COPD nicht nur Symptomgrad und Progression der Erkrankung zunehmen, sondern auch Begleiterscheinungen wie die Bildung von zähem Schleim werden verstärkt (Boucher, 2019). Neutrophile Elastase stimuliert dann folglich die Expression von MUC5AC, einem gelbildenden Mucin, während bzw. nach der Transkription. Dadurch werden noch größere Volumina an Schleim gebildet (Voynow et al., 1999).

Cathepsin C-aktivierte NE kann außerdem den CFT-Rezeptor (Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor) abbauen sowie den epithelialen Natriumkanal ENAC aktivieren. Die Produktion von hochviskosem Schleim wird dadurch weiter angetrieben (Le Gars et al., 2013; Caldwell et al., 2005).

Erhöhte Konzentrationen an Neutrophilen Granulozyten sowie Neutrophiler Elastase werden daher auch als Biomarker für COPD-Patienten sowie Patienten, die an zystischer Fibrose leiden, verwendet (Dicker et al., 2018; Gifford und Chalmers, 2014).

6.2.2 Cathepsin C und die indirekte Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen

Triggerfaktoren wie Tabakrauch oder Smog sorgen im Laufe des Lebens dafür, dass die Lungenflügel mit Neutrophilen Granulozyten infiltriert werden, wodurch Cathepsin C überexprimiert wird. Wie oben erwähnt, werden dadurch Serinproteasen wie die Neutrophile Elastase in ihrer Aktivität gefördert. Als Resultat liegt schlussendlich ein Ungleichgewicht zwischen der Proteinase und der Antiproteinase vor, wodurch die signifikant erhöhte NE-Aktivität den Schweregrad der Symptome weiterhin verschlimmert (Lomas, 2016). Letztendlich aktiviert die Neutrophile Elastase die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9). Das Enzym blockiert Alpha1-Antitrypsin, das eigentlich Neutrophile Elastase hemmen sollte. Diese Signalkaskade kann also durch eine erhöhte Cathepsin C-Aktivität außer Kontrolle geraten (Jackson et al., 2010; Hautamaki et al., 1997).

6.3 Cathepsin D

Bei Cathepsin D handelt es sich um eine Protease, die die Aminosäure Aspartat beinhaltet (Oberle et al., 2010). Eine erhöhte Cathepsin D-Aktivität in den verschiedensten Hirnarealen muss aber nicht zwingend mit Krankheiten assoziiert werden, denn dieses Enzym kann auch in Gesunden erhöht exprimiert werden, wenn es neuronale Eiweiße proteolytisch abbauen soll (Whitaker et al., 1981; Castino et al., 2005). Davon betroffen sind nicht nur denaturierte Proteine mit inkorrekt gefalteter Proteinfaltung, sondern auch Cathepsin L kann von Cathepsin D abgebaut werden (Dean, 1979; Turk et al., 1999). Die Expression von Cathepsin D im Gehirn kann in diesem Kontext auch vor Schlaganfällen bzw. längerfristigen Schäden, welche nach einem Schlaganfall auftreten könnten, schützen (Hossain et al., 2020).

Cathepsin D spielt auch bei der Autophagie eine Rolle. In Mäusen konnte in einer Studie festgestellt werden, dass ein Cathepsin D-Mangel die Fähigkeit zur Autophagie beeinträchtigen kann (Marques et al., 2020). Ein Knockout dieses Proteins hat in einer anderen Studie anhand von Tieren bewiesen, dass ein Knockout von Cathepsin D zum Ausbleiben der Autophagie führt, insbesondere in der Pankreas. Die Mäuse entwickelten folglich eine chronische Entzündung der Bauchspeicheldrüse (Iwama et al., 2021).

Cathepsin D ist insofern wichtig, weil ein Mangel schwerwiegende neurodegenerative Folgen haben kann. Ein Defizit führt, wie beobachtet wurde, entweder zu einem Verlust der Myelinscheide von Neuronen oder etwa zu einer verringerten Anzahl an Neuronen bei Säuglingen (Siintola et al., 2006). Auch Hirnnekrosen können nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren wird in der Literatur im Falle eines Mangels auch von einem verringerten proteolytischen Abbau des A β -Proteins, welches die für Morbus Alzheimer signifikanten Plaques entstehen lässt (Tian et al., 2014).

6.4 Cathepsin K

Cathepsin K, eine weitere Cysteinproteinase, ist vorwiegend in den Osteoklasten beim Abbau der Knochenmatrix anzutreffen. Das Enzym ist daher ein sehr attraktives molekulares Ziel bei der Therapie von Erkrankungen wie Osteoporose bzw. Osteoarthritis, die im Alter durch einen kontinuierlichen Abbau der Knochensubstanz bzw. durch verstärkten Knorpelabbau gekennzeichnet sind (Rocho et al., 2024).

6.4.1 Cathepsin K und Osteoporose

Cathepsin K ist die einzige Protease, die von Osteoklasten sezerniert wird und über die Fähigkeit verfügt die Trippelhelixstruktur von Typ 1-Kollagen proteolytisch zu spalten. Dieses Kollagen besteht fast zur Gänze aus organischer Knochensubstanz und Osteonektin (Garnero et al., 1998). Auch Typ 2-Kollagen, woraus der menschliche Knorpel besteht, kann von dieser Protease abgebaut werden (Kafienah et al., 1998). Abgesehen davon kann Cathepsin K die Matrixmetalloproteinase 9 aktivieren, welche ebenfalls imstande ist Knochenmatrix zu zersetzen (Christensen und Shastri, 2015). Mäuse mit einer verringerten Cathepsin K-Aktivität reagierten in der präklinischen Forschung auf diesen Mangel mit der Entwicklung einer Osteopetrose, also einer Anhäufung von demineralisierter Knochensubstanz, da die Knochenfresszellen diese nur ungenügend absorbieren konnten. Die Knochenmineralisation selbst blieb unbeeinträchtigt (Gowen et al., 1999).

Auch bei Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose war Cathepsin K in höheren Konzentrationen im Blut vorzufinden. Die Proteaseaktivität nahm aber mit der Einnahme von Alendronat, einem Bisphosphonat mit welchem die Knochenerkrankung Leitliniengemäß therapiert wird, ab. Die Cathepsin K-Aktivität spiegelt quasi die Aktivität der Knochenfresszellen wieder (Meier et al., 2006)

7 Mitochondriale Lon-Proteasen (LonP1)

Bei mitochondrialen Proteasen, auch als Mitoproteasen genannt, handelt es sich um höchstspezifische Enzyme, die das Proteasom des Organismus auf unterschiedlichste Art und Weise stark beeinflussen: Aufgrund ihrer proteolytischen Fähigkeit können sie Proteine auf der einen Seite zersetzen. Auf der anderen Seite können Mitoproteasen auch weitestgehend ihren Reifungsprozess steuern. Auch Mitophagie sowie Apoptose können von einzelnen Vertretern induziert werden (Anand et al., 2013).

Dass eine eindeutige Korrelation zwischen der Funktionsstörung einer Mitoprotease und dem gehäuftten Auftreten von Krebserkrankungen, Neurodegeneration und verstärktem Entzündungsgeschehen besteht, konnte bereits bewiesen werden (Rugarli et al., 2012; Goard und Schimmer, 2014; Bulteau und Bayot, 2011).

Auch der Alterungsprozess wird von der Proteolysefähigkeit dieser Enzyme beeinflusst (López-Otín et. al., 2013).

Die Gesamtheit der Mitoproteasen bildet das sogenannte Mitodegradom (Quesada et al., 2009), welches verschiedene Proteasesorten enthält. Nennenswert sind hierbei Cysproteasen, Metalloproteasen und Serproteasen (Abb. 1; Quirós et. al., 2015). Diese Enzyme können nochmals – etwas gröber – drei Untergruppen zugeordnet werden (Kremmidiotis, 2001):

- Intrinsische Proteasen sind das Herzstück des Mitodegradoms und für die überwiegende Mehrheit von proteolytischen Spaltungen verantwortlich.
- Transiente Proteasen wandern nur dann ins Mitochondrium ein, wenn die intrinsischen Proteasen Unterstützung bei der Proteinspaltung benötigen oder wenn gezielt Apoptose induziert werden soll.
- Pseudoproteasen sind, wie ihr Name andeutet, keine echten Proteasen per se. Obwohl sie chemisch-strukturelle Ähnlichkeiten zu ihnen aufweisen, mangelt es ihnen aber an katalytischen Fähigkeiten.

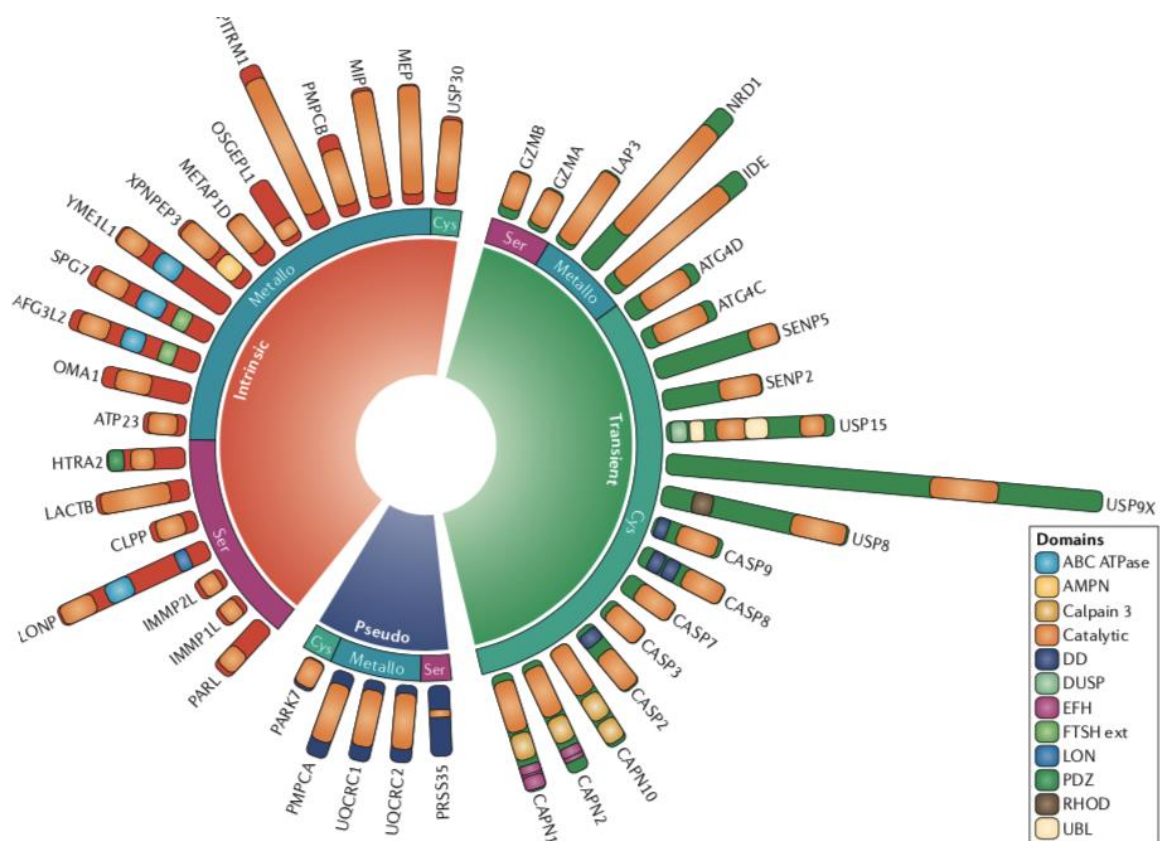


Abb. 2: Das komplette humane Mitodegradom (Quirós et. al, 2015)

Eine weitere wichtige Aufgabe der mitochondrialen Proteasen ist die Qualitätskontrolle von Proteinen. Dabei werden all jene, die entweder Defekte aufgrund inkorrektter Faltung oder radikalbedingte Schäden aufweisen, eliminiert. Hier ist wichtig anzumerken, dass nicht alle Mitoproteasen diese Aufgabe übernehmen können: Es muss sich dabei um spezielle ATP-abhängige Enzyme handeln, die – wenn sie zusammenkommen – Proteasekomplexe bilden, in denen das eingeschlossene Protein letztendlich beseitigt wird. Das bekannteste Beispiel dafür in der Literatur ist die mitochondriale Serinpeptidase namens Lonprotease (LONP) (Gerdes et. al., 2012; Lu et. al., 2003; Venkatesh et. al., 2012).

In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit unzureichend LONP1 Störungen der oxidativen Phosphorylierung aufwiesen, welche bekanntlich ATP als Endprodukt liefert, das wiederum von LONP1 benötigt wird. Auch Deletionen von einzelnen Nukleotiden von LONP1 erhöhen das Risiko der Lethalität des murinen Embryos (Quirós et. al., 2014).

7.1 Pro-Aging und Anti-Aging durch Mitoproteasen

Mit zunehmendem Alter nehmen Mitochondrienfunktion und Anzahl dieser Zellorganellen ab. Die Häufigkeit, mit der Enzymdefekte auftreten, nimmt wiederum signifikant zu (Bratic und Larsson, 2013). Infolgedessen wird die Qualitätskontrolle von Proteinen beeinträchtigt. Es können immer mehr geschädigte bzw. fehlerhaft gefaltete Proteine überleben. Insbesondere LONP1 wird mit dem Alterungsprozess assoziiert: Deletionen des LONP1-Gens, welches übrigens in bestimmten Hefearten codiert wird, kurbeln den zeitlichen Alterungsprozess zusätzlich an (Erjavec et. al., 2013). Dessen Überexpression in Pilzarten wie *Podospora anserina* steigert konträr dazu die Lebenserwartung und verbessert die allgemeine gesundheitliche Verfassung. Mitoproteasen können also nicht nur Pro-Aging-, sondern auch Anti-Aging-Eigenschaften besitzen (Luce und Osiewacz, 2009).

Auch aktuellere Studien wurden gefunden, die sich tiefer mit den Zusammenhängen zwischen Mitoproteasen und Aging in genetisch veränderten Mäusen auseinandergesetzt haben (Kang et. al., 2013). Es kam heraus, dass Deletionen der für LONP codierenden Gene auch schwerwiegende Defekte bei Mäusen auslösen konnten. Neurodegenerationen, Kachexie sowie Atrophie, welche alle im Endeffekt die Lebensdauer stark verkürzten, wurden erwähnt (Gispert et. al., 2013; Maltecca et. al., 2008).

7.2 Neurodegeneration

Mitoproteasen spielen auch eine große Rolle in der Pathogenese von Morbus Parkinson: Mutationen der PARK7- und PARK13-Gene, welche für die Parkinson-Proteine 7 und 13 codieren, erschweren die Beseitigung von α -Synuclein-Ablagerungen in den Mitochondrien, was wiederum den für die Krankheit typischen Nervenzellverlust triggert (Bonifati et. al., 2003; Strauss et. al., 2005). PARK13-Genmutationen können zusätzlich Tremor verursachen (Unal et. al., 2014).

Auch in Mäusen ist das PARK13-Gen von essentieller Bedeutung. Missense-Mutation können hier zu schweren neuromuskulären Störungen führen, während Deletionen parkinsonähnliche neurodegenerative Symptome verursachen (Jones et. al., 2003; Martins et. al, 2004).

8 Serinproteasen

Serinproteasen sind eine sehr umfangreiche Enzymklasse mit einem aktiven Serinrest als Substratbindungsstelle. Sie können je nach Lokalisation zwei Untergruppen zugeteilt werden: Man unterscheidet zwischen die Serinproteasen, die sezerniert werden von jenen, die in der Zellmembran bzw. an der Oberfläche der Zelle verankert vorliegen.

Eine abnormale Expression dieser körpereigenen Proteine im Alter wird mit dem Auftreten zahlreicher Erkrankungen assoziiert, insbesondere Krebserkrankungen. (Sharma und Bansal, 2023).

8.1 Serinproteasen bei Krebserkrankungen und in der Diagnostik

8.1.1 Matriptase

Die Matriptase ist eine Serinprotease, die bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielt. Sie wird vor allem in epithelialen Tumoren überexprimiert (Zoratti et al, 2015). Sie ist in der Lage tumorinduzierende Onkoproteine wie uPA und auch PAR2 zu aktivieren, aber auch Matrixmetalloproteinasen.

Matriptase steht mit ihrem Inhibitor HAI-1 (HGF activator inhibitor 1) im engen Wechselspiel, indem der Hemmstoff mit dem Enzym einen Komplex bildet und dessen proteolytische Aktivität dadurch stoppt. Das Verhältnis dieser beiden Substanzen ist in entarteten Krebszellen

um ein Vielfaches erhöht, was in gesunden Zellen nicht der Fall ist. Dies führt zur Fortschreitung der Krebserkrankung und Metastasierung (Zuo et al., 2019). Insbesondere in Tumoren bei Brust- und Prostatakrebs ist wird dieses Enzym überexprimiert (Wu et al., 2010).

8.1.2 Hepsin

Hepsin ist auch mit dem Akronym TMPRSS1 synonym. Es handelt sich hierbei um eine Protease, die bei sowohl bei physiologischen Vorgängen im Organismus wie der Blutkoagulation und Zellproliferation eine bedeutende Rolle spielt, aber auch bei diversen Krebsarten: Bei Brust-, Prostata- und Eierstockkrebs wird dieses Enzym überexprimiert (Lu et al., 2022). Sowohl In-Vivo- als auch In-Vitro-Studien konnten belegen, dass dieses Enzym eine grundlegende Rolle bei den Schritten der Tumordinvasion und Metastasierung spielt. Insbesondere bei metastasiertem Prostatakrebs wird Hepsin stark überexprimiert (Willbold et al., 2019).

Hat sich ein Tumor bereits manifestiert, ist Hepsin auch weiterhin am tumoralen Stoffwechsel beteiligt, indem es sich an der Zellproliferation, Signaltransduktionskaskade von Rezeptortyrosinkinase und am Entzündungsgeschehen beteiligt (Pal et al., 2006).

8.1.3 Prostatin

Prostatin ist eine Serinprotease mit einem Glucosylphosphatidylinositol-Molekül, also ein GPI-Anker. Dieses Enzym ist zugleich auch ein Natriumkanal im epithelialen Gewebe (Tamir et al., 2016; Bao et al., 2022).

Um aber funktionsfähig zu werden, muss Prostatin von Matriptase zunächst aktiviert werden (Selzer-Plon et al., 2009).

Patienten mit Gebärmutterhals-, Harnblasen- und Eierstockkrebs haben in der Regel höhere Prostatinlevels als Gesunde. Insbesondere im Rahmen der Früherkennung von Eierstockkrebs kann man sich den Prostatin-Wert als Tumormarker heranziehen, der bei jenen Patientinnen in der Regel erhöht ist (Tamir et al., 2016).

8.1.4 Testisin

Testisin liegt im gesunden Gewebe in geringeren Konzentrationen als es bei bösartigen Tumoren der Fall ist. Die einzige Ausnahme stellt Hodenkrebs da: Hier ist Testisin praktisch nicht vorhanden.

Insbesondere Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs weisen eine indirekte Proportionalität zur vorhandenen Testisinkonzentration auf (Yeom et al., 2010). Im Anfangsstadium ist hier nämlich eine höhere Konzentration der Serinprotease vorzufinden als bei Tumoren, die bereits metastasiert sind (Conway et al., 2019).

8.1.5 Human airway trypsin-like protease (HAT)

HAT ist nicht nur eine ebenfalls Serinprotease und Biomarker zugleich, der insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen von Bedeutung ist. Im Gegensatz zu anderen Marken ist das Enzym bei fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom nicht mehr oder nur in sehr geringem Ausmaß nachweisbar (Duhamel et al., 2016). Dies ist insbesondere bei Speiseröhrenkrebs der Fall (Miller et al., 2014).

8.1.6 Urokinase Plasminogen Activator (uPA)

Bei Urokinase Plasminogen Activator handelt es sich um ein weiteres Enzym, das Zymogene (Plasminogen) in aktive Enzyme (Plasmin) konvertieren kann (Mahmood et al., 2018). Das Enzym ist vor allem bei Angiogenese und Fibrinolyse von Bedeutung (Poddar et al., 2017). Aktives Plasmin spielt in weiterer Folge eine wichtige Rolle in Signaltransduktionskaskaden der Metastasierung (Mahmood et al., 2018).

uPA kommt bei nahezu allen Krebsarten vor: Eine Überexpression fördert das Tumorstadium und dessen Metastasierung (Madunic. 2018). Nach der Bindung von uPA an dessen Rezeptor, wird die Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionskaskade in Gang gebracht, welche die Bildung von Tochtergeschwulsten im Organismus fördert (Poddar et al., 2017). Insbesondere bei Bauchspeicheldrüsenkrebs ist die Urokinase Plasminogen Activator in hohem Ausmaß vorzufinden. Man geht sogar davon aus, dass Störungen der Proteolysefunktion dieser Protease die Entstehung von Karzinomen der Pankreas auslösen kann (Kumar et al., 2022).

Beim Mammakarzinom spielt uPA die Rolle eines prognostischen Markers (Banys-Paluchowski et al., 2019).

8.2 Serinproteasen bei Arthritis

Rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis sind die geläufigsten Arthritisformen, deren Inzidenz mit zunehmendem Alter ansteigt. Obwohl beide entzündliche Erkrankungen einer eigenen Pathogenese unterliegen, führen sie schlussendlich zum selben Ziel: der proteolytischen Zerstörung von Knorpelmaterial, welches sich aus extrazellulärer Matrix zusammensetzt, an Gelenken sowie Bandscheiben. Obwohl Metalloproteinasen die wichtigste Rolle bei der Knorpelzerstörung im Rahmen dieser Krankheiten spielen, haben aber auch Serinproteinasen eine essenzielle Bedeutung: Sie können Metalloproteinasen zusätzlich aktivieren, wodurch in weiterer Folge eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst wird und sind auch aktiv an der Zersetzung des Knorpels beteiligt (Wilkinson et al., 2017b).

Bei beiden Erkrankungen sind Serinproteinasen, die in den unterschiedlichsten Abwehrzellen des Immunsystems vorzufinden sind, bedeutsam. Neutrophilen Granulozyten beherbergen nämlich drei verschiedene Enzyme:

- Proteinase 3
- Cathepsin G
- Neutrophilelastase.

Insbesondere die Neutrophilelastase weist einen erhöhten Blutplasmaspiegel bei Verschlechterung der Arthritis-symptomatik auf (Huet et al., 1992; Elsaid et al., 2003).

Durch Hemmung dieses Enzyms kann wiederum die Knorpelvernichtung weitestgehend gebremst werden (Janusz und Durham, 1997). In Studien konnte auch gezeigt werden, dass es einen starken Zusammenhang zwischen der Neutrophilelastase und Metalloprotease gibt: Neutrophilelastase ist in der Lage den Inhibitor von Metalloproteinasen, nämlich TIMP1, zu unterdrücken, wodurch letztere ungehindert die extrazelluläre Matrix proteolytisch zersetzen können (Nagase et al., 1997).

Granzyme, die ebenfalls zur Klasse der Serinproteinasen gehören, sind – wie ihr Name bereits andeutet – in Granula der natürlichen Killerzellen sowie CD8-Lymphozyten vorzufinden. Sie spielen eine aktive Rolle bei der Apoptoseinduktion. Man unterscheidet zwischen Granzym A und Granzym B, wobei beide dieser Enzyme im Falle einer Arthritis detektierbar sind. Es existiert eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß dieser bei Arthritis nachweisbaren Granzyme und dem Schweregrad der Gelenkserosion bei Patienten. Granzym A und B sind imstande Bestandteile vom Knorpel direkt zu zersetzen (Ronday et al., 2001; Froelich et al.,

1993). Anhand von murinen Arthrismodellen konnten klinische Studien belegen, dass bei einem Granzym A-Mangel weniger Inflammation ausgelöst wird, wodurch in weiterer Folge mehr Knorpelmaterial verschont bleibt. Es konnte auch bewiesen werden, dass Granzym A die Bildung von Osteoklasten, den sogenannten „Knochenfresszellen“, induzieren kann (Santiago et al., 2017).

Serinproteasen, die in Mastzellen vorkommen, sind Chymase und Tryptase. Ihre Eigenschaften und Kernfunktionen ähneln jenen von Chymotrypsin und Trypsin (Caughey, 2016). Diese beiden Serinproteasen können die Vorstufen von Matrixmetalloproteinasen, abgekürzt proMMPs, aktivieren (Milner et al., 2008). Tryptase kann zusätzlich Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen. (Milner et al., 2008). Hier ist interessant, dass die Verabreichung von Tryptasehemmern in Tierversuchen kaum einen Einfluss auf die Gelenkszerstörung hatte, sondern lediglich eine Senkung der Entzündungsparameter bezwecken konnte (Denadai-Souza et al., 2017).

Tryptase ist außerdem in der Lage den Protease-aktivierten Rezeptor PAR2 über Proteolyse zu aktivieren, was letztendlich zu noch mehr Knorpelabbau führt. Dieser Rezeptor spielt bei Entzündungsprozessen und somit in der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis eine besondere Rolle (Palmer et al., 2007). Das macht ihn nicht nur zu einem interessanten molekularen Target im Rahmen der Therapie, sondern auch für präventive Zwecke. Abgesehen von der bereits erwähnten Tryptase können auch Matriptase oder Trypsin PAR2 aktivieren (Yau et al., 2013). PAR2 kommt vor allem in den Chondrozyten des Knorpels vor (Xiang et al., 2006). Ein Mangel an PAR2 in Mäusen wird mit einer Senkung von Gelenksentzündungen und somit besser geschütztem Knorpelgewebe assoziiert (Ferrell et al., 2003). Auch eine verlangsamte Exophytenreifung sowie Kallusbildung bei Knochenfrakturen wird mit einem PAR2-Mangel in Verbindung gebracht (Huesa et al., 2016; O'Neill et al., 2012; Georgy et al., 2012). Indem man die PAR2-Aktivierung also umgeht oder gar auslöst, könnte man einen schweren Arthritisverlauf eindämmen und Knorpelmaterial mit der Zeit regenerieren (Yau et al., 2013).

8.3 Serinproteasen bei Zystischer Fibrose (CF)

Bei Patienten mit diagnostizierter zystischer Fibrose, auch Mukoviszidose genannt, ist die proteolytische Aktivität stets erhöht. Dies führt in der Regel zu Bronchiektasie: Dabei

schwellen die Bronchien chronisch an, was zu Infektionen, Entzündungen und Schleimbildung in den erweiterten Atemwegen führt (Rowe et al., 2005; Gibson et al., 2013).

Der zystischen Fibrose liegt eine Mutation des CFTR-Gens (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Gen) zugrunde (Tilly et al., 1992). Der CFTR-Kanal ist dadurch nicht mehr funktionsfähig, weshalb Elektrolyten wie Natrium und Chlorid unkontrolliert über ihre Ionenkanäle in die Zellen ein- bzw. ausströmen können. Dies erklärt auch den hartnäckigen Mukus, der sich bei Mukoviszidose-Patienten bildet (Rowe et al., 2005; Gibson et al., 2013; Tilly et al., 1992; Kreda et al., 2012).

Charakteristisch ist die erhöhte Zahl der neutrophilen Granulozyten bei den betroffenen Patienten, was wiederum auch auf mehr vorhandenen Serinproteasen im Blutplasma schlussfolgern lässt. Auch ein Gleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen, wie es in der Regel bei Gesunden der Fall ist, gibt es bei erkrankten Menschen nicht mehr: Neutrophile Proteasen liegen eindeutig in der Mehrheit vor. Aus diesem Grund erhalten Patienten mit zystischer Fibrose vermehrt synthetische Antiproteasen im Rahmen ihrer Therapie, damit im Organismus wieder Homöostase angestrebt werden kann.

Zur Gruppe der neutrophilen Serinproteasen zählen Cathepsin G, Proteinase 3 sowie neutrophile Elastase (Korkmaz et al., 2008). Diese drei „Proteasen“ werden streng genommen eigentlich als Zymogene definiert werden, da es sich zunächst noch um inaktive Enzymvorstufen handelt, die erst nach einer zweistufigen posttranslationalen Modifikation über Cathepsin G bereitgestellt werden (Pham und Ley, 1999; Wolters et al., 2001; Adkison et al., 2002; Skold et al., 2002; Gullberg et al., 1995).

9 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Veranschaulichung des vielfältigen Spektrums an Aufgaben unterschiedlichster Proteasenklassen und was geschehen kann, wenn diese – wie es mit zunehmender Zeit üblich ist – versagen.

Calpaine sind beispielsweise calciumabhängige Cysteinproteasen. Man unterscheidet hier zwischen den klassischen bzw. konventionellen sowie den unkonventionellen Enzymen. Eine Aminosäuresequenz kann von dieser Proteinasen zwar nicht erkannt werden. Nichtsdestotrotz übernehmen sie sehr viele Rollen im Organismus. Calpain-6 und Calpain-10 gelten beide als unkonventionelle Enzyme. Ist Calpain-6 in einem geringen Ausmaß im Körper vorhanden, so kann das durchaus vorteilhaft für die Skelettmuskulatur sein, da sich die Abwesenheit des Enzyms die Regenerationsfähigkeit beschleunigt. Calpain-10 erhöht wiederum das Risiko an einer längerfristigen Hyperglykämie zu leiden und mit der Zeit Diabetes mellitus (Typ II) zu entwickeln. In der aktuellen Forschung sind gerade Calpaininhibitoren ein interessantes Themengebiet, sie die atherogene Wirkung der Calpaine reduzieren und somit dem Auftreten einer Atherosklerose entgegenwirken können.

Calpain-1 und -2 können wiederum das Auftreten von Tumoren begünstigen. Insbesondere Nierenzellkarzinome und Glioblastome mit aggressiver Metastasierung wurden beobachtet. Hierbei ist vor allem die Menge des proteolytisch zersetzten Filamin A entscheidend. Bei Prostatakrebs eignet es sich besonders Calpain-1 zu hemmen. Auch Neuroinflammation kann durch diese Enzymklasse begünstigt werden, weil die Calpainaktivität mit zunehmendem Alter ebenfalls steigt. Zusätzlich können auch die Mikroglia, welche auch als Gehirnphagozyten bezeichnet werden, aktiviert werden, woraufhin die Synthese von neurotrophen Faktoren gedrosselt wird. Treg-Zellen wiederum wirken, was Neurodegeneration betrifft, eher protektiv. Auch Hypertrophien des Myokards können Calpain-1 zugeschrieben werden.

Bei den Caspasen ist Caspase-6 die bis dato am besten erforschte Proteinase: Sie ist imstande neuronale Zellkerne zu schrumpfen und fragmentieren zu lassen. Das Risiko für die Alzheimer-, Parkinson- und Huntington-Erkrankung nimmt dadurch zu. Andererseits hat die Caspase 6 auch die Fähigkeit entartete Zellen zu eliminieren, was darauf zurückzuführen ist, dass sie die PANoptose regulieren kann. Zusammen mit gewissen Polyphenolen und Zytostatika/Antineoplastika kann die Caspase-6-Aktivität zusätzlich gefördert werden. Diesen Effekt nutzt man bei Krebspatienten zu ihrem Vorteil.

Die Matrixmetalloproteinasen 1 und 13 zersetzen Knorpelgerüst, weshalb sie insbesondere bei Erkrankungen des Bewegungsapparates (Arthrose, Osteoporose) von großer Bedeutung sind. Insbesondere bei Osteoporose scheint die Metalloproteinase 3 eine knochenprotektive Wirkung zu haben: Sie erhöht nämlich die Knochendichte und schützt auch vor der knochenabbauenden Wirkung des weiblichen Sexualhormons Östrogen.

Cathepsine gehören zur Enzymfamilie der Papaine und es handelt sich hierbei um lysosomale Enzyme. Cathepsin B schützt vor der Alzheimererkrankung, indem es A β -Proteine abbaut, wodurch sich keine Plaques entwickeln können. Auch das Risiko an Chorea Huntington zu erkranken nimmt bei verstärkter Anwesenheit von Cathepsin B ab, da das Huntingtonprotein über Autophagie ebenfalls zunichte gemacht wird. Das Enzym kann außerdem auch alternativ spleißen und wird bei Nichtvorhandensein von seinen Mitspielern, Cathepsin L bzw. Cathepsin X, ausgetauscht. Cathepsin C wiederum erhöht die Chancen an Krebs zu erkranken. Es kann die Elastase aktivieren, wodurch der Körper mit einer Exazerbation der COPD-Symptomatik reagiert und mehr zähflüssigen Mukus bildet. Cathepsin D muss nicht nur in Älteren oder Kranken überexprimiert werden: Auch Gesunde können hohe Plasmaspiegel jenes Enzyms aufweisen, was anzustreben ist, da es so vor Hirnnekrosen und Hirninfarkten schützt.

Cathepsin K wird von den Knochenfresszellen sezerniert und übernimmt eine recht dominante Rolle was den Abbau der Knochenmatrix anbelangt. Daher eignet es sich als hervorragendes Target für die Osteoporosetherapie. Bis dato sind aber immer noch keine Inhibitoren am Arzneimittelmarkt zugelassen.

Mitoproteasen, insbesondere die Lon-Protease-1, induzieren Apoptose und Mitophagie. Bei Funktionsstörungen reagiert der Körper oft mit verstärkter Inflammation. Die mitochondrialen Proteasen, die abhängig von ATP sind, haben vor allem bei der Qualitätskontrolle der Proteine eine entscheidende Funktion. Auch ist wichtig zu erwähnen, dass Deletionen des Lon-P1-Gens den physiologischen Alterungsprozess beschleunigen können, während eine Überexpression diesen verlangsamen.

Serinproteasen sind mit Abstand die umfangreichste Proteasenklasse. Sie enthalten ein Serinrest, an das ihr Substrat andocken kann. Einige Beispiele hierzu sind Matriptase, Human Airway Trypsin-like Protease (HAT), die oft mit Krebs assoziiert werden. Auch Rheumatoide Arthritis sowie Osteoarthritis wird in Verbindung mit Serinproteasen gebracht – vermutlich,

weil sie Matrixmetalloproteinasen aktivieren können, welche den Knorpelabbau wiederum verstärken können.

Obwohl die Proteaseforschung beachtliche Fortschritte in den letzten Jahren gemacht hat, sind für die Zukunft weitere Studien notwendig, damit man noch effektiver gegen die *Hallmarks of Aging* vorgehen kann. Diese kann und wird man natürlich niemals vollkommen beseitigen können, aber sie bieten nichtsdestotrotz sehr gute Ansatzpunkte für Therapeutika (Inhibitoren bzw. Aktivatoren der jeweiligen Protease).

10 Literaturverzeichnis

- Aghdassi AA, Pham C, Zierke L, Mariaule V, Korkmaz B, Rhimi M. Cathepsin C role in inflammatory gastroenterological, renal, rheumatic, and pulmonary disorders. *Biochimie*. 2024 Jan;216:175-180. doi: 10.1016/j.biochi.2023.09.018. Epub 2023 Sep 26. PMID: 37758158.
- Anand, R., Langer, T. & Baker, M. J. Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 195–204 (2013).
- Anderson KM, Olson KE, Estes KA, Flanagan K, Gendelman HE, Mosley RL. Dual destructive and protective roles of adaptive immunity in neurodegenerative disorders. *Translational Neurodegeneration*. 2014. ; 3: 25
- Averna M., De Tullio R., Salamino F., Minafra R., Pontremoli S., Melloni E. Age-dependent degradation of calpastatin in kidney of hypertensive rats. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(42):38426–38432. doi: 10.1074/jbc.M101936200
- Bäck M., Yurdagul A., Jr., Tabas I., Öörni K., Kovanen P.T. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: Mediators and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cardiol.* 2019;16:389–406. doi: 10.1038/s41569-019-0169-2.
- Balkwill F, Coussens LM (2004) Cancer: an inflammatory link. *Nature* 431(7007):405–406
- Bayramci N.S., Açık L., Kalkan C., Yetkin I. Investigation of glucocorticoid receptor and calpain-10 gene polymorphisms in Turkish patients with type 2 diabetes mellitus. *Turk. J. Med Sci*. 2017;47:1568–1575. doi: 10.3906/sag-1701-174.
- Berquin IM, Sloane BF. Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol*. 1996;389:281–94.
- Bhuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K. Chronic beta-AR activation-induced calpain activation and impaired eNOS-Akt signaling mediates cardiac injury in ovariectomized female rats. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13:275–286.

- Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M et al (1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 99:1534–1545
- Boucher R.C. Muco-obstructive lung diseases; *N. Engl. J. Med.*, 380 (2019), pp. 1941-1953, 10.1056/NEJMra1813799
- Braun C, Engel M, Seifert M, et al. Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type. *Int J Cancer*. 1999 [Feb 19];84(1):6–9. DOI:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990219\)84:1<6::AID-IJC2>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990219)84:1<6::AID-IJC2>3.0.CO;2-T)
- Brochard V, Combadiere B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthet V, et al. Infiltration of CD4⁺ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2009. ; 119: 182–192.
- Brown A.E., Yeaman S.J., Walker M. Targeted suppression of calpain-10 expression impairs insulin-stimulated glucose uptake in cultured primary human skeletal muscle cells. *Mol. Genet. Metab*. 2007;91:318–324.
- Bullock R. Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer disease: the evidence to date. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 2006;20(1):23–29. doi: 10.1097/01.wad.0000201847.29836.a
- Bulteau, A. L. & Bayot, A. Mitochondrial proteases and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 595–601 (2011).
- Cai L, Li Q, Li W, et al. Calpain suppresses cell growth and invasion of glioblastoma multiforme by producing the cleavage of filamin A. *Int J Clin Oncol*. 2020 Jun;25(6):1055–1066. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10147-020-01636-7>
- Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol*. 2014;16:55–65. doi: 10.1038/ncb2883

- Caldwell R.A., Boucher R.C., Stutts M.J. Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na⁺ channels and increases airway epithelial Na⁺ transport
- Castino, R.; Davies, J.; Beaucourt, S.; Isidoro, C.; Murphy, D. Autophagy is a prosurvival mechanism in cells expressing an autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus mutant vasopressin transgene. *FASEB J.* 2005, *19*, 1021–1023.
- Cervello M, Bachvarov D, Lampiasi N, Cusimano A, Azzolina A, McCubrey JA, Montalto G. Novel combination of sorafenib and celecoxib provides synergistic anti-proliferative and pro-apoptotic effects in human liver cancer cells. *PLoS One.* 2013 Jun 12;8(6):e65569. doi: 10.1371/journal.pone.0065569. PMID: 23776502; PMCID: PMC3680460.
- Chan JY, Phoo MS, Clement MV, Pervaiz S, Lee SC. Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis: the roles of caspase-6 and p53. *Cancer Biol Ther.* 2008 Aug;7(8):1305-12. doi: 10.4161/cbt.7.8.6302. Epub 2008 Aug 16. Erratum in: *Cancer Biol Ther.* 2020 Aug 2;21(8):767. PMID: 18497562.
- Chapman HA, Jr, Munger JS, Shi GP. The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:S155–S159.
- Chen HH, Liu P, Auger P, Lee SH, Adolfsson O, Rey-Bellet L, Lafrance-Vanasse J, Friedman BA, Pihlgren M, Muhs A, Pfeifer A, Ernst J, Ayalon G, Wildsmith KR, Beach TG, van der Brug MP. Calpain-mediated tau fragmentation is altered in Alzheimer's disease progression. *Sci Rep.* 2018 Nov 13;8(1):16725. doi: 10.1038/s41598-018-35130-y. PMID: 30425303; PMCID: PMC6233188.
- Chen J, Liu X. The role of interferon gamma in regulation of CD4⁺ T-cells and its clinical implications. *Cell Immunol.* 2009;254(2):85-90. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.09.001. Epub 2008 Oct 10. PMID: 18848698.
- Christensen J, Shastri VP. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K. *BMC Res Notes.* 2015 Jul 29;8:322. doi: 10.1186/s13104-015-1284-8. PMID: 26219353; PMCID: PMC4518881.

Cipolat, S. *et al.* Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome *c* release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163–175 (2006).

D.A. Lomas Does protease-antiprotease imbalance explain chronic obstructive pulmonary disease? *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 13 (Suppl 2) (2016), pp. S130-S137, 10.1513/AnnalsATS.201504-196KV

Davis J, Martin SG, Patel PM, et al. Low calpain-9 is associated with adverse disease-specific survival following endocrine therapy in breast cancer. *BMC Cancer*. 2014 [Dec 23];14(1):995. DOI:<https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-995>.

Dean, R.T. Lysosomes and protein degradation. *Ciba Found. Symp.* 1979, 139–149.

Dear N., Matena K., Vingron M., Boehm T. A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: Implications for calpain regulation and evolution. *Genomics*. 1997;45:175–184. doi: 10.1006/geno.1997.4870.

Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation*. 2018 Jul 6;15(1):199. doi: 10.1186/s12974-018-1235-0. PMID: 29980212; PMCID: PMC6035417.

Dicker A.J., M.L. Crichton, E.G. Pumphrey, A.J. Cassidy, G. Suarez-Cuartin, O. Sibila, *et al.* Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease; *J. Allergy Clin. Immunol.*, 141 (2018), pp. 117-127 doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305363. doi: 10.1074/jbc.M503259200. DOI:<https://doi.org/10.1023/A:1007160702275>. DOI:<https://doi.org/10.3892/or.2019.7121>.

Ebert MR, Kruger S, Fogeron ML, Lamer S, et al. Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics*. 2005;5:1693–1704.

- Elgueta D, Contreras F, Prado C, Montoya A, Ugalde V, Chovar O, et al. Dopamine Receptor D3 Expression Is Altered in CD4(+) T-Cells From Parkinson's Disease Patients and Its Pharmacologic Inhibition Attenuates the Motor Impairment in a Mouse Model. *Frontiers in immunology*. 2019. ; 10: 981.
- Erjavec, N. *et al.* Deletion of the mitochondrial Pim1/Lon protease in yeast results in accelerated aging and impairment of the proteasome. *Free Radic. Biol. Med.* 56, 9–16 (2013).
- Ferreira A. Calpain dysregulation in Alzheimer's disease. *ISRN Biochem.* 2012 Oct 16;2012:728571. doi: 10.5402/2012/728571. PMID: 25969760; PMCID: PMC4393001.
- Fong D, Chan MM, Hsieh WT, et al. Confirmation of the human cathepsin B gene (CTSB) assignment to chromosome 8. *Hum Genet.* 1992;89:10–2.
- Foteinos G., Hu Y., Xiao Q., Metzler B., Xu Q., L Z., S I.B., T C., B Z., Q X., et al. Rapid Endothelial Turnover in Atherosclerosis-Prone Areas Coincides With Stem Cell Repair in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation.* 2008;117:1856–1863. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.746008.
- Franceschi C, Bonafe M, Valensin S et al (2000) In- flamm-aging. An evolutionary perspective on im- muno senescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244–154
- Friedrich E.E., Hong Z., Xiong S., Zhong M., Di A., Rehman J., Komarova Y.A., Malik A.B. Endothelial cell Piezo1 mediates pressure-induced lung vascular hyperpermeability via disruption of adherens junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116:12980–12985. doi: 10.1073/pnas.1902165116.
- Frosch BA, Berquin I, Emmert-Buck MR, et al. Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B. *APMIS.* 1999;107:28–37.

- Galante S, Dickinson LA, Mian IS, Sikorska M, Kohwi-Shigematsu T. 14. 2001. SATB1 cleavage by caspase 6 disrupts PDZ domain-mediated dimerization, causing detachment from chromatin early in T-cell apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 21:5591–604
- Galvez AS, Diwan A, Odley AM, Hahn HS, Osinska H, Melendez JG, Robbins J, Lynch RA, Marreez Y, Dorn GW., 2nd Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circ Res.* 2007;100:1071–1078.
- Gao A, McCoy HM, Zaman V, Shields DC, Banik NL, Haque A. Calpain activation and progression of inflammatory cycles in Parkinson's disease. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2022 Jan 13;27(1):20. doi: 10.31083/j.fbl2701020. PMID: 35090325; PMCID: PMC9723550.
- Gao X, Mao Y-H, Xiao C, et al. Calpain-2 triggers prostate cancer metastasis via enhancing CRMP4 promoter methylation through NF-kappaB/DNMT1 signaling pathway. *Prostate.* 2018 Jun;78(9):682–690. DOI:https://doi.org/10.1002/pros.23512.
- Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, Foged NT, Delmas PD, Delaissé JM. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem.* 1998 Nov 27;273(48):32347-52. doi: 10.1074/jbc.273.48.32347. PMID: 9822715.
- Gifford A.M., J.D. Chalmers The role of neutrophils in cystic fibrosis *Curr. Opin. Hematol.*, 21 (2014), pp. 16-22, 10.1097/MOH.0000000000000009
- Gispert, S. *et al.* Loss of mitochondrial peptidase Clpp leads to infertility, hearing loss plus growth retardation via accumulation of CLPX, mtDNA and inflammatory factors. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4871–4887 (2013).
- Goard, C. A. & Schimmer, A. D. Mitochondrial matrix proteases as novel therapeutic targets in malignancy. *Oncogene* 33, 2690–2699 (2014).
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. The calpain system. *Physiol. Rev.* 2003;83:731–801. doi: 10.1152/physrev.00029.2002.

- Gondi CS, Rao JS. Cathepsin B as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 Mar;17(3):281-91. doi: 10.1517/14728222.2013.740461. Epub 2013 Jan 8. PMID: 23293836; PMCID: PMC3587140.
- Gopinathan A, Denicola GM, Frese KK, Cook N, et al. Cathepsin B promotes the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Gut*. 2012;61:877–884
- Gounaris E, Tung CH, Restaino C, Maehr R, et al. Live imaging of cysteine-cathepsin activity reveals dynamics of focal inflammation, angiogenesis, and polyp growth. *PLoS One*. 2008;3:e2916.
- Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaría M, Bertoncello I, Drake F, Zavorselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I. Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res*. 1999 Oct;14(10):1654-63. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.10.1654. PMID: 10491212.
- Oberle, C., Huai, J., Reinheckel, T. *et al.* Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell Death Differ* 17, 1167–1178 (2010). doi.org/10.1038/cdd.2009.214
- Graham RK, Ehrnhoefer DE, Hayden MR. Caspase-6 and neurodegeneration. *Trends Neurosci*. 2011 Dec;34(12):646-56. doi: 10.1016/j.tins.2011.09.001. Epub 2011 Oct 22. PMID: 22018804.
- Guo X.-W., Zhang H., Huang J.-Q., Wang S.-N., Lu Y., Cheng B., Dong S.-H., Wang Y.-Y., Li F.-S., Li Y.-W. PIEZO1 Ion Channel Mediates Ionizing Radiation-Induced Pulmonary Endothelial Cell Ferroptosis via Ca²⁺/Calpain/VE-Cadherin Signaling. *Front. Mol. Biosci*. 2021;8:725274. doi: 10.3389/fmolb.2021.725274.
- Haque A, Samantaray S, Knaryan VH, Capone M, Hossain A, Matzelle D, et al. Calpain mediated expansion of CD4⁺ cytotoxic T cells in rodent models of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 2020. ; 330: 113315.

- Hautamaki R., D.K. Kobayashi, R.M. Senior, S.D. Shapiro. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice *Science*, 277 (1997), pp. 2002-2004, 10.1126/science.277.5334.2002
- Higuchi M., Iwata N., Matsuba Y., Takano J., Suemoto T., Maeda J., Ji B., Ono M., Staufenbiel M., Suhara T., et al. Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J.* 2011;26:1204–1217. doi: 10.1096/fj.11-187740.
- Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H. 6. et al. 1998. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 187:587–600
- Horikawa Y., Oda N., Cox N.J., Li X., Orho-Melander M., Hara M., Hinokio Y., Lindner T.H., Mashima H., Schwarz P.E., et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 2000;26:163–175. doi: 10.1038/79876.
- Hossain, M.I.; Marcus, J.M.; Lee, J.H.; Garcia, P.L.; Singh, V.; Shacka, J.J.; Zhang, J.; Groppen, T.I.; Falany, C.N.; Andrabi, S.A. Restoration of CTSD (cathepsin D) and lysosomal function in stroke is neuroprotective. *Autophagy* 2020, 1–19.
- Huang C, Miller RT, Freter CE. Signaling regulation and role of filamin A cleavage in Ca²⁺-stimulated migration of androgen receptor-deficient prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2017 [Jan 17];8(3):3840–3853. DOI:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.9472>.
- Huang Y, Liu Z, Cao B, Qiu Y, Peng Y. Treg Cells Attenuate Neuroinflammation and Protect Neurons in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2020. ; 15: 224–237.
- Huettnner J. E., Bean B. P. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(4):1307–1311.

- Iwama, H.; Mehanna, S.; Imasaka, M.; Hashidume, S.; Nishiura, H.; Yamamura, K.-I.; Suzuki, C.; Uchiyama, Y.; Hatano, E.; Ohmuraya, M. Cathepsin B and D deficiency in the mouse pancreas induces impaired autophagy and chronic pancreatitis. *Sci. Rep.* 2021, *11*, 6596.
- Jackson P.L., Xu X., L. Wilson, N.M. Weathington, J.P. Clancy, J.E. Blalock, *et al.* Human neutrophil elastase-mediated cleavage sites of MMP-9 and TIMP-1: implications to cystic fibrosis proteolytic dysfunction *Mol. Med.*, 16 (2010), pp. 159-166, 10.2119/molmed.2009.00109
- Kafienah W, Brömme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J.* 1998 May 1;331 (Pt 3)(Pt 3):727-32. doi: 10.1042/bj3310727. PMID: 9560298; PMCID: PMC1219411.
- Kang, S. *et al.* Loss of HtrA2/Omi activity in non- neuronal tissues of adult mice causes premature aging. *Cell Death Differ.* 20, 259–269 (2013). References 113–116 identify some mitoproteases that are involved in the modulation of ageing and longevity.
- Karambatakis M., Malousi A., Tzimagiorgis G., Haitoglou C., Fragou A., Georgiou E., Papadopoulou F., Krassas G.E., Kouidou S. Association of two synonymous splicing-associated CpG single nucleotide polymorphisms in calpain 10 and solute carrier family 2 member 2 with type 2 diabetes. *Biomed. Rep.* 2016;6:146–158. doi: 10.3892/br.2016.833.
- Katunuma N. Mechanism and regulation of bone resorption by osteoclasts. *Curr Top Cell Regul.* 1997;35:179–92.
- Kelly B. L., Vassar R., Ferreira A. β -amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons: a potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry.* 2005;280(36):31746–31753
- Kivipelto M., Helkala E. L., Hänninen T., et al. Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: a population-based study. *Neurology.* 2001;56(12):1683–1689.

- Korkmaz B., Horwitz M.S., D.E. Jenne, F. Gauthier Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases *Pharmacol. Rev.*, 62 (2010), pp. 726-759, 10.1124/pr.110.002733
- Kositprapa C, Zhang B, Berger S, et al. Calpain-mediated proteolytic cleavage of troponin I induced by hypoxia or metabolic inhibition in cultured neonatal cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 2000 [2000 Nov 1];214(1):47–55.
- Kreutzberg GW. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung.* 1995;45:357–60.
- Kumamoto T, Kleese WC, Cong JY, Goll DE, Pierce PR, Allen RE. Localization of the Ca(2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec.* 1992;232:60–77.
- Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G (2008) Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology (Bethesda)* 23:64–74
- Le Gars M., D. Descamps, D. Roussel, E. Saussereau, L. Guillot, M. Ruffin, *et al.* Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo
- Lee SC, Chan J, Clement MV, Pervaiz S. Functional proteomics of resveratrol-induced colon cancer cell apoptosis: caspase-6-mediated cleavage of lamin A is a major signaling loop. *Proteomics.* 2006 Apr;6(8):2386-94. doi: 10.1002/pmic.200500366. PMID: 16518869.
- Levkau B, Scatena M, Giachelli CM, Ross R, Raines EW. 13. 1999. Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-κB loop. *Nat. Cell Biol.* 1:227–33
- Li Y, Arnold JM, Pampillo M, Babwah AV, Peng T. Taurine prevents cardiomyocyte death by inhibiting NADPH oxidase-mediated calpain activation. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:51–61.

- Liang Q, Ouyang X, Schneider L, Zhang J. Reduction of mutant huntingtin accumulation and toxicity by lysosomal cathepsins D and B in neurons. *Mol Neurodegener.* 2011;6:37.
- Lim H.Y., Thiam C.H., Yeo K.P., Bisioendial R., Hii C.S., McGrath K.C., Tan K.W., Heather A., Alexander J.S.J., Angeli V. Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-mediated transport of HDL. *Cell Metab.* 2013;17:671–684. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.002.
- Ling C., Groop L., Guerra S.D., Lupi R. Calpain-10 expression is elevated in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *PLoS ONE.* 2009;4:e6558.#
- Liu Z, Huang Y, Cao B, Qiu Y, Peng Y. Th17 Cells Induce Dopaminergic Neuronal Death via LFA-1/ICAM-1 Interaction in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology.* 2017. ; 54: 7762–7776.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153:1194–217.doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol* 15:575–591
- Lu, B. *et al.* The ATP-dependent Lon protease of *Mus musculus* is a DNA-binding protein that is functionally conserved between yeast and mammals. *Gene* 306, 45–55 (2003).
- Kremmidiotis, G. *et al.* Molecular and functional analyses of the human and mouse genes encoding AFG3L1, a mitochondrial metalloprotease homologous to the human spastic paraplegia protein. *Genomics* 76, 58–65 (2001).
- Luce, K. & Osiewacz, H. D. Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nature Cell Biol.* 11, 852–858 (2009).
- Luft R, Landau BR (1995) Mitochondrial medicine. *J Intern Med* 238:405–421

- Magistrelli L, Storelli E, Rasini E, Contaldi E, Comi C, Cosentino M, et al. Relationship between circulating CD4⁺ T lymphocytes and cognitive impairment in patients with Parkinson's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020. ; 89: 668–674.
- Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*. 2018;7(6):553–560. DOI:<https://doi.org/10.1177/2048872617748553>.
- Maki M., Takano E., Mori H., Sato A., Murachi T., Hatanaka M. All four internally repetitive domains of pig calpastatin possess inhibitory activities against calpains I and II. *FEBS Lett*. 1987;223:174–180. doi: 10.1016/0014-5793(87)80531-8.
- Marques, A.R.A.; Di Spiezio, A.; Thießen, N.; Schmidt, L.; Grötzinger, J.; Lüllmann-Rauch, R.; Damme, M.; Storck, S.E.; Pietrzik, C.U.; Fogh, J.; et al. Enzyme replacement therapy with recombinant pro-CTSD (cathepsin D) corrects defective proteolysis and autophagy in neuronal ceroid lipofuscinosis. *Autophagy* 2020, 16, 811–825.
- Masuya K, Teno N. The medicinal chemistry of the cathepsin cysteine proteases. *Curr Top Med Chem*. 2010;10(7):695. doi: 10.2174/156802610791113487. PMID: 20392199.
- McCormick D. Secretion of cathepsin B by human gliomas in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1993;19:146–51.
- McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, et al. A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol. Med*. 2000;6:450–160.
- Medawar PB (1952) An unsolved problem of biology. Lewis, London
- Medvedev ZA (1990) An attempt at rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65:375–398
- Mehta D., Malik A.B. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiol. Rev*. 2006;86:279–367. doi: 10.1152/physrev.00012.2005.

- Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM et al (1996) Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 97:761–768
- Miyazaki T., Miyazaki A. Dysregulation of Calpain Proteolytic Systems Underlies Degenerative Vascular Disorders. *J. Atheroscler. Thromb.* 2018;25:1–15. doi: 10.5551/jat.RV17008.
- Miyazaki T., Taketomi Y., Saito Y., Hosono T., Lei X.-F., Kim-Kaneyama J.-R., Arata S., Takahashi H., Murakami M., Miyazaki A. Calpastatin Counteracts Pathological Angiogenesis by Inhibiting Suppressor of Cytokine Signaling 3 Degradation in Vascular Endothelial Cells. *Circ. Res.* 2015;116:1170–1181.
- Morales-Corraliza J., Berger J.D., Mazzella M.J., Veeranna, Neubert T.A., Ghiso J., Rao M.V., Staufenbiel M., Nixon R.A., Mathews P.M. Calpastatin modulates APP processing in the brains of β -amyloid depositing but not wild-type mice. *Neurobiol. Aging.* 2012;33:1125.e9–1125.e18.
- Mueller-Steiner S, Zhou Y, Arai H, et al. Antiamyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron.* 2006;51:703–14
- Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells *Am. J. Physiol.*, 276 (1999), pp. L835-L843, 10.1152/ajplung.1999.276.5.L835
- Nicholson A. M., Ferreira A. Cholesterol and neuronal susceptibility to beta-amyloid toxicity. *Trends in Cognitive Sciences.* 2011;5:35–56.
- Novinec, Marko and Lenarčič, Brigita. "Papain-like peptidases: structure, function, and evolution" *BioMolecular Concepts*, vol. 4, no. 3, 2013, pp. 287-308. doi.org/10.1515/bmc-2012-0054
- Nyormoi O, Wang Z, Doan D, Ruiz M, McConkey D, Bar-Eli M. 15. 2001. Transcription factor AP-2 α is preferentially cleaved by caspase 6 and degraded by proteasome during

- tumor necrosis factor α -induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 21:4856–67
- Ono Y., Sorimachi H. Calpains: An elaborate proteolytic system. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1824:224–236. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.08.005
- Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM. 12. 1996. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J. Biol. Chem.* 271:16443–46
- Patterson C, Portbury AL, Schisler JC, Willis MS. Tear me down: role of calpain in the development of cardiac ventricular hypertrophy. *Circ Res.* 2011 Aug 5;109(4):453-62. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.239749. PMID: 21817165; PMCID: PMC3151485.
- Paul D.S., Harmon A.W., Winston C.P., Patel Y.M. Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Biochem. J.* 2003;376:625–632. doi: 10.1042/bj20030681.
- Pietsch M, Chua KC, Abell AD. Calpains: attractive targets for the development of synthetic inhibitors. *Curr Top Med Chem.* 2010;10:270–293.
- Pu X, Storr SJ, Ahmad NS, et al. Calpain-1 is associated with adverse relapse free survival in breast cancer: a confirmatory study. *Histopathology.* 2016 Jun;68(7):1021–1029. DOI:<https://doi.org/10.1111/his.12896>.
- Qi L, Wang L, Jin M, Jiang M, Li L, Li Y. Caspase-6 is a key regulator of cross-talk signal way in PANoptosis in cancer. *Immunology.* 2023 Jul;169(3):245-259. doi: 10.1111/imm.13633. Epub 2023 Mar 4. PMID: 36814103.
- Qiu Z., Gruol D. L. Interleukin-6, β -amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons. *Journal of Neuroimmunology.* 2003;139(1-2):51–57. doi: 10.1016/S0165-5728(03)00158-9

- Quirós, P. M. *et al.* ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity. *Cell Rep.* 8, 542–556 (2014).
- Rai M, Curley M, Coleman Z, Demontis F. Contribution of proteases to the hallmarks of aging and to age-related neurodegeneration. *Aging Cell.* 2022 May;21(5):e13603. doi: 10.1111/accel.13603. Epub 2022 Mar 29. PMID: 35349763; PMCID: PMC9124314.
- Rao N.V, Rao G.V., J.R. Hoidal Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression: *J. Biol. Chem.*, 272 (1997), pp. 10260-10265, 10.1074/jbc.272.15.10260
- Reynolds AD, Banerjee R, Liu J, Gendelman HE, Mosley RL. Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of Leukocyte Biology.* 2007. ; 82: 1083–1094.
- Ridker P.M., Everett B.M., Thuren T., MacFadyen J.G., Chang W.H., Ballantyne C., Fonseca F., Nicolau J., Koenig W., Anker S.D., et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N. Engl. J. Med.* 2017;377:1119–1131.
- Rios-Doria J., Day K.C., Kuefer R., Rashid M.G., Chinnaiyan A.M., Rubin M.A., Day M.L. The role of calpain in the proteolytic cleavage of e-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2003;278:1372–1379. doi: 10.1074/jbc.M208772200.
- Rocho FR, Bonatto V, Lameiro RF, Lameira J, Leitão A, Montanari CA. A patent review on cathepsin K inhibitors to treat osteoporosis (2011 - 2021). *Expert Opin Ther Pat.* 2022 May;32(5):561-573. doi: 10.1080/13543776.2022.2040480. Epub 2022 Mar 10. PMID: 35137661.
- Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:115–126. doi: 10.1056/NEJM199901143400207.
- Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, Boutillier AL. 16. 2003. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J.* 22:6537–49

- Rouet-Benzineb P, Gontero B, Dreyfus P, Lafuma C. Angiotensin II induces nuclear factor-kappa B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1767–1778.
- Rugarli, E. I. & Langer, T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J.* 31, 1336–1349 (2012).
- Saito K. I., Elce J. S., Hamos J. E., Nixon R. A. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(7):2628–2632
- Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, Fokou PVT, Martins N, Sharifi-Rad J. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines.* 2018 Sep 9;6(3):91. doi: 10.3390/biomedicines6030091. PMID: 30205595; PMCID: PMC6164842.
- Samantaray S, Knaryan VH, Shields DC, Cox AA, Haque A, Banik NL. Inhibition of Calpain Activation Protects MPTP-Induced Nigral and Spinal Cord Neurodegeneration, Reduces Inflammation, and Improves Gait Dynamics in Mice. *Molecular Neurobiology.* 2015. ; 52: 1054–1066.
- Sato K., Minegishi S., Takano J., Plattner F., Saito T., Asada A., Kawahara H., Iwata N., Saido T.C., Hisanaga S.-I. Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25. *J. Neurochem.* 2011;117:504–515. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07222
- Schettlers STT, Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ, Van Kooyk Y. Neuroinflammation: Microglia and T Cells Get Ready to Tango. *Frontiers in immunology.* 2017; 8: 1905
- Schwab AD, Thurston MJ, Machhi J, Olson KE, Namminga KL, Gendelman HE, et al. Immunotherapy for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease.* 2020. ; 137: 104760.

- Shams R, Banik NL, Haque A. Calpain in the cleavage of alpha-synuclein and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2019. ; 10: 107–124.
- Shapovalov, I., Harper, D., & Greer, P. A. (2022). Calpain as a therapeutic target in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 26(3), 217–231. <https://doi.org/10.1080/14728222.2022.2047178>
- Sharma, Anil K. and Bansal, Poonam. *Serine Proteases: Role in Human Health and Disease*, Berlin, Boston: De Gruyter, 2023. <https://doi.org/10.1515/9783111325040>
- Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. *Trends Biochem Sci* (2017) 42(4):245–54. doi: 10.1016/j.tibs.2016.10.004
- Shinkai-Ouchi F., Koyama S., Ono Y., Hata S., Ojima K., Shindo M., Duverle D., Ueno M., Kitamura F., Doi N., et al. Predictions of Cleavability of Calpain Proteolysis by Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis Using Newly Determined Cleavage Sites and Catalytic Efficiencies of an Oligopeptide Array. *Mol. Cell. Proteom.* 2016;15:1262–1280. doi: 10.1074/mcp.M115.053413
- Siintola, E.; Partanen, S.; Strömme, P.; Haapanen, A.; Haltia, M.; Maehlen, J.; Lehesjoki, A.E.; Tyynelä, J. Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* 2006, 129, 1438–1445.
- Simon DJ, Weimer RM, McLaughlin T, Kallop D, Stanger K. 25. et al. 2012. A caspase cascade regulating developmental axon degeneration. *J. Neurosci.* 32:17540–53
- Srisomsap C, Subhasitanont P, Otto A, Mueller EC, et al. Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics*. 2002;2:706–712.
- Storr SJ, Safuan S, Woolston CM, et al. Calpain-2 expression is associated with response to platinum based chemotherapy, progression-free and overall survival in ovarian

- cancer. *J Cell Mol Med.* 2012 Oct;16(10):2422–2428. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01559.x>.
- Storr SJ, Woolston CM, Barros FF, et al. Calpain-1 expression is associated with relapse-free survival in breast cancer patients treated with trastuzumab following adjuvant chemotherapy. *Int J Cancer.* 2011 [Oct 1];129(7):1773–1780. DOI:<https://doi.org/10.1002/ijc.25832>.
- Storr SJ, Zhang S, Perren T, et al. The calpain system is associated with survival of breast cancer patients with large but operable inflammatory and non-inflammatory tumours treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget.* 2016 [Jul 26];7(30):47927–47937. DOI:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10066>.
- Su W., Kowalczyk A.P. The VE-cadherin cytoplasmic domain undergoes proteolytic processing during endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 2017;28:76–84. doi: 10.1091/mbc.e16-09-0658.
- Suboj P, Babykutty S, Srinivas P, Gopala S. Aloe emodin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via activation of caspase-6 in human colon cancer cells. *Pharmacology.* 2012;89(1-2):91-8. doi: 10.1159/000335659. Epub 2012 Feb 14. PMID: 22343391.
- Sun C, Zhao Z, Yu W, Mo M, Song C, Si Y, et al. Abnormal subpopulations of peripheral blood lymphocytes are involved in Parkinson's disease. *Annals of Translational Medicine.* 2019. ; 7: 637–637
- Sun W, Wu X, Gao H, Yu J, Zhao W, Lu JJ, Wang J, Du G, Chen X. Cytosolic calcium mediates RIP1/RIP3 complex-dependent necroptosis through JNK activation and mitochondrial ROS production in human colon cancer cells. *Free Radic Biol Med.* 2017 Jul;108:433-444. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.010. Epub 2017 Apr 14. PMID: 28414098.
- Sun X., Sun Y., Jiang P., Qi G., Chen X. Crosstalk between endothelial cell-specific calpain inhibition and the endothelial-mesenchymal transition via the HSP90/Akt signaling pathway. *Biomed.Pharmacother.* 2020;124:109822. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109822.

- Tang S, Yin Q, Liu F, et al. Calpain small subunit 1 protein in the prognosis of cancer survivors and its clinicopathological correlation. *Biomed Res Int.* 2019;2019:8053706.
- Thome AD, Atassi F, Wang J, Faridar A, Zhao W, Thonhoff JR, et al. Ex vivo expansion of dysfunctional regulatory T lymphocytes restores suppressive function in Parkinson's disease. *Npj Parkinson's Disease.* 2021. ; 7: 41.
- Tian, L.; Zhang, K.; Tian, Z.-Y.; Wang, T.; Shang, D.-S.; Li, B.; Liu, D.-X.; Fang, W.-G.; Wang, Z.-Y.; Chen, Y.-H. Decreased expression of cathepsin D in monocytes is related to the defective degradation of amyloid- β in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 2014, 42, 511–520.
- Turk, B.; Dolenc, I.; Lenarcic, B.; Krizaj, I.; Turk, V.; Bieth, J.G.; Björk, I. Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *Eur. J. Biochem.* 1999, 259, 926–932.
- Unal Gulsuner, H. *et al.* Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 18285–18290 (2014).
- Uribe V, Wong BK, Graham RK, Cusack CL, Skotte NH. 29. et al. 2012. Rescue from excitotoxicity and axonal degeneration accompanied by age-dependent behavioral and neuroanatomical alterations in caspase-6-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* 21:1954–67
- Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity.* 2019 Jun 18;50(6):1352-1364. doi: 10.1016/j.immuni.2019.05.020. PMID: 31216460; PMCID: PMC6611727.
- Van Rossum D, Hanisch UK. Microglia. *Metab Brain Dis.* 2004 Dec;19(3-4):393-411. doi: 10.1023/b:mebr.0000043984.73063.d8. PMID: 15554430.

- Vasiljeva O, Papazoglou A, Kruger A, Brodoefel H, et al. Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res.* 2006;66:5242–5250.
- Venkatesh, S., Lee, J., Singh, K., Lee, I. & Suzuki, C. K. Multitasking in the mitochondrion by the ATP- dependent Lon protease. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 56–66 (2012).
- Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* 2007 Mar 15;15(6):2223-68. doi: 10.1016/j.bmc.2007.01.011. Epub 2007 Jan 17. PMID: 17275314.
- Voynow J.A., L.R. Young, Y. Wang, T. Horger, M.C. Rose, B.M. Fischer
- Wang C, Jurk D, Maddickk M, Nelson G, Marti-Ruiz C, Zglinicki T (2009) DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8:311–323
- Wang XJ, Cao Q, Zhang Y, Su XD. Activation and regulation of caspase-6 and its role in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:553-72. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124414. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25340928.
- Wang Y, Brazdzionis J, Dong F, et al. P13BP, a calpain-2-mediated breakdown product of PTPN13, is a novel blood biomarker for Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2021 [Sep 9];38(22):3077–3085. DOI:<https://doi.org/10.1089/neu.2021.0229>.
- Waring P, Müllbacher A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol.* 1999 Aug;77(4):312-7. doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x. PMID: 10457197.
- Whitaker, J.N.; Terry, L.C.; Whetsell, W.O. Immunocytochemical localization of cathepsin D in rat neural tissue. *Brain Res.* 1981, 216, 109–124.
- Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2017 Feb 10;79:619-643. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27959620.

- Wolf Y, Shemer A, Levy-Efrati L, Gross M, Kim J, Engel A, et al. Microglial MHC class II is dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis and cuprizone-induced demyelination. *European Journal of Immunology*. 2018. ; 48: 1308–1318.
- Wulfkuhle JD, SgROI DC, Krutzsch H, McLean K, et al. Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*. 2002;62:6740–6749.
- Xu C, Yu X, Zhu Y, et al. Overexpression of calpain1 predicts poor outcome in patients with colorectal cancer and promotes tumor cell progression associated with downregulation of FLNA. *Oncol Rep*. 2019 Jun;41(6):3424–3434
- Yadati T, Houben T, Bitorina A, Shiri-Sverdlov R. *The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management*. *Cells*. 2020 Jul 13;9(7):1679. doi: 10.3390/cells9071679. PMID: 32668602; PMCID: PMC7407943.
- Yang X., Yin M., Yu L., Lu M., Wang H., Tang F., Zhang Y. Simvastatin inhibited oxLDL-induced proatherogenic effects through the calpain-1-PPAR γ -CD36 pathway. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2016;94:1336–1343. doi: 10.1139/cjpp-2016-0295.
- Yang Y.-N., Jung Y.-S., Lee S.H., Moon C.-H., Kim C.-H., Baik E.J. Calpain-Mediated N-Cadherin Proteolytic Processing in Brain Injury. *J. Neurosci*. 2009;29:5974–5984. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6178-08.2009
- Yin M., Liu Q., Yu L., Yang Y., Lu M., Wang H., Luo D., Rong X., Tang F., Guo J. Downregulations of CD36 and Calpain-1, Inflammation, and Atherosclerosis by Simvastatin in Apolipoprotein E Knockout Mice. *J. Vasc. Res*. 2017;54:123–130. doi: 10.1159/000464288.
- Yu J, Li S, Qi J, Chen Z, Wu Y, Guo J, Wang K, Sun X, Zheng J. Cleavage of GSDME by caspase-3 determines lobaplatin-induced pyroptosis in colon cancer cells. *Cell Death Dis*. 2019 Feb 25;10(3):193. doi: 10.1038/s41419-019-1441-4. PMID: 30804337; PMCID: PMC6389936.

- Yu LM, Zhu YS, Xu CZ, et al. High calpain-1 expression predicts a poor clinical outcome and contributes to tumor progression in pancreatic cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2019 Jul;21(7):682–690.
- Zaman V, Shields DC, Shams R, Drasites KP, Matzelle D, Haque A, et al. Cellular and molecular pathophysiology in the progression of Parkinson's disease. *Metabolic Brain Disease*. 2021. ; 36: 815–827.
- Zhang CZ, Chen GG, Lai PB. Transcription factor ZBP-89 in cancer growth and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1806(1):36-41. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.03.002. Epub 2010 Mar 15. PMID: 20230874.
- Zhao C, Yuan G, Jiang Y, et al. Capn4 contributes to tumor invasion and metastasis in gastric cancer via activation of the Wnt/beta-catenin/MMP9 signalling pathways. *Exp Cell Res*. 2020 [Oct 15];395(2):112220. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112220>
- Zhao P, Sun X, Chagga C, Liao Z, In Wong K, He F, Singh S, Loomba R, Karin M, Witztum JL, Saltiel AR. An AMPK-caspase-6 axis controls liver damage in nonalcoholic steatohepatitis. *Science*. 2020 Feb 7;367(6478):652-660. doi: 10.1126/science.aay0542. PMID: 32029622; PMCID: PMC8012106.