

**TNF- $\alpha$ -Freisetzung bei myokardialer Ischämie/Reperfusion:  
Rolle von TACE und kardialen Mastzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



Aus dem Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**TNF- $\alpha$ -Freisetzung bei myokardialer Ischämie/Reperfusion:  
Rolle von TACE und kardialen Mastzellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Stefanie Gilles  
aus  
München  
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. F. Becker

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Näbauer  
Prof. Dr. S. Werner

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter Dr.habil. Stefan Zahler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.04

### **Erklärung**

Diese Doktorarbeit wurde im Sinne von §2 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München selbständig angefertigt. Die Verfasserin hat sich nur der angegebenen Hilfsmittel bedient. Alle Erkenntnisse, die aus der Literatur ganz oder annähernd übernommen sind, sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

München, im Mai 2003

Stefanie Gilles

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
I.1	Myokardiale Ischämie und Reperfusionsschäden.....	1
I.1.1	Bildung von Oxidanzien und Radikalen im reperfundierten Myokard.....	2
I.1.2	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	4
I.1.3	Rolle von TNF- $\alpha$ für den myokardialen Reperfusionsschaden.....	6
I.2	TNF- $\alpha$ converting enzyme (TACE/ADAM17) .....	8
I.3	Fragestellung und experimenteller Ansatz.....	10
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
II.1	Material und Bezugsquellen.....	11
II.1.1	Substanzen .....	11
II.1.2	Puffer und Lösungen.....	14
II.1.3	Nucleinsäuren .....	18
II.1.4	Antikörper .....	18
II.1.5	ELISA-Kits .....	20
II.1.6	Tiere .....	20
II.2	Methoden .....	20
II.2.1	Versuche am isolierten Rattenherzen .....	20
II.2.2	Zellkultur .....	24
II.2.3	Isolierung von Zellen aus humanem peripheren Blut.....	25
II.2.4	Lyse von Zellen .....	25
II.2.5	Homogenisierung von Herzen für TACE-Western Blot.....	26
II.2.6	Oxidative Stimulierung von Zellen.....	26
II.2.7	Nachweis von TNF- $\alpha$ im Überstand oxidativ stimulierter Zellen .....	27
II.2.8	Messung von TNF- $\alpha$ auf der Oberfläche oxidativ stimulierter Zellen .....	27

II.2.9	Spaltung des fluorogenen Peptids DABCYL-TNF- $\alpha$ -EDANS .....	28
II.2.10	Spaltung von Ac-SPLAQAVRSSSR-NH <sub>2</sub> durch intakte Zellen .....	29
II.2.11	High pressure liquid chromatography (HPLC).....	29
II.2.12	Histochemische und immunhistochemische Methoden.....	30
II.2.13	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	31
II.2.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	31
II.2.15	Western blotting.....	31
II.2.16	Anfärbung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen .....	31
II.2.17	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen .....	31
II.2.18	Statistische Methoden .....	32
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
III.1	Ischämische, reperfundierte Rattenherzen setzen TNF- $\alpha$ frei .....	33
III.2	Quellen für TNF- $\alpha$ und TACE im Herzen.....	35
III.3	Rolle der Mastzellegranulation für die postischämische TNF- $\alpha$ - Freisetzung aus Rattenherzen.....	37
III.4	TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Rattenherzen ist abhängig vom Redox- status .....	39
III.4.1	Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung während der Reperfusion ist abhängig von moleku- larem Sauerstoff und vom extrazellulären Redoxstatus .....	39
III.4.2	Bei nichtischämischen Herzen wird durch Behandlung mit Oxidanzien eine TNF- $\alpha$ -Freisetzung ausgelöst.....	40
III.5	Rolle von TACE für die postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus dem Herzen.....	41
III.5.1	Ischämie/Reperfusion führt weder zu einer Induktion, noch zur vermehrten proteolytischen Aktivierung von myokardialem TACE .....	42
III.5.2	Ischämie/Reperfusion bewirkt keine signifikante Zunahme der TACE-spezifi- schen proteolytischen Aktivität in Herzgewebe.....	43
III.5.3	Ein MMP-Inhibitor hemmt die Freisetzung von TNF- $\alpha$ aus Rattenherzen .....	45
III.6	Oxidative Aktivierung von TACE im Zellmodell .....	46
III.6.1	Spaltung von TNF- $\alpha$ -Peptid durch intakte PBL und PBL- Membranfraktionen .....	46
III.6.2	Akute Abgabe von TNF- $\alpha$ in den Überstand oxidativ stimulierter Zellen.....	47
III.6.3	Akute Freisetzung von TNF- $\alpha$ von der Oberfläche oxidativ stimulierter Zellen.....	49
III.7	HMC-1 als Modell für Mastzellen.....	51
III.7.1	HMC-1 exprimieren TACE, jedoch kaum TNF- $\alpha$ .....	51
III.7.2	Die Spaltung eines TNF- $\alpha$ -Peptids durch HMC-1 ist oxidativ stimulierbar .....	52
III.7.3	Die Behandlung von HMC-1 mit Oxidanzien führt nicht zu einer vermehrten proteolytischen Aktivierung von TACE.....	54
III.7.4	Vorarbeiten: Transiente Expression von TNF- $\alpha$ in HMC-1.....	55

---

<b>IV. Diskussion.....</b>	<b>57</b>
IV.1 Die postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Herzen ist abhängig von Redox-Streß .....	57
IV.2 Rolle von Mastzellen .....	59
IV.2.1 Quellen für TNF- $\alpha$ im Herzgewebe .....	59
IV.2.2 TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Mastzellen: Degranulation oder regulierte Exozytose?.....	60
IV.2.3 Ketotifen als Inhibitor der TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus dem Herzen.....	61
IV.3 Rolle von TACE.....	62
IV.4 Oxidative Aktivierung von TACE im Zellmodell .....	63
IV.5 HMC-1 als Modell für kardiale Mastzellen .....	65
IV.6 TNF- $\alpha$ -exprimierende HMC-1: Ein geeignetes Modell für Studien zur oxidativen TACE-Aktivierung? .....	67
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>VII. Publikationen .....</b>	<b>86</b>
<b>VIII. Anhang.....</b>	<b>88</b>
VIII.1 Abkürzungen.....	88
VIII.2 Sequenzen .....	90

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im ischämischen, reperfundierten Myokard .....	3
Abbildung 2:	Beispiel für die Wirkung von ROS nach Ischämie/Reperfusion. ....	4
Abbildung 3:	TNF-Rezeptor-Signalling. ....	6
Abbildung 4:	TNF- $\alpha$ und kontraktile Dysfunktion im postischämischen Myokard.....	7
Abbildung 5:	TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) zeigt einen für die ADAM-Superfamilie typischen Multidomänen-Aufbau .....	9
Abbildung 6:	Langendorff-Perfusion.....	21
Abbildung 7:	Verwendete Perfusionsprotokolle.....	22
Tabelle 1:	Versuchsprotokolle zur oxidativen Stimulation von Zellen .....	27
Abbildung 8:	TNF- $\alpha$ im Transsudat von ischämischen, reperfundierten Rattenherzen .....	34
Abbildung 9:	Mastzellen und TNF- $\alpha$ im Rattenmyokard.....	35
Abbildung 10:	TNF- $\alpha$ und TACE in einer kardialen Mastzelle .....	36
Abbildung 11:	Histamin und TNF- $\alpha$ im Transsudat von ischämischen, reperfundierten Rattenherzen mit und ohne Ketotifen-Behandlung.....	38
Abbildung 12:	TNF- $\alpha$ im Transsudat ischämischer Herzen, die unter verschiedenen Bedingungen reperfundiert wurden. ....	40
Abbildung 13:	TNF- $\alpha$ im Transsudat nicht-ischämischer Rattenherzen, die mit Oxidanzien behandelt wurden.....	41
Abbildung 14:	TACE im Rattenmyokard .....	42
Abbildung 15:	Spaltung eines fluorogenen Substrats durch die katalytische Domäne von human rekombinantem TACE.....	43
Abbildung 16:	TACE-Aktivität in Herzgewebe .....	44

---

Abbildung 17:	TNF- $\alpha$ in Transsudaten ischämischer, reperfundierter Rattenherzen, die mit 1 $\mu$ M MMP-Inhibitor II behandelt wurden .....	45
Abbildung 18:	Spaltung des fluorogenen TNF- $\alpha$ -Peptids durch intakte Leukozyten aus humanem peripherem Blut (PBL) .....	46
Abbildung 19:	TACE-Aktivität in Membranfraktionen von PBL .....	47
Abbildung 20:	TNF- $\alpha$ im Überstand verschiedener oxidativ stimulierter Zellen .....	48
Abbildung 21:	Freisetzung von TNF- $\alpha$ von der Plasmamembran oxidativ stimulierter Zellen .....	50
Abbildung 22:	TACE in der humanen Mastzelllinie HMC-1 .....	51
Abbildung 23:	Spaltung eines TNF- $\alpha$ -Peptids durch intakte HMC-1 .....	53
Abbildung 24:	TACE in Lysaten oxidativ stimulierter HMC-1 .....	55
Abbildung 25:	TNF- $\alpha$ im Überstand von HMC-1 .....	56
Abbildung 26:	Denkbare Möglichkeiten der TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus myokardialen Mastzellen .....	71

# I. Einleitung

## I.1 Myokardiale Ischämie und Reperfusionsschäden

Zur myokardialen Ischämie kommt es nicht nur unmittelbar durch koronar-arteriellen Verschuß bei Thrombose und Infarkt, sondern auch durch operative Eingriffe, die mit vorübergehender koronarer Blutleere einhergehen, wie z. B. kardialer und pulmonaler Bypass, Herztransplantationen sowie durch katheterangioplastische Eingriffe.

So unverzichtbar die Reperfusion des ischämischen Herzens ist, führt sie doch unmittelbar zu einer Reihe von reversiblen und irreversiblen Schädigungen, die für den subakuten und chronischen postischämischen Verlauf verantwortlich sind. Symptomatisch für den myokardialen Reperfusionsschaden sind das sogenannte "low-output"- und das "no-reflow"-Syndrom, Kontrakturen und myokardiales "stunning", Infarktausweitung, Ödeme, Gefäßneubildung und Gewebeumbau ("remodeling") sowie letztlich Rethrombosierung und vaskuläre Restenose.

Zu den Ursachen oben genannter Schäden gehören die Überladung der Myozyten mit Calcium, Gewebs-Azidose, Apoptose und Nekrose, erhöhte vaskuläre Permeabilität, entzündliche Prozesse (z. B. Aktivierung des Endothels, Induktion von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen, Rekrutierung von Leukozyten, Lymphozyten und Thrombozyten), gesteigerte Mastzell-Degranulation sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.

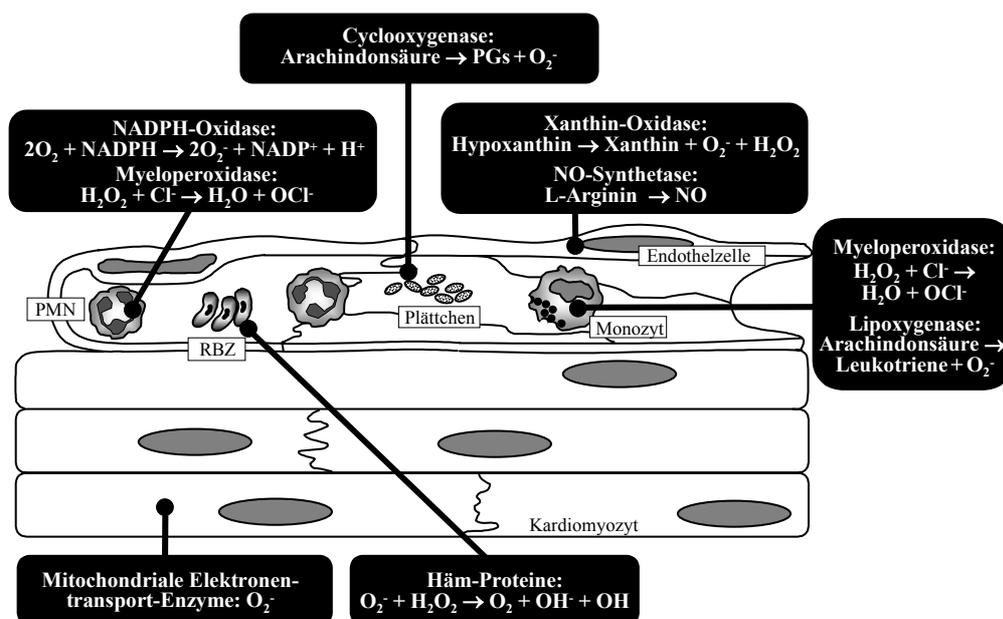
### I.1.1 Bildung von Oxidanzien und Radikalen im reperfundierten Myokard

Wie mittels der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) nachgewiesen werden kann (Garlick, Davies et al., 1987; Zweier, Flaherty, Weisfeldt, 1987), geht die Reperfusion von ischämischem Myokard mit der Bildung zahlreicher freier Radikale einher. Ein Hinweis auf die schädliche Wirkung von Radikalen ist das Erscheinen diverser Peroxidationsprodukte von Lipiden im reperfundierten Myokard. Darüberhinaus lassen sich reaktive Sauerstoffspezies sowohl im salin reperfundierten Herzen (Zweier, Kuppasamy et al., 1989), als auch in Koronarsinusblut von Patienten während der Reperfusion nach kardioplegischem Herzstillstand nachweisen (Tortolani, Powell et al., 1993). Von Bedeutung für die Klinik ist die Tatsache, daß sich die Behandlung mit manchen Antioxidanzien bei der Eindämmung des Reperfusionsschadens als günstig erwiesen hat (Becker, 1993; Hearse, 1991; Kukreja & Hess, 1992; Lucchesi, Werns, Fantone, 1989; Reimer, Murry, Richard, 1989). Schließlich lassen sich experimentell durch Radikalzufuhr Schäden am Herzen hervorrufen, die dem Reperfusionsschaden symptomatisch entsprechen (Becker, 1993; Curtis, Pugsley, Walker, 1993; Hearse & Bolli, 1992; Lefer & Granger, 2000; Leipert, Becker, Gerlach, 1992; Svendsen & Bjerrum, 1992). All diese Befunde sprechen für die große Bedeutung freier Radikale für die Entstehung des postischämischen Reperfusionsschadens.

Eine besondere Rolle kommt dabei vermutlich den Sauerstoffradikalen und den davon abgeleiteten reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) zu (Becker, Kupatt et al., 2000). Neben Superoxid-Anionen ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), Hydroxyl-Radikalen ( $\bullet\text{OH}$ ), Stickstoffmonoxid ( $\bullet\text{NO}$ ), Peroxynitrit ( $\text{ONNO}^-$ ) u. a. sind Wasserstoff-Peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und hypochlorige Säure bzw. Hypochlorit ( $\text{HOCl/OCl}^-$ ) von Bedeutung (Becker, Massoudy et al., 1993).

Eine Übersicht einiger zellulärer Quellen für reaktive Sauerstoffspezies im ischämischen, reperfundierten Myokard ist in Abbildung 1 zu sehen. Die wichtigste Quelle für  $\bullet\text{O}_2^-$  ist die mitochondriale Atmungskette, wo es durch  $1e^-$ -Reduktion von molekularem Sauerstoff entsteht. Neben den Atmungskettenenzymen gibt es, abhängig vom Zelltyp, verschiedene andere Enzyme, deren Katalyseprodukt  $\bullet\text{O}_2^-$  ist, z. B. die NADPH-Oxidase von Phagozyten und Endothelzellen, die Xanthinoxidase (XO) im mikrovaskulären Endothel, die Monoaminoxidase (MAO), Cyclooxygenase (COX) sowie die Lipoxxygenase (LOX) in Endothel, Thrombozyten und Leukozyten.

$\text{H}_2\text{O}_2$  wird von einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen produziert, z. B. von aktivierten neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen oder Kardiomyozyten (Lefer & Granger, 2000). Reaktionen, die zur Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führen, werden von der Superoxid-Dismutase ( $\text{SOD}: 2\bullet\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ), der Xanthinoxidase oder der NO-Synthetase (NOS) katalysiert.



### Abbildung 1: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im ischämischen, reperfundierten Myokard.

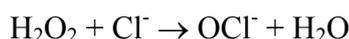
Superoxid Anionen ( $O_2^-$ ) können im ischämischen, reperfundierten Myokard durch Entkoppelung der mitochondrialen Atmungskette entstehen. Daneben können im Blut zirkulierende polymorphkernige Granulozyten (PMN) mit Hilfe des Enzyms NADPH-Oxidase  $O_2^-$  produzieren. Auch bei der Prostaglandin-Synthese und der Bildung von Leukotrienen fällt  $O_2^-$  an. Ein Produkt der "respiratory burst"-Reaktion von PMN ist das Hypochlorit ( $OCl^-$ ), das ebenfalls von Monozyten gebildet werden kann. Koronarendothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen, aber auch Phagozyten sind Quellen für Stickstoffmonoxid (NO). Vaskuläre Endothelzellen exprimieren ferner das Enzym Xanthin-Oxidase, welches nach Ischämie/Reperfusion bei der Umwandlung von Hypoxanthin in Xanthin  $O_2^-$  und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) generiert. PGs = Prostaglandine. RBZ = rote Blutzellen. Modifiziert nach Lefer & Granger, 2000.

$\cdot OH$  entsteht in Kupfer-, Eisen- und Hämprotein-katalysierten Reaktionen aus Superoxid-Anionen und  $H_2O_2$ :



Wichtig in diesem Zusammenhang könnte das Hämoglobin-Eisen der Erythrozyten sein.

$HOCl$  und das  $OCl^-$  Anion sind Folgeprodukte der sogenannten "oxidative burst"- Reaktion von aktivierten Neutrophilen.  $OCl^-$  wird in Monozyten und Granulozyten aus  $Cl^-$ -Ionen und  $H_2O_2$  in einer vom Enzym Myeloperoxidase (MPO) katalysierten Reaktion gebildet:

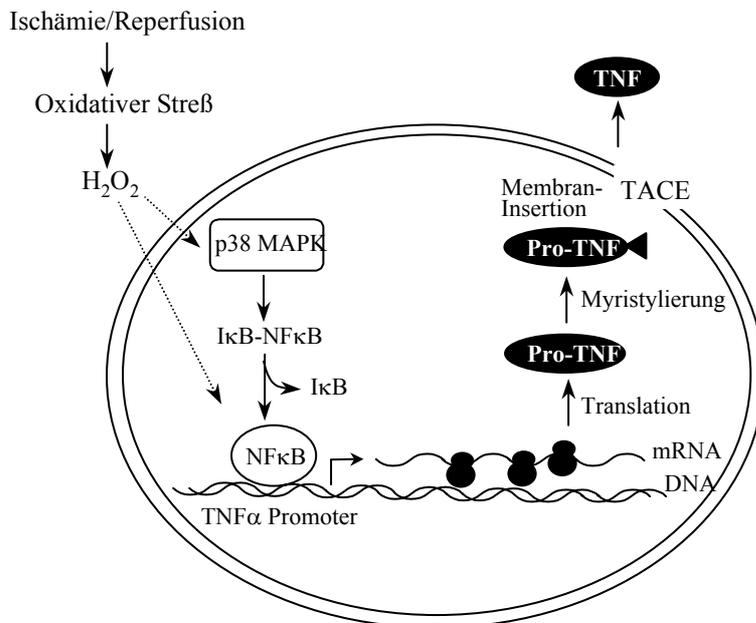


Von physiologischer Relevanz sind die zytotoxischen und gewebstoxischen Effekte von Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies. Sie beruhen z. B. auf der Zerstörung der Membranintegrität durch Peroxidation von Lipiden oder Funktionsverlust von Enzymen und Strukturproteinen durch Oxidation/Nitrosylierung von funktionellen Gruppen.

Auch eine direkte Beeinflussung des Zellstoffwechsels über die Induktion der Gentranskription ist für manche ROS gezeigt worden: So kann  $H_2O_2$ , das im Zuge der

Ischämie/Reperfusion entsteht, über die Aktivierung von NFκB die Induktion des Gens für TNF-α bewirken (Abbildung 2).

Bislang wenig beachtet wurde die Möglichkeit, daß ROS Enzymaktivität induzieren könnten, und zwar durch Beseitigung hemmender Faktoren (Oxidation von Sulfhydrylgruppen).



**Abbildung 2: Beispiel für die Wirkung von ROS nach Ischämie/Reperfusion.** Ischämie und Reperfusion führen u. a. zur Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches durch Zellmembranen diffundieren und somit theoretisch nicht nur auf die Ursprungszellen, sondern auch auf Zellen in der Nachbarschaft wirken kann. Über eine Aktivierung der p38 MAPKinase oder des stromabwärts in der Signalkaskade gelegenen Transkriptionsfaktors NFκB bewirkt  $H_2O_2$  die Induktion von Cytokingenen, z. B. des Gens für Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), welcher durch das Enzym TNF-α-cleaving enzyme (TACE) von der Membran freigesetzt wird. Modifiziert nach Meldrum, 1998.

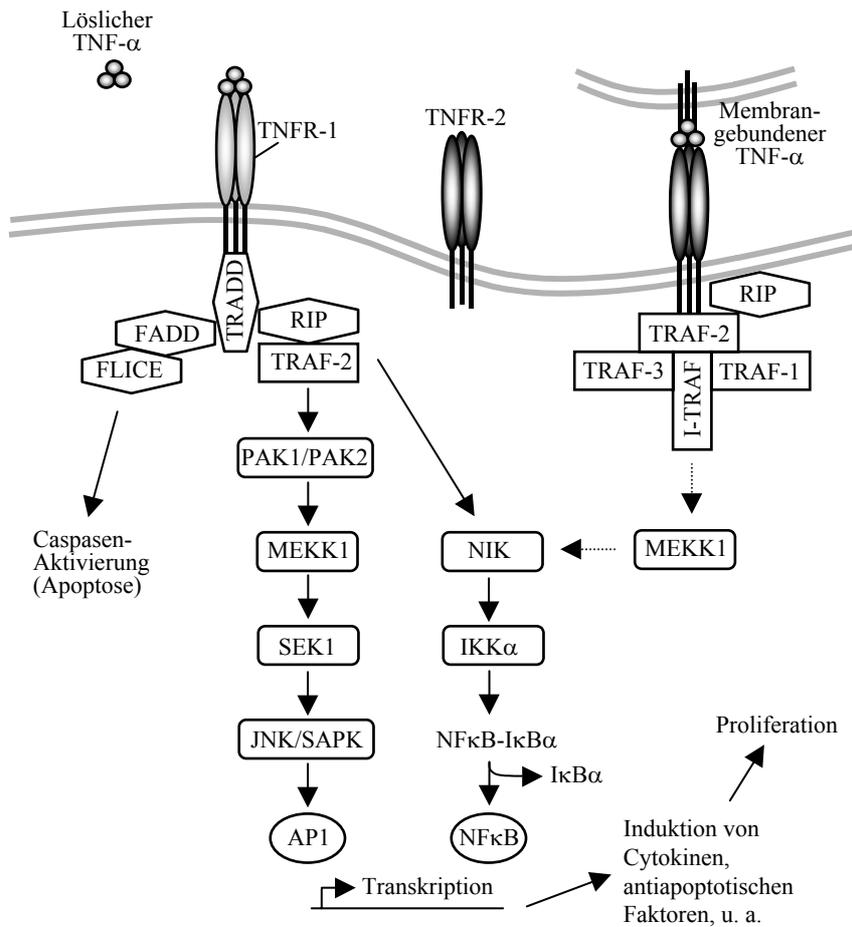
### I.1.2 Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α)

Tumor-Nekrose-Faktor (TNF-α) wurde ursprünglich, wie der Name andeutet, als ein Serum-Faktor identifiziert, der durch Endotoxin induziert wird und im Tierexperiment die Nekrose von transplantierten Tumoren und *in vitro* Nekrose von neoplastischen Zell-Linien hervorrief (Carswell, Old et al., 1975). Schon damals nahm man an, daß aktivierte Makrophagen den Faktor sezernieren. Zehn Jahre später gelang die Reinigung des Proteins sowie die Klonierung des menschlichen Gens für Tumor-Nekrose-Faktor-α (Aggarwal, Kohr et al., 1985; Shirai, Yamaguchi et al., 1985; Wang, Creasey et al., 1985).

Humaner TNF- $\alpha$  wird als Transmembranprotein von 233 Aminosäuren (Molekulargewicht: 25 kDa) synthetisiert und als 157 Aminosäuren (Ratte und Maus: 156 Aminosäuren) langes Molekül (Molekulargewicht: 17 kDa) von der Membran freigesetzt. Humaner TNF- $\alpha$  ist nicht glykosyliert, während muriner TNF- $\alpha$  Sialylsäure- und N-glycosidische Reste enthält (Jue, Sherry et al., 1990; Pennica, Hayflick et al., 1985; Sherry, Jue et al., 1990). *In vivo* bildet reifer TNF- $\alpha$  Homotrimere (Tang, Hung, Klostergaard, 1996). Die biologischen Effekte von TNF- $\alpha$  kommen durch Bindung an die membranären TNF-Rezeptoren (s. Abbildung 3) und deren Aktivierung durch Oligomerisierung ("*receptor cross-linking*") zustande.

TNF- $\alpha$  ist ein Cytokin mit ausgeprägt pleiotroper Wirkung. Zu den systemischen Wirkungen gehören neben Fieber und Appetitlosigkeit (Cachexie) (Oloff, Defeo-Jones et al., 1987) vor allem eine allgemeine Förderung entzündlicher Prozesse durch die Aktivierung von Lymphozyten. Auf Zellebene kann TNF- $\alpha$  sowohl Apoptose vermitteln, als auch Proliferation fördern. Ursachen für die vielfältigen, zum Teil entgegengesetzten Wirkungen des Cytokins sind das Vorhandensein von TNF-Rezeptoren auf nahezu jedem bislang untersuchten Zelltyp sowie die Vielfalt und Vernetzung der den TNF-Rezeptoren nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden. Ferner hängen die Effekte von TNF- $\alpha$  davon ab, welcher Rezeptor aktiviert wird. Eine Übersicht über das TNF-Signalling beider Rezeptoren ist in Abbildung 3 gezeigt.

Aufgrund der Diversität der Wirkungen ist es schwierig, vorauszusagen, welchen Effekt postischämisch freigesetztes TNF- $\alpha$  während der kardialen Reperfusion ausübt.

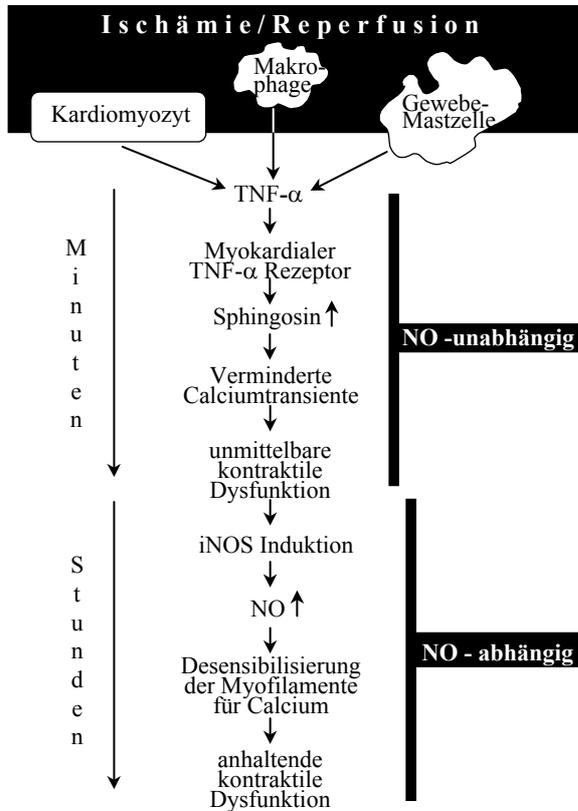


**Abbildung 3: TNF-Rezeptor-Signalling.** TNFR = TNF-Rezeptor, TRADD = TNF-receptor-associated death domain, FADD = Fas-associated death domain, RIP = receptor-interacting protein, TRAF = TNF-receptor-associated factor, PAK = p21/Cdc42/rac1-activated kinase, MEKK = mitogen activated protein kinase kinase kinase, SEK = SAPK kinase, JNK/SAPK = Jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, AP-1 = activator protein-1, NIK = NFκB-inducing kinase, IKKα = inhibitor-κB kinase α, NFκB = nuclear factor κB.

### I.1.3 Rolle von TNF-α für den myokardialen Reperfusionsschaden

Als Quelle von myokardialem TNF-α kommen vor allem Gewebs-Mastzellen (Entman, Youker et al., 2000; Frangogiannis, Lindsey et al., 1998), aber auch eingewanderte Makrophagen sowie Kardiomyozyten in Betracht (Meldrum, 1998). Eine Reihe von unterschiedlichen Befunden lieferte bisher Hinweise darauf, daß TNF-α eine wichtige Rolle im postischämischen Reperfusionsschaden des Herzens spielen könnte (Frangogiannis, Smith, Entman, 2002). So haben Patienten mit akutem Myokardinfarkt erhöhte TNF-α-Konzentrationen im Serum (Latini, Bianchi et al., 1994; Neumann, Ott et al., 1995). Ein Anstieg des Entzündungsmediators zeigte sich auch im Serum von Patienten nach Bypass-Operation (CABG) (Massoudy, Zahler et al., 2000; Wan, Arifi et al., 2002). Auch in verschiedenen Tiermodellen der experimentellen Ischämie/Reperfusion ließ sich eine TNF-α-

Induktion zeigen (Frangogiannis, Lindsey et al., 1998; Gilles, Zahler, Becker, 2001; Kupatt, Habazettl et al., 1999).



**Abbildung 4: TNF- $\alpha$  und kontraktile Dysfunktion im postschämischen Myokard.** Im reperfundierten Myokard wird TNF- $\alpha$  vornehmlich von Gewebs-Mastzellen, aber auch von Makrophagen und Myozyten gebildet. Bindung von TNF- $\alpha$  an den myozytären p55/TNFR-1 führt zur intrazellulären Produktion von Sphingosin, welches den Ryanodin-Rezeptor am sarkoplasmatischen Reticulum (SR) blockiert. Hierdurch wird die Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung aus dem SR gehemmt und somit die Calcium-Transiente während der Systole vermindert. Die Folge ist eine unmittelbare kontraktile Dysfunktion. Innerhalb von Stunden nach der Reperfusion kommt es zusätzlich zu einer Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und dadurch zu einer Überproduktion von NO. Diese wiederum führt zur Desensibilisierung der Myofilamente für Calcium (anhaltende kontraktile Dysfunktion). Modifiziert nach Meldrum, 1998.

Gegenüber diesen eindeutigen Befunden ist die Bedeutung von TNF- $\alpha$  im Zuge des myokardialen Reperfusionsschadens noch immer kontrovers und z. T. spekulativ. In der Literatur existieren Hinweise auf eine benefizielle Wirkung von TNF- $\alpha$  (Entman, Youker et al., 2000), z. B. durch die Verhinderung der Infarktausweitung (Kurrelmeyer, Michael et al., 2000), ebenso wie zahlreiche Berichte über eine deletäre Wirkung des Cytokins (Meldrum, 1998). Vor allem die hämodynamischen (Hypotension, verminderter totaler peripherer Widerstand) und kardiodepressiven Effekte (verminderte Kontraktionsfähigkeit, verminderte Ejektionsfraktion, biventrikuläre Dilatation, "remodeling") von TNF- $\alpha$  scheinen im Tiermodell eine Rolle zu spielen (Sivasubramanian, Coker et al., 2001). Vermittelt sind diese

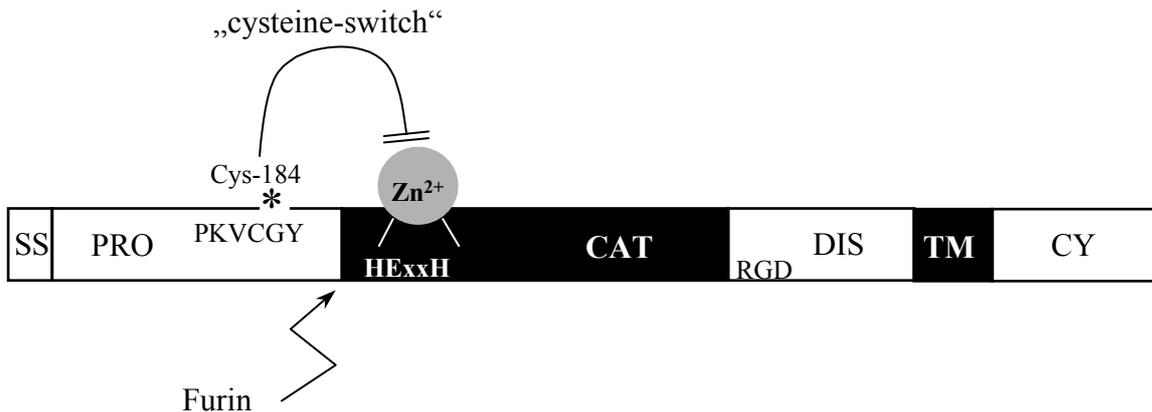
Effekte unter anderem durch direkte Cytotoxizität, Störung der elektromechanischen Koppelung, myozytäre Apoptose, durch die Induktion von Cytokinen, die die Herzfunktion herabsetzen (IL-1, IL-2, IL-6) und durch eine Beeinträchtigung der Calcium-Homöostase in den Myozyten, die zur kontraktilen Dysfunktion führt (Meldrum, 1998) (siehe Abbildung 4). Aber auch entzündliche Prozesse, wie sie durch TNF- $\alpha$  gefördert werden, lassen sich als Vermittler des Reperfusionsschadens denken, so z. B. die Induktion von Adhäsionsmolekülen (ICAM/VCAM) am Endothel (Kupatt, Habazettl et al., 1999) oder die Aktivierung und Einwanderung von Leukozyten ins Gewebe.

## I.2 TNF- $\alpha$ converting enzyme (TACE/ADAM17)

Bereits vor der Klonierung von TACE hatten Befunde von Inhibitorstudien auf die Beteiligung einer Metalloprotease bei der Freisetzung ("shedding") von membranständigem TNF- $\alpha$  hingewiesen (Gearing, Beckett et al., 1994; McGeehan, Becherer et al., 1994; Mohler, Sleath et al., 1994). Die Identifizierung von TACE als "die TNF- $\alpha$  Sheddase" wurde von zwei Arbeitsgruppen simultan veröffentlicht (Black, Rauch et al., 1997; Moss, Jin et al., 1997). Inzwischen sind etliche weitere TACE-Substrate bekannt, unter anderen TGF- $\alpha$ , p75 TNFR, L-Selektin, TRANCE/OPGL sowie möglicherweise p55 TNFR, M-CSFR und IL-6R (Althoff, Reddy et al., 2000; Lum, Wong et al., 1999; Peschon, Slack et al., 1998; Rovida, Paccagnini et al., 2001). Ferner ist TACE eine  $\alpha$ -Sekretase für das Alzheimer-Amyloid ( $\beta$ APP) (Buxbaum, Liu et al., 1998).

Phylogenetisch läßt sich TACE in die Familie der ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) einordnen (Primakoff & Myles, 2000). Diese bislang 31 Mitglieder umfassende Proteinfamilie stellt eine Unterart der Metzinkin-Superfamilie dar, zu der unter anderem die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) zählen. Die größte Sequenzverwandtschaft von TACE innerhalb der ADAMs besteht zu Kuzbanian (ADAM10/KUZ).

TACE ist ein 831 Aminosäuren langes, konstitutiv exprimiertes (Black, Rauch et al., 1997) Typ I Transmembranprotein mit für die ADAMs charakteristischem Multi-Domänenaufbau (Abbildung 5): einem kurzen N-terminalen Signalpeptid folgt die ca. 200 Aminosäuren lange Prodomäne, die 255 Aminosäuren lange katalytische Metalloproteasedomäne, die sogenannte Disintegrin-Domäne, eine Cystein-reiche Domäne, die Transmembrandomäne und die C-terminale cytoplasmatische Domäne.



**Abbildung 5: TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) zeigt einen für die ADAM-Superfamilie typischen Multidomänen-Aufbau.** TACE wird als inaktives Proenzym synthetisiert. In diesem Zustand ist das zentrale Zinkion durch die Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes (Cys-184) innerhalb der Prodomäne komplexiert, so daß die proteolytische Aktivität von TACE unterbunden ist. Das Enzym läßt sich proteolytisch durch Entfernung der Prodomäne aktivieren ("cysteine-switch"). Vermutlich ist hierfür eine Furin-ähnliche Proproteinkonvertase verantwortlich. SS = Signalsequenz, PRO = Prodomäne, PKVCGY = Cysteine-switch-Motiv (Pro180-Lys182—Val183-Cys184-Gly185-Tyr186), CAT = katalytische Domäne, HExxH = Zink-bindungsmotiv (His-Glu-X-X-His) im katalytischen Zentrum, DIS = Disintegrin-Domäne, RGD = Integrin-bindungsmotiv (Arg-Gly-Asp), TM = Transmembrandomäne, CY = cytoplasmatische Domäne.

Die Rolle der Disintegrin-Domäne, die ein RGD-Motiv enthält, ist noch unbekannt. Eine Adhäsionsfunktion kommt in sofern in Frage, als für einige ADAMs gezeigt werden konnte, daß sie mit Integrinen interagieren (Bridges, Tani et al., 2002; Cal, Freije et al., 2000; Eto, Puzon-McLaughlin et al., 2000; Zhou, Graham et al., 2001).

Das katalytische Zentrum beinhaltet die Sequenz HExxH, ein Konsensusmotiv, das der Bindung eines zentralen Zinkions dient. Es ist charakteristisch für Mitglieder der Metzinkin-Superfamilie.

Wie für andere Mitglieder der Metzinkine beschrieben, enthält auch die Prodomäne von TACE einen sogenannten "cysteine switch" (Grams, Huber et al., 1993). Gemeint ist hiermit ein Konsensus-Motiv (PKVCGY<sup>186</sup>), dessen Cystein (Cys-184) über seine Sulfhydrylgruppe das zentrale Zinkion komplexiert und somit die katalytische Funktion des Enzyms blockiert. Man nimmt an, daß die Prodomäne abgespalten werden muß, damit TACE enzymatisch aktiv werden kann. Diese proteolytische Aktivierung findet vermutlich im *trans*-Golgi Netzwerk statt (Schlondorff, Becherer, Blobel, 2000) und wird durch Furin oder eine verwandte Proproteinkonvertase vermittelt, wie dies für einige Mitglieder der ADAM-Familie, u. a. MDC9, ADAM12 und MDC15 (Loechel, Gilpin et al., 1998; Lum, Reid, Blobel, 1998; Roghani, Becherer et al., 1999) gezeigt werden konnte. Einen Hinweis hierauf liefert die vorhandene Konsensus-Spaltsequenz für Furin zwischen Pro- und katalytischer Domäne von TACE (Clarke, Wolfson et al., 1998).

Die Tatsache, daß das "shedding" von Protein-Ektodomänen ein regulierter (Althoff, Mullberg et al., 2001; Arribas, Lopez-Casillas, Massague, 1997; Codony-Servat, Albanell et al., 1999; Fitzgerald, Wang et al., 2000; Gechtman, Alonso et al., 1999; Nath, Williamson et al., 2001; Zhang, Jiang et al., 2000; Zhang, Kolls et al., 2000; Zhang, Oliver et al., 2001), die Prozessierung durch Furin im *trans*-Golgi jedoch ein konstitutiver Prozeß ist, spricht dafür, daß neben dieser Art der Aktivierung noch andere Regulationsmechanismen für ADAM-Proteasen existieren.

Denkbar, jedoch bisher kaum untersucht, wäre beispielsweise eine Regulation über die cytoplasmatische Domäne von TACE, die über potentielle Phosphorylierungsstellen verfügt. Zumindest in einem Fall konnte die direkte Interaktion von TACE mit einer MAPKKK (Extracellular signal-Regulated Kinase, ERK) sowie die Phosphorylierung von TACE durch ERK nachgewiesen werden (Diaz-Rodriguez, Montero et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit der TACE-Regulation könnte die Inaktivierung des "Cysteine switch" innerhalb der inhibitorischen Prodomäne sein. So verfügt das Cystein an Position 184 über eine redox-sensitive Sulfhydryl-(SH-)Gruppe, durch welche die Komplexierung des  $Zn^{2+}$  im katalytischen Zentrum vermittelt wird (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Es wäre daher vorstellbar, daß eine Oxidation an dieser Stelle über eine Konformationsänderung zur Freigabe des Zinks und mithin zu einer Aktivierung von TACE führen könnte. Dieses Prinzip einer akuten Aktivierung durch Oxidation des "cysteine switch", der ohne einen proteolytischen Prozeß auskommt, ist z. B. für die Matrix-Metalloprotease MMP-7 beschrieben worden (Fu, Kassim et al., 2001).

### **I.3 Fragestellung und experimenteller Ansatz**

Drei Fragestellungen standen im Vordergrund des Interesses:

- 1) Welches ist (sind) die Quelle(n) von postischämisch freigesetztem TNF- $\alpha$  im Herzen?
- 2) Welche Rolle spielt TACE bei der TNF- $\alpha$ -Freisetzung während der Reperfusion des ischämischen Herzens?
- 3) Wird TACE bei myokardialer Ischämie/Reperfusion durch Oxidation des "cysteine switch" oder durch einen anderen Mechanismus (z. B. gesteigerte Translation, vermehrte proteolytische Prozessierung) aktiviert?

Zur Klärung dieser Fragen wurden zwei Modelle verwendet: das isolierte, perfundierte Rattenherzpräparat und verschiedene Zellspezies (Leukozyten aus humanem, peripherem Blut, humane Lymphozyten-, Monozyten- und Mastzelllinien).

## II. Material und Methoden

### II.1 Material und Bezugsquellen

#### II.1.1 Substanzen

Ac-Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala: Biosource, Nivelles, Belgien

Ac- Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH<sub>2</sub>: Biosource, Nivelles,  
Belgien

Acrylamid/Bisacrylamid: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Aprotinin: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

APS (Ammonium-Persulfat): Sigma, St. Louis, USA

Ascorbinsäure (Vitamin C): Fluka, Buchs, Schweiz

BCA Protein Assay (Reagenzien A und B), Pierce, Rockford, IL, USA

Benzamidin: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Bromphenolblau: Sigma, St. Louis, USA

BSA (bovines Serum-Albumin): Merck, Darmstadt, Deutschland

Butanol: Fluka, Buchs, Schweiz

Chemilumineszenz Nachweiskit: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Complete<sup>®</sup> Proteaseninhibitor-Cocktail: Roche, Basel, Schweiz

DABCYL-TNF- $\alpha$ -EDANS (4-(4-Dimethylaminophenylazo)Benzoyl-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-5-[(2-Aminoethyl)Amino]Naphtalen-1-Sufonsäure):  
Bachem, Heidelberg, Deutschland

DMSO (Dimethylsulfoxid): Merck, Darmstadt, Deutschland

Diethylether (zur Narkose): Hoechst, Frankfurt a. M., Deutschland

DTT (Dithiothreitol): Sigma, St. Louis, USA

EDTA (Ethylen-Diamin-tetra-Acetat): Merck, Darmstadt, Deutschland

FCS (fetales Kälberserum): Biochrom AG, Berlin, Deutschland

FMLP (N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin): Sigma, St. Louis, USA

Formalin (10%): Sigma, St. Louis, USA

Gentamycin: Sigma, St. Louis, USA

Glucose: Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycerin: Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycin: Merck, Darmstadt, Deutschland

GSH (reduziertes Glutathion): Boehringer, Mannheim, Deutschland

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid): Merck, Darmstadt, Deutschland

HAES (Hydroxyethylstärke, 6%): Fresenius, Bad Homburg, Deutschland

Hypoxanthin: Sigma, St. Louis, USA

IFN- $\gamma$  (humanes Interferon- $\gamma$ ): Endogen, Woburn, USA

Isopropanol (2-Propanol): AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Ketotifen-Fumarat: Sigma, St. Louis, USA

Leupeptin: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

LPS (*S. typhimurium* Lipopolysaccharid): Sigma, St. Louis, USA

Methanol: Merck, Darmstadt, Deutschland

2-Mercaptoethanol: Fluca, Neu-Ulm, Deutschland

Milchpulver: Uelzena, Uelzen, Deutschland

MMP-Inhibitor II: Calbiochem, Darmstadt, Deutschland

Monothioglycerin: Sigma, St. Louis, USA

NAC (N-Acetyl-L-Cystein): Sigma, St. Louis, USA

Natrium-Citrat: Sigma, St. Louis, USA

Natrium-Dichloro-s-Triazintrion: Merck, Darmstadt, Deutschland

NEAA (non-essential amino-acids): Gibco, Karlsruhe, Deutschland

NP-40 (Nonidet P-40): Sigma, St. Louis, USA

OPI media supplement: Sigma, St. Louis, USA

ortho-Phenanthrolin: Sigma, St. Louis, USA

Oxypurinol: ICN, Costa Mesa, CA, USA

Pefabloc: Roche, Basel, Schweiz

Penicillin/Steptomycin: Sigma, St. Louis, USA

Pepstatin A: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Percoll: Pharmacia, Uppsala, Schweden

Pferdeserum: Biochrom, Berlin, Deutschland

PMA (Phorbol-12-Myristat-Acetat): Sigma, St. Louis, USA

SDS (Natrium-Dodecylsulfat): AppliChem, Darmstadt, Deutschland

SOD (Superoxid-Dismutase aus boviner Leber): Sigma, St. Louis, USA

SIN-1 Hydrochlorid (3-Morpholinosydnonimine-HCl): Alexis, Grünberg, Deutschland

TACE (TNF- $\alpha$ -converting enzyme, human recombinant): Novartis Pharma, Basel, Schweiz bzw. Immunex, Seattle, WA, USA

TAPI-2 (N-(R)-(2-(Hydroxyaminocarbonyl)methyl)-4-methylpentanoyl-L-t-Butyl-Gly-L-Ala-2-Aminoethylamid ("TNF- $\alpha$ -protease inhibitor")): Peptides International, Louisville, USA

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin): Sigma, St. Louis, USA

TIMP-3 (Tissue Inhibitor of Metalloproteases-3): Chemicon, Hofheim, Deutschland

Tris-Base: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Triton X-100: Sigma, St. Louis, USA

Trypanblau: Sigma, St. Louis, USA

Tumor-Nekrose-Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ , human): Endogen, Woburn, MA, USA

Tween 20: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

XO (Xanthin-Oxidase aus Kuhmilch): Boehringer, Mannheim, Deutschland

## II.1.2 Puffer und Lösungen

### PBS<sup>-</sup> (Calcium-free phosphate buffered saline)

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
8,0	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,47	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH	7,4	

### PBS<sup>+</sup> (Phosphate buffered saline)

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
6,5	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,47	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2	mM	MgCl <sub>2</sub>
0,68	mM	CaCl <sub>2</sub>
pH	7,4	

### Tyrode-Lösung

137	mM	NaCl
2,6	mM	KCl
1,0	mM	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
3,0	mM	CaCl <sub>2</sub>
1,0	mM	Tris-Base
0,1	%	Glukose
pH	7,4	

### Krebs-Henseleit-Puffer (Perfusat)

126	mM	NaCl
24	mM	NaHCO <sub>3</sub>
4,7	mM	KCl
0,6	mM	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
1,25	mM	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
1,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,3	mM	Pyruvat
5,5	mM	Glucose
5	U/l	Insulin

Die Begasung mit 94.4% O<sub>2</sub> und 5.6% CO<sub>2</sub> ergibt einen pH von 7.4 +/- 0.5

Das Mischverhältnis beider Gase wurde über eine Gasmischpumpe (K. Wösthoff OHG, Bochum, Deutschland) eingestellt (siehe Abbildung 6).

Hypochlorit/Hypochlorige Säure Stammlösung

1,0 mM Na-Dichloro-s-Triazintrion  
in Aqua bidest

Durch spontane Hydrolyse entsteht eine 2mM Hypochlorit-(OCl<sup>-</sup>)-Lösung. Bei neutralem pH liegt etwa die Hälfte des Hypochlorits als hypochlorige Säure (HOCl) vor. Die Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt und sofort verbraucht.

Fixierlösung für FACS, Histologie und Immunfluoreszenz

1,0 % Formalin (w/v) in PBS<sup>+</sup>

Permeabilisierungs-Lösung

0,2 % Triton X-100 (w/v) in PBS<sup>+</sup>

Blockier-Lösung für die Immunfluoreszenz

0,2 % BSA (w/v) in PBS<sup>+</sup>

Homogenisierungspuffer für TACE Western Blot

50 mM Tris-HCl pH 7,4  
1 mM DTT  
0,1 mM ortho-Phenanthrolin  
0,2 % Nonidet P-40 (w/v)  
1 Tablette Complete<sup>®</sup> auf 10 ml Puffer

Homogenisierungspuffer für Peptid-Assay

50 mM Tris-HCl pH 7,4  
320 mM Sucrose  
1 mM DTT  
10 µg/ml Leupeptin  
2 µg/ml Aprotinin  
1 mM NaVO<sub>4</sub>  
10 mM NaMoO<sub>4</sub>  
5 mM NaF  
0,2 % Nonidet P-40 (w/v)

Reaktionspuffer für Peptid-Assay

50 mM Tris-HCl pH 7,4  
1 mM DTT  
1 mM NaVO<sub>4</sub>  
10 mM NaMoO<sub>4</sub>  
0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
5 mM NaF

Solubilisierungspuffer für PBL-Membranfraktionen

10	µg/ml	Leupeptin
400	µM	Benzamidin
5	µM	Pepstatin A
2	µg/ml	Aprotinin
1	%	Triton X-100 (w/v)
in PBS		

Lysepuffer für TACE Western Blot

20	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1	mM	DTT
1	mM	EDTA
1	mM	PefaBlock
1	µM	Leupeptin
1	µM	Pepstatin A
50	mM	NaF
40	mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
1	mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
1	mM	ortho-Phenanthrolin
0,2	%	Nonidet P-40 (w/v)
1	Tablette Complete <sup>®</sup> in 10ml PBS	

4x Auftrags-Puffer für Western Blot

250	mM	Tris-HCl pH 6,8
400	mM	Mercaptoethanol
8	%	SDS (w/v)
40	%	Glycerin (v/v)
0,02	%	Bromphenolblau (w/v)

Western Laufpuffer

25	mM	Tris-HCl pH 6,8
192	mM	Glycin
0,1	%	SDS (w/v)

Western Transferpuffer

39	mM	Glycin
48	mM	Tris-HCl pH 8,0
0,037	%	SDS (w/v)
10	%	Methanol (v/v)

Western Blockierlösung

200	mM	NaCl
50	mM	Tris-Base pH 7,5
3	%	BSA (w/v)
0,03	%	Tween 20 (v/v)
10	%	Pferdeserum (w/v)

Trockenmilchpulver-Lösung

(zur Minimierung unspezifischer Antikörper-Bindung an den Western Blot:)

3% Trockenmilchpulver (w/v) in PBS<sup>+</sup>

Western Waschpuffer

50	mM	Tris-Base
0,15	M	NaCl
mit oder ohne 0,3% Tween 20 (w/v)		
pH	7,5	

Chemilumineszenzlösungen für Western blot

(A)		
100	mM	Tris-Base
2,5	mM	Luminol
0,4	mM	Cumarinsäure
pH	8,5	

(B)		
100	mM	Tris-Base
1,5	%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
pH	8,5	

Zur Entwicklung des Blots wurden die Lösungen (A) und (B) im Verhältnis 1:1 gemischt.

Polyacrylamid-Gele für Western blot(A) 2 Sammelgele 4% (für 5ml)

3,0	ml	H <sub>2</sub> O bidest
1,25	ml	0,5M Tris pH 6,8
660	µl	Acrylamid/Bisacrylamid
50	µl	10% SDS (w/V)
25	µl	10% Ammoniumpersulfat
5	µl	TEMED

**(B) 2 Trenngele 10% (für 15ml)**

6,03	ml	H <sub>2</sub> O bidest
3,75	ml	1,5M Tris pH 8,8
150	µl	10% SDS (w/V)
5,0	ml	Acrylamid/Bisacrylamid
75	µl	10% APS
7,5	µl	TEMED

**(C) 2 Trenngele 12% (für 15ml)**

5,01	ml	H <sub>2</sub> O bidest
3,75	ml	1,5M Tris pH 8,8
150	µl	10% SDS (w/V)
6,0	ml	Acrylamid/Bisacrylamid
75	µl	10% APS
7,5	µl	TEMED

**II.1.3 Nucleinsäuren**

Das Plasmid pME18S-TNF- $\alpha$  wurde von W. H. Newman (Mercer University, Macon, GA, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um einen Vektor für die Genexpression in Säugetierzellen. Das Plasmid trägt die cDNA für humanen TNF- $\alpha$  (Wang, Creasey et al., 1985) als ca. 0,7 kb EcoRI-BamHI-Insert. Das TNF- $\alpha$ -Gen ist unter der Kontrolle des starken, chimären Promoters SR $\alpha$  (Takebe, Seiki et al., 1988).

**II.1.4 Antikörper****Anti-TACE-Antikörper:****(1) C-terminal:**

**RABBIT ANTI-TACE/ADAM17** (Chemicon International, Temecula, CA, USA): Polyklonaler Antikörper gegen ein Peptid, das den Aminosäuren 807-823 von humanem TACE entspricht. Reagiert mit humanem und Ratten-TACE

**C-15** (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA): Affinitäts-gereinigter polyklonaler Antikörper (Spezies: Ziege) gegen ein Peptid aus dem C-Terminus von humanem TACE. Geeignet für die Anfärbung von Paraffinschnitten. Reagiert mit humanem, Mäuse- und Ratten-TACE.

**huTACE-M222** (Immunex Corporation, Seattle, WA, USA): Monoklonaler Antikörper (Spezies: Maus) gegen humanes TACE; erkennt nur unreduziertes Protein.

## (2) N-terminal:

**H-300** (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA): Polyklonaler Antikörper (Spezies: Kaninchen) gegen ein rekombinantes Peptid, das den Aminosäuren 1-300 von humanem TACE entspricht. Paraffingängig. Reagiert mit humanem, Mäuse- und Ratten-TACE.

## (3) Prodomänen-spezifisch:

**RP2ADAM-17** (Triple Point Biologics, Portland, OR, USA): Polyklonaler Antikörper (Spezies: Kaninchen) gegen ein synthetisches Peptid, das der Prodomäne von humanem TACE entspricht. Der Antikörper erkennt laut firmeneigenem Datenblatt menschliches, Ratten-, und Schweine-TACE; eigene Versuchen zeigten, daß er ebenfalls mit murinem TACE reagiert.

**RP4ADAM-17** (Triple Point Biologics, Portland, OR, USA): Polyklonaler Antikörper (Spezies: Kaninchen) gegen ein synthetisches Peptid, das den "cysteine-switch" und die Furin-Spaltsequenz beinhaltet. Erkennt laut Datenblatt menschliches, Ratten- und Schweine-TACE, reagierte jedoch auch mit Mäuse-TACE (im eigenen Versuch).

Anti-TNF- $\alpha$  Antikörper:

## (1) Für FACS/Immunfluoreszenz:

**Klon # 2B3A6A2** (Biosource, Nivelles, Belgien): Monoklonaler Antikörper (Spezies: Maus) gegen humanen, rekombinanten TNF- $\alpha$ ; an den Antikörper ist die fluorogene Gruppe FITC (Fluorescein-iso-Thiocyanat) gekoppelt.

## (2) Für Western Blot/Immunfluoreszenz:

**Anti-Human TNF $\alpha$  Polyclonal** (Endogen, Woburn, MA, USA): Polyklonaler Antikörper (Spezies: Kaninchen) gegen humanen TNF- $\alpha$ .

**Anti-Mouse TNF $\alpha$  Polyclonal** (Endogen, Woburn, MA, USA): Polyklonaler Antikörper (Spezies: Kaninchen) gegen murinen TNF- $\alpha$ . Erkennt auch Ratten-TNF- $\alpha$ .

Sekundäre Antikörper:

## (1) Für die Immunfluoreszenz:

**Anti-Ziege** (Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande): Alexa Fluor 488-gekoppeltes IgG

**Anti-Kaninchen** (Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande): Alexa Fluor 563-gekoppeltes IgG

(2) Für Western blotting:

**HRP-anti-rabbit IgG** (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland): Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes IgG

### II.1.5 ELISA-Kits

"Human TNF- $\alpha$  ultrasensitive" und "Rat TNF- $\alpha$  ultrasensitive" ELISA-Kits stammten von Biosource, Nivelles, Belgien. Der Histamin-ELISA-Kit stammte von Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland.

### II.1.6 Tiere

Ratten (Wistar) stammten entweder aus der hauseigenen Zucht oder wurden vom Labortierhandel Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Es wurden bevorzugt männliche Tiere von 200-500g verwendet.

## II.2 Methoden

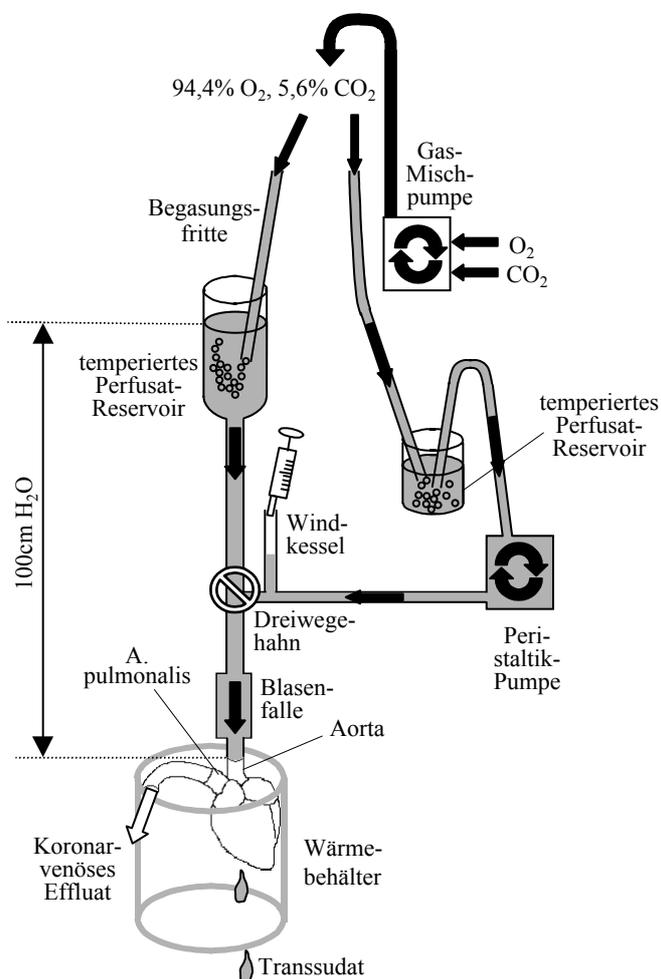
### II.2.1 Versuche am isolierten Rattenherzen

Alle Herzpräparate wurden im Langendorff-Modus perfundiert (Langendorff, 1895). Die Perfusion erfolgte stets druckkonstant (100cm H<sub>2</sub>O), mit Ausnahme einer Gruppe von Herzen ("low-flow", siehe unten). Während der globalen Ischämie wurden die Herzen in ein Bad aus 37°C warmer Tyrode-Lösung getaucht.

#### a) Isolation und Perfusion

**Präparation:** Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert und durch Durchtrennung der Aa. carotides teilweise entblutet. Nach rascher Eröffnung des Thorax wurde das Herz mit kalter 0,9% NaCl-Lösung überspült, um es zum Stillstand zu bringen. Lungen, Thymus und Perikardreste wurden entfernt und die Aorta ascendens knapp unterhalb des Aortenbogens angeschnitten. Eine Metallkanüle, die über einen Kunststoff-Schlauch mit der Perfusionsanlage verbunden war, wurde sodann in die Aorta eingebunden. Durch Perfusion mit warmem, sauerstoffbegastem Krebs-Henseleit-Puffer begann das Herz wieder

zu schlagen. Die präparationsbedingte Ischämie-Dauer betrug 2-5 Minuten. Nach der Durchtrennung von Aorta, A. pulmonalis, V. acygos und Vv. cavae inferior und superior ließ sich das Herz aus dem Thorax entnehmen und in der Perfusionsanlage befestigen. Die Vv. cavae, V. acygos und Vv. pulmonales wurden ligiert und eine zweite Stahlkanüle in die A. pulmonalis eingebunden. Das Ende dieser Kanüle war mit einem Flußmesser versehen, mit dessen Hilfe sich der Koronarfluß während des Experiments kontinuierlich überwachen ließ. Er betrug bei Herzen von 200-300g schweren Tieren typischerweise 4-5ml/min. Das vom Epikard abtropfende sog. Transsudat, eine Mischung aus interstitieller Flüssigkeit und kardialer Lymphe, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten in Eppendorff-Reagenzbehältern gesammelt. Die von den Rattenherzen abgegebene Transsudat-Menge variierte sehr stark (ca. 20 bis 300 $\mu$ l/min).



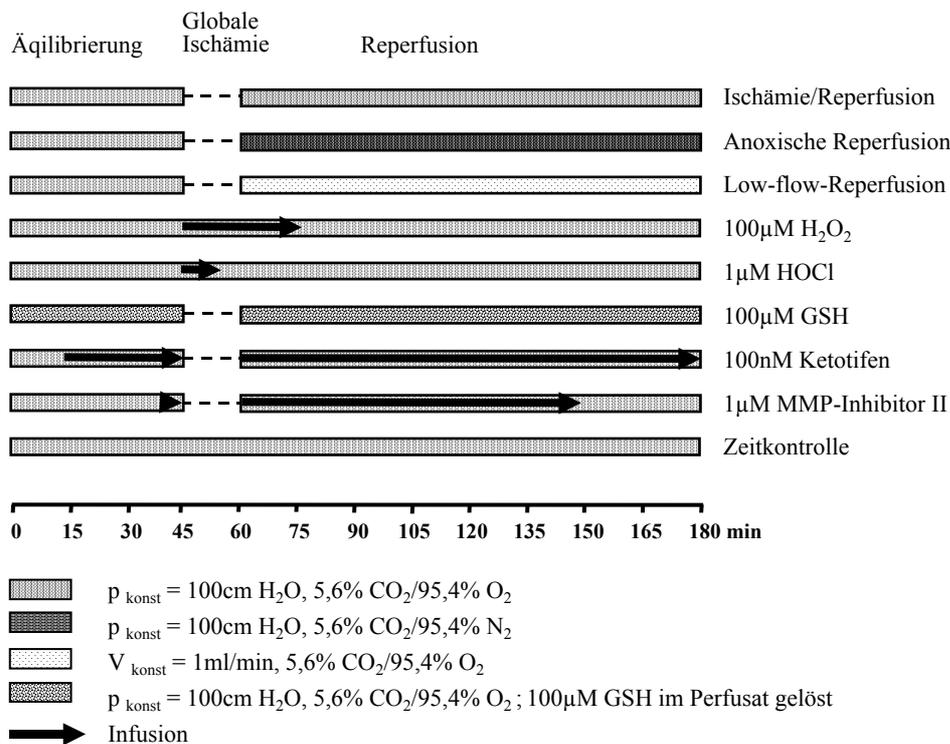
**Abbildung 6: Langendorff-Perfusion.**

**Perfusion:** Die Perfusion der Herzen erfolgte im Langendorff-Modus, d. h. sie verrichteten keine Druck-Volumen-Arbeit, sondern wurden retrograd über die Aorta passiv mit Koronarperfusat versorgt. Das Perfusat, eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (KHB), wurde in einem Reservoir auf 100cm Höhe über dem Herzen auf 37°C temperiert und

mittels Begasung mit 5,6% CO<sub>2</sub> auf einen pH von 7,4 eingestellt. Darüberhinaus wurde es mit 94,4% O<sub>2</sub> begast. Die globale Ischämie erfolgte, indem ein oberhalb des Herzens eingebauter Dreiwegehahn geschlossen wurde; erneutes Öffnen des Dreiwegehahns ermöglichte die Reperfusion. Für die flußkonstante Reperfusion (siehe unten) konnte das Perfusat nach der Ischämie aus einem anderen temperierten und begasten Reservoir dem Herzen über eine Peristaltikpumpe zugeführt werden. Nach Kalibrierung der Pumpe mittels eines Flußmessers konnte die Flußrate des Perfusats nach Belieben eingestellt werden. Eine schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsapparatur ist in Abbildung 6 gezeigt.

### b) Perfusionsprotokolle

Schematische Zusammenfassung siehe Abbildung 7.



**Abbildung 7: Verwendete Perfusionsprotokolle.** KHB = Krebs-Henseleit-Puffer, p<sub>konst</sub> = konstanter Perfusionsdruck, V<sub>konst</sub> = konstantes Volumen Perfusat pro Minute ("flußkonstante Reperfusion"). GSH = reduziertes Glutathion.

**Ischämie/Reperfusion:** (1) 45min Einschlagzeit: druckkonstante Perfusion (p<sub>konst</sub> = 100cm H<sub>2</sub>O) mit 37°C warmem KHB, begast mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4; (2) 15min globale, warme Ischämie: Perfusion unterbunden, Herz eingetaucht in 37°C warme Tyrode-Lösung; (3) 120min Reperfusion: druckkonstante Reperfusion (p<sub>konst</sub> = 100cm H<sub>2</sub>O) mit 37°C warmem KHB, 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4

**Zeitkontrolle:** (1) 180min druckkonstante Perfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem KHB, 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4

**Anoxische Reperfusion:** (1) 45min Einschlagzeit: druckkonstante Perfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem KHB, 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4; (2) 15min globale, warme Ischämie: keine Perfusion, Herz in Tyrode-Lösung, 37°C; (3) 90min Reperfusion: druckkonstante Reperfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem KHB, Begasung mit 94,4%N<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4

**Low-flow-Reperfusion:** (1) 45min Einschlagzeit: druckkonstante Perfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem KHB, begast mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4; (2) 15min globale, warme Ischämie: Perfusion unterbunden, Herz in 37°C warmer Tyrode-Lösung; (3) 120min Reperfusion: Flußkonstante Reperfusion mit auf 37°C temperiertem KHB, begast mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, jedoch bei verminderter Flußrate des Perfusats ( $V_{\text{konst}} = 1\text{ml/min}$ )

**GSH:** (1) 45min Einschlagzeit: druckkonstante Perfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem KHB, in dem reduziertes Glutation (GSH) in einer Konzentration von 100µM gelöst war (Begasung mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4); (2) 15min globale, warme Ischämie: Perfusion gestoppt, Herz in 37°C warmer Tyrode-Lösung; (3) 120min Reperfusion: druckkonstante Reperfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem, mit 100µM GSH versetztem KHB, 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4

**HOCl:** (1) 45min Einschlagzeit: druckkonstante Perfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem KHB, Begasung mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4; (2) 10min HOCl-Behandlung: Perfusion wie oben, jedoch mit gleichzeitiger 1:100 Infusion einer 100µM HOCl-Lösung oberhalb der Aortenkanüle (Endkonzentration von HOCl im Herzen: 1µM); (3) 110min Auswaschphase: Infusion gestoppt, Perfusion weiter mit 37°C warmem KHB,  $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ , Begasung mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** (1) 45min Einschlagzeit: druckkonstante Perfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem KHB, Begasung mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4; (2) 30min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung: Perfusion wie oben, jedoch mit gleichzeitiger 1:100 Infusion einer 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (Endkonzentration im Herzen: 100µM) oberhalb der Aortenkanüle; (3) 90min Auswasch-

phase: Infusion gestoppt, Perfusion weiter mit 37°C warmem KHB,  $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ , Begasung mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4

**Ketotifen:** (1) 15min Einschlagzeit: druckkonstante Perfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem KHB, Begasung mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4; (2) 30min Vorbehandlung mit Ketotifen: Perfusion wie oben, jedoch mit gleichzeitiger ca. 1:100 Infusion einer 10µM Ketotifen-Lösung oberhalb der Aortenkanüle (Endkonzentration von Ketotifen im Herzen: 50-100nM); (3) 15min globale, warme Ischämie: Perfusion unterbunden, Herz eingetaucht in 37°C warme Tyrode-Lösung; (4) 120min Reperfusion mit Ketotifen-Behandlung: Reperfusion mit 37°C warmem KHB,  $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ , Begasung mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4, Ketotifen-Infusion weiter wie oben

**MMP-Inhibitor II:** (1) 40min Einschlagzeit: druckkonstante Perfusion ( $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ ) mit 37°C warmem KHB, Begasung mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4; (2) 5min Vorbehandlung mit MMP-Inhibitor II (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland): Perfusion weiter wie oben, jedoch mit gleichzeitiger 1:100 Infusion einer 100µM Inhibitor-Lösung oberhalb der Aortenkanüle (Endkonzentration des Inhibitors im Herzen: 1µM); (3) 15min globale, warme Ischämie: Perfusion unterbunden, Herz eingetaucht in 37°C warme Tyrode-Lösung; (4) 120min Reperfusion mit MMP-Inhibitor: Reperfusion mit 37°C warmem KHB,  $p_{\text{konst}} = 100\text{cm H}_2\text{O}$ , Begasung mit 94,4%O<sub>2</sub>/5,6%CO<sub>2</sub>, pH = 7,4, Inhibitor-Infusion weiter wie oben

### c) Nachweis von TNF-α und Histamin

TNF-α und Histamin wurden im Transsudat von Rattenherzen mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) nachgewiesen. Die Kits stammten von Biosource (Rat TNF-α ultrasensitive) bzw. von Immunotech/Beckman Coulter (Histamine Enzyme Immunoassay Kit). Die Durchführung der ELISAs erfolgte nach den Anleitungen der jeweiligen Hersteller.

### II.2.2 Zellkultur

- Jurkat T-Zellen wurden bei 37°C unter 5%CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit 200U/ml Penicillin/Streptomycin und 20% fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert.
- Die humane Monozyten-Zelllinie Mono Mac 6 wurde bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> in Pyrogen-freiem RPMI 1640 mit 2mM L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) kultiviert. Das Medium enthielt weiterhin folgende Zusätze: 200U/ml Penicillin/Streptomycin, 10ml/l OPI media supplement, 10ml/l *non-essential amino acids* und 20% FCS. Vor dem

Zusatz des Kälberserums wurde das Medium über einen Ultrafilter (U 2000, Gambro, Martinsried, Deutschland) gereinigt, um Kontamination durch bakterielle Antigene auszuschließen.

- Die humane Mastzelllinie HMC-1 wurde bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> in ISCOVE's Medium (Biochrom) kultiviert, das mit 10% Eisen-supplementiertem FCS, 1,2mM Monothioglycerin und 10µg/ml Gentamycin (jeweils von Sigma) versetzt war.

### II.2.3 Isolierung von Zellen aus humanem peripheren Blut

20ml venöses Blut von gesunden, freiwilligen Spendern (Alter: 23-45 Jahre) wurde zur Gerinnungshemmung mit Natrium-Citrat (Endkonzentration: 0,38%) versetzt und unmittelbar nach der Gewinnung zentrifugiert (15min, 190 x g). Die oberen 95% des Überstandes (Plasma) wurden verworfen, die Interphase ("buffy coat") wurde mit einer 6%igen Hydroxyethylstärke-(HES-)Lösung gemischt und auf ein Endvolumen von 15ml gebracht. Die Mischung wurde daraufhin zentrifugiert (10min, 50 x g), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und ein weiteres Mal (10min, 380 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5ml PBS<sup>-</sup> resuspendiert und vorsichtig über 5ml Percoll (Dichte: 1,077g/ml) geschichtet. Nach 25min Zentrifugation (380 x g) wurde die Interphase (periphere Blut-Leukozyten, PBL) gewonnen, einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und in Tyrode-Lösung (pH 7,4, 25°C) aufgenommen.

Periphere Blut-Monozyten (PBMC) wurden gewonnen, indem die wie oben beschrieben hergestellte PBL-Suspension mit 10µl Magnetpartikel-gekoppeltem anti-CD14-Antikörper (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) inkubiert und anschließend über eine Magnetsäule gereinigt wurde (Miltenyi Biotec). Die Vorgehensweise wurde der Anleitung des Herstellers entnommen.

### II.2.4 Lyse von Zellen

#### a) Lyse von HMC-1 für TACE-Western Blot

Ca. 10<sup>6</sup> Zellen wurden bei 4°C in 200µl Lysepuffer durch wiederholtes Aufziehen in eine Insulinspritze lysiert. Lysate wurden zentrifugiert (5min, 12 000 x g), das Pellet verworfen und vom Überstand eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Zur Proteinbestimmung wurde der BCA<sup>®</sup> protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet, wobei nach dem Protokoll des Herstellers verfahren wurde. Als Mengenstandard diente bovines Serum-Albumin.

**b) Herstellung und Fraktionierung von PBL-Lysaten für die Fluorimetrie**

Ca.  $10^7$  Zellen wurden in einem geringen Volumen (50 $\mu$ l) PBS resuspendiert, und die Suspension wurde insgesamt 5 mal abwechselnd eingefroren (5min, -20°C) und wieder aufgetaut (5min, 37°C). Die so lysierten Zellen wurden abzentrifugiert (15min, 20 000 x g, 4°C); der Überstand entsprach der zytoplasmatischen Fraktion, das Pellet den Membranfraktionen. Das Pellet wurde in 30 $\mu$ l Solubilisierungspuffer aufgenommen und unter Rühren (2h, 4°C) gelöst. Schließlich wurde die Probe erneut zentrifugiert (30min, 20 000 x g, 4°C); die gelösten Membranproteine fanden sich im Überstand, die unlöslichen Membranbestandteile verblieben im Pellet.

**II.2.5 Homogenisierung von Herzen für TACE-Western Blot**

Rattenherzen wurden mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Aluminiumzange flachgepreßt, durch kurzes Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Etwa 175mg gefrorenes Gewebe wurden mit dem Mörser in flüssigem Stickstoff zerrieben, mit 2ml eisgekühltem Homogenisierungspuffer versetzt und die Suspension in einem Glas-Potter homogenisiert. Die Homogenate wurden für 30min mit 3900 x g bei 4°C zentrifugiert, die Pellets verworfen und die Überstände in ein neues Gefäß überführt. Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA<sup>®</sup> protein assay durchgeführt.

**II.2.6 Oxidative Stimulierung von Zellen**

Da die verwendeten Zelltypen konstitutiv nur wenig TNF- $\alpha$  exprimierten, wurde vor der oxidativen Stimulation z. T. eine Vorstimulation mit LPS durchgeführt, um die basale TNF- $\alpha$ -Expression zu erhöhen.

Eine Übersicht über die Versuchsprotokolle zur oxidativen Stimulierung verschiedener Zellen zeigt Tabelle 1.

Jurkat		MonoMac 6		PBL		HMC-1	
<b>Vor-Stimulation:</b>	Medium + LPS (50µg/ml) 3h, 37°C	<b>Vor-stimulation:</b>	Medium +LPS (10µg/ml) über Nacht, 37°C	<b>Vor-stimulation:</b>	keine	<b>Vor-stimulation:</b>	keine
1 x waschen (PBS <sup>-</sup> )		1 x waschen (PBS <sup>-</sup> )		<b>Stimulation:</b> 30min, 37°C Tyrode + PMA (50ng/ml), Antioxidanzien-Cocktail*, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100µM/1mM), HOCl (10µM)		<b>Stimulation:</b> 120min, 37°C Medium + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100µM/1mM), HOCl (10µM), PMA (100ng/ml)	
<b>Oxidative Stimulation:</b>	30min, 37°C, PBS +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100µM), HOCl (10µM)	<b>Oxidative Stimulation:</b>	30min, 37°C, PBS +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1mM/100µM), HOCl (10µM)				
TNF-α im Überstand: <b>ELISA</b>		TNF-α im Überstand: <b>ELISA</b>		TNF-α im Überstand: <b>ELISA</b> ; TNF-α auf der Zellmembran: <b>FACS</b>		TNF-α im Überstand: <b>ELISA</b> ; TNF-α auf der Zellmembran: <b>FACS</b>	

**Tabelle 1: Versuchsprotokolle zur oxidativen Stimulation von Zellen.** \*: 100µM reduziertes Glutathion (GSH), 100µM Ascorbinsäure, 200U/ml Superoxid-Dismutase (SOD) und 100µM Oxypurinol.

### II.2.7 Nachweis von TNF-α im Überstand oxidativ stimulierter Zellen

TNF-α-Konzentrationen in Zellkulturüberständen (Puffer oder Medium) wurden immunologisch mittels ELISA bestimmt. Der verwendete Kit stammte von Biosource ("human TNF-α ultrasensitive"). Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers.

### II.2.8 Messung von TNF-α auf der Oberfläche oxidativ stimulierter Zellen

Nach der Stimulation mit Oxidanzien (siehe Tabelle 1) wurden die PBL bzw. PBMC mit 1% Formalin (10min, RT) fixiert. Zur Entfernung von Oxidanzien und Formalin wurden sie sodann einmal mit Tyrode-Lösung (pH 7,4, RT) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1µg/ml anti-TNF-α-FITC in Tyrode-Lösung (pH 7,4, RT) lichtgeschützt gefärbt. Nach einem weiteren Waschschriff wurden sie in frischer Tyrode-Lösung resuspendiert. Fluoreszenz-Intensität und -Verteilung der Proben wurden im Durchfluß-

Zytometer (FACScan; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bestimmt. Der Median der Fluoreszenz der Proben wurde als "relative Fluoreszenz" aufgetragen.

### II.2.9 Spaltung des fluorogenen Peptids DABCYL-TNF- $\alpha$ -EDANS

Prinzip: DABCYL-TNF- $\alpha$ -EDANS besteht aus einer N-terminalen Fluoreszenz-absorbierenden Gruppe (DABCYL), einem 10 Aminosäuren langen Peptidanteil, der die TACE-Spaltsequenz von TNF- $\alpha$  beinhaltet, sowie einem C-terminalen Fluorophor (EDANS). Im ungespaltenen Zustand wird die Fluoreszenz der EDANS-Gruppe durch den benachbarten DABCYL-Rest unterbunden. Werden die beiden Gruppen durch Spaltung des Peptidanteils von DABCYL-TNF- $\alpha$ -EDANS räumlich voneinander getrennt, ist eine Fluoreszenz meßbar, welche als direktes Maß für die Peptidspaltung dient (Beekman, Drijfhout et al., 1996).

#### a) Peptidspaltung durch human-rekombinantes TACE

Human rekombinantes TACE (Arg 215 bis Asn 671, entsprechend der katalytischen und Disintegrin-Domäne) wurde von der Immunex Corporation (Seattle, WA, USA) bzw. von Novartis Pharma (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Das Peptid (Endkonzentration: 10 $\mu$ M) wurde mit TACE (Endkonzentration: 960ng/ml) in 50mM Tris inkubiert. In einigen Ansätzen befand sich zusätzlich der TACE-Inhibitor TAPI-2 (1 $\mu$ M). Die Fluoreszenz der Proben wurde in einer Kinetik-Messung ermittelt (SPECTRAFluor plus, TECAN, Salzburg, Österreich). Die Anregungs-Wellenlänge betrug 355nm, die Emissions-Wellenlänge 495nm.

#### b) Peptidspaltung durch intakte Zellen

PBL: Frisch isolierte Zellen wurden in 250mM Tris auf eine Zelldichte von 10<sup>6</sup>/ml eingestellt. Ein Teil der Ansätze enthielt den TACE-Inhibitor TAPI-2 (10 $\mu$ M). Einige Proben wurden mit 10 $\mu$ M HOCl (30min, 37°C) vorstimuliert. Anschließend wurden die Zellen 1 x gewaschen und in 250mM Tris resuspendiert. Nach Zugabe des Peptids (Endkonzentration: 10 $\mu$ M) wurde die Fluoreszenz-Kinetikmessung durchgeführt (siehe oben).

HMC-1: Die Zellen wurden bei RT 1 x mit Tyrode-Lösung (pH 7,4) gewaschen und die Zelldichte auf 10<sup>6</sup> Zellen/ml Tyrode eingestellt. Je 200 $\mu$ l Zellsuspension wurden in Eppendorff-Reaktionsgefäße gegeben. Ein Teil der Ansätze wurde mit dem TACE-Inhibitor TAPI-2 (50 $\mu$ M) versehen. Zuletzt wurde das Peptid zugegeben (Endkonzentration: 10 $\mu$ M) und die Fluoreszenzkinetik-Messung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Oxidativ stimulierte HMC-1: Die Vorstimulation der Zellen mit 10 $\mu$ M HOCl (2h, Tyrode, 37°C) erfolgte in Abwesenheit des Peptids, das der Zellsuspension erst nach einem Waschschrift (Tyrode) zugesetzt wurde.

c) Peptidspaltung durch PBL-Membranfraktionen

Je 15  $\mu$ l der verschiedenen Fraktionen wurden in 200 $\mu$ l 50mM Tris verdünnt. Einige Ansätze enthielten den TACE-Inhibitor TAPI-2 (Endkonzentration: 10 $\mu$ M). Das Peptid (Endkonzentration: 10 $\mu$ M) wurde zuletzt zugegeben. Die Ansätze wurden gemischt und für 60min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz gemessen (Endpunkt-Messung).

d) Peptidspaltung durch Herzextrakte

Homogenate aus Rattenherzen wurden 1:10 in Reaktionspuffer verdünnt. In einigen Ansätzen befand sich der TACE-Inhibitor TAPI-2 (50 $\mu$ M). Das Peptid (10 $\mu$ M) wurde erst kurz vor Beginn der Messung zugegeben. Die Fluoreszenz der Proben wurde in einer Kinetik-Messung sichtbar gemacht (s. oben). Unmittelbar vor jeder Messung wurden die Ansätze programmgesteuert geschüttelt.

## II.2.10 Spaltung von Ac-SPLAQAVRSSSR-NH<sub>2</sub> durch intakte Zellen

10<sup>7</sup> HMC-1 Zellen wurden 1 x mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und in 1ml PBS<sup>+</sup> mit oder ohne Zusatz von Complete<sup>®</sup> Inhibitor-Cocktail (1 Tablette auf 10ml Puffer) resuspendiert. Ein Teil der Proben enthielt zusätzlich verschiedene Metalloprotease-Inhibitoren (1mM o-Phenanthrolin, 10 $\mu$ M/ 100 $\mu$ M TAPI-2) oder wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200-500 $\mu$ M) oder HOCl (10 $\mu$ M) versetzt. Die Inkubation (1h/3h, 37°C) mit 17 $\mu$ M TNF- $\alpha$ -Peptid Ac-SPLAQAVRSSSR-NH<sub>2</sub> (Biosource, Nivelles, Belgien) erfolgte in zylindrischen Röhren unter ständigem Rotieren, um die Sedimentation der Zellen zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Zellen zum Teil mit <sup>1</sup>/<sub>10</sub> Volumen 4M HClO<sub>4</sub> angesäuert (ca. pH 3,0). Hierdurch wurden die Zellen lysiert, so daß auch ggf. intrazellulär vorhandenes Peptid mit der anschließenden HPLC erfaßt wurde. Sollte dagegen nur das im Überstand vorhandene Substrat nachgewiesen werden, so wurden die Zellen vor dem Ansäuern des Überstandes abzentrifugiert (1min, 12.000 x g). Die Proben wurden bei -20°C eingefroren.

## II.2.11 High pressure liquid chromatography (HPLC)

Der Nachweis der Peptide Ac-SPLAQAVRSSSR-NH<sub>2</sub> (= TNF- $\alpha$ -Peptid) und Ac-SPLAQA (= TACE-spezifisches Abbauprodukt) in sauren Zellextrakten bzw. in angesäuerten Zellüberständen erfolgte mittels *high pressure liquid chromatography*

(HPLC). Die Auftrennung erfolgte über eine C18-Aqua<sup>®</sup> Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland), die isokratische Elution wurde mit einem Gemisch aus 32% HClO<sub>4</sub> (pH 2,0), Methanol (41%) und Wasser (27%) vorgenommen. Der Nachweis von Substrat und Abbauprodukt erfolgte photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 200nm (L-7400 Detektor, Hitachi-Merck, Darmstadt, Deutschland). Bei einer Flußrate von 1ml/min betragen die Retentionszeiten 10,1min für Ac-SPLAQAVRSSSR-NH<sub>2</sub> bzw. 15,9min für Ac-SPLAQA.

## II.2.12 Histochemische und immunhistochemische Methoden

### a) Fixierung von Rattenherzen für Paraffinschnitte

Isolierte Rattenherzen wurden einige Minuten im Langendorff-Modus perfundiert und anschließend für 2min durch retrograde Perfusion mit einer 1%igen Formalinlösung (Flußrate: 4ml/min) fixiert. Anschließend wurden die Herzen aus der Perfusionsanlage entnommen, die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel durch einen Schnitt transversal zum Septum in zwei Teile zertrennt. Das Gewebe wurde in einer 1%igen Formalinlösung bei 4-8°C aufbewahrt. Die Einbettung der Ventrikel in Paraffin und die Anfertigung der 5µm dicken Gewebeschnitte erfolgte im Institut für Anatomie der LMU. Mastzellen wurden anhand ihrer Granula mit Alcianblau angefärbt; TNF-α und TACE wurden immunhistochemisch oder mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die primären Antikörper waren: a) für TNF-α: rabbit anti mouse polyclonal (Endogen) b) für TACE: (1) rabbit anti-TACE/ADAM17 (Chemicon) bzw. (2) H-300 (Santa Cruz Biotechnology) oder (3) C-15 (Santa Cruz Biotechnology). Die Sekundären Antikörper für die Immunfluoreszenz sind im Abschnitt "Antikörper" beschrieben.

### b) Färbung von Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie

10<sup>4</sup> bis 10<sup>5</sup> Zellen (HMC-1 bzw. PBMC) wurden mit Hilfe spezieller Zentrifugen-Einsätze (CytoSpin<sup>®</sup>; Heraeus, Hanau, Deutschland) auf Objektträger zentrifugiert und zur Fixierung mit einem Tropfen (ca. 25µl) 1%iger Formalin-Lösung bedeckt (20min, RT oder über Nacht in feuchter Kammer, RT). Nach einem Waschschrift (5min, PBS, RT) wurde ein Teil der Zellen permeabilisiert (2min, 0,2% Triton X-100 in PBS, RT) und sofort weitere dreimal gewaschen (5min, PBS, RT), um das Detergenz zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellen für 10min mit Blockierlösung bedeckt, um unspezifische Bindung des Antikörpers an die Glasoberfläche zu minimieren. Danach wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (45min, RT; Konzentration: 1µg/ml in Blockierlösung) inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe (5min, PBS<sup>+</sup>, RT) und die Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper (30min, 1:400 Verdünnung in Blockier-

lösung, RT). Nach einem letzten Waschschrift (5min, PBS<sup>+</sup>, RT) wurden die gefärbten Zellen mikroskopiert.

### **II.2.13 Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die Fluoreszenz-Mikroskopie wurde an einem konfokalen Lasermikroskop (LSM 410 invert laser scan microscope; Zeiss, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden digital gespeichert und verarbeitet (LSM-Programm, Version 3.80; Zeiss).

### **II.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine aus Zell-Lysaten oder Herz-Homogenaten wurden mittels SDS-PAGE (4% Sammelgel, 10% Trenngel) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40mA. Die Laufzeit (ca. 1h) wurde so gewählt, daß die Auftragungs-Pufferfront am Fuße des Gels anlangte. (Glasplatten, Spacer, Kämme und Gelkammer: Bio Rad<sup>®</sup>, München, Deutschland.)

### **II.2.15 Western blotting**

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels Western blotting nach der "semi-dry" Methode (Kyhse-Andersen, 1984).

### **II.2.16 Anfärbung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen**

Um den Erfolg des Transfers der Proteine aus dem Gel auf die Membran abzuschätzen, wurden die Proteinbanden mit Ponceau S gefärbt (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989). Die Proteinbanden wurden mittels eines digitalen Analysesystems (Gel Doc 1000, Bio Rad<sup>®</sup>, München, Deutschland) aufgenommen oder die gefärbte Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt und fotokopiert. Anschließend wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O bidest solange entfärbt, bis keine Banden mehr sichtbar waren.

### **II.2.17 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen**

Der spezifische Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte immunologisch mittels Antikörper (Harlow & Lane, 1988). TACE-Protein wurde mit dem primären Antikörper RABBIT ANTI-TACE/ADAM17 (Chemicon International, San Francisco, CA, USA) nachgewiesen, der zu 1µg/ml in Blockierlösung verdünnt eingesetzt wurde. Der sekundären Antikörper war ein Meerrettich-Peroxidase-(HRP-)gekoppelter anti-rabbit IgG (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland); er wurde 1:400 verdünnt in Blockier-

lösung eingesetzt. Die Entwicklung des Blots erfolgte mittels Chemilumineszenz, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde. Die Bandenintensität wurde mittels eines digitalen Analyssystems (Gel Doc 1000, Bio Rad<sup>®</sup>, München, Deutschland) dokumentiert.

### **II.2.18 Statistische Methoden**

Der Stichprobenumfang jeder Versuchsgruppe ist im Ergebnisteil angegeben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) oder ggf. als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Bei statistischem Vergleich von zwei unabhängigen Versuchsgruppen (Kontroll- und Interventionsgruppe) wurde der t-Test nach Student oder, falls keine Normalverteilung vorlag, der Rangsummentest nach Mann-Whitney verwendet. Bei Vergleich zweier unabhängiger Versuchsgruppen zu mehreren verschiedenen Zeitpunkten wurde die doppelte Varianzanalyse (two-way repeated measures ANOVA) mit anschließendem multiplen Vergleichstest nach Student-Newman-Keuls durchgeführt.

Unterschiede zwischen Gruppen wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Ordnung weniger als 5% betrug ( $p < 0,05$ ). Signifikante Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppe wurden mit (\*) bzw. ggf. mit (#) gekennzeichnet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Sigma Stat 1.0 (Jandel) durchgeführt.

## III. Ergebnisse

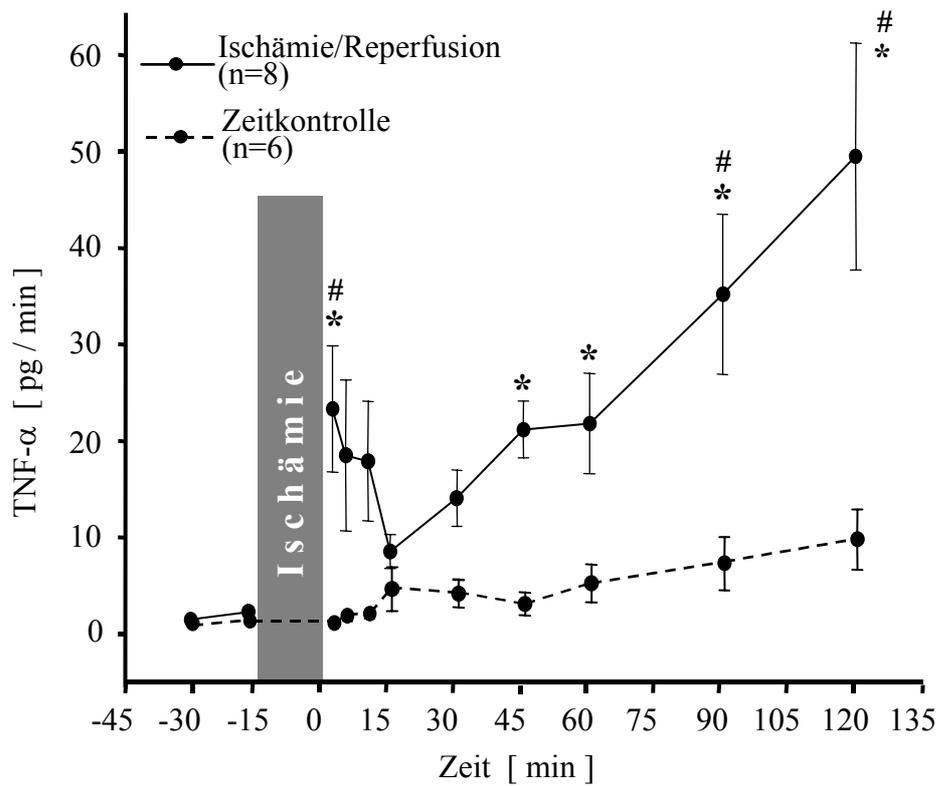
### III.1 Ischämische, reperfundierte Rattenherzen setzen TNF- $\alpha$ frei

Erste Versuche an isolierten, perfundierten Rattenherzen zeigten, daß nach der globalen Ischämie größere Mengen an TNF- $\alpha$  (maximal 60pg/min) freigesetzt werden (Abbildung 8). Kontrollherzen ohne Ischämie dagegen gaben während 180min Perfusion nur maximal ca. 3pg/min TNF- $\alpha$  ab (Abbildung 8). Bei ischämischen, reperfundierten Herzen war TNF- $\alpha$  nur im Transsudat<sup>1</sup>, nicht aber im Koronareffluat nachweisbar (Ergebnis nicht gezeigt).

Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus ischämischen, reperfundierten Rattenherzen wies einen dreiphasigen Zeitverlauf auf: Unmittelbar nach Beginn der Reperfusion wurden hohe Mengen des Cytokins freigesetzt (2-10min); es folgten eine Phase relativ niedriger TNF- $\alpha$ -Abgabe (15-45min) sowie ein später Anstieg (60-120min), dessen Endpunkt hier möglicherweise nicht erreicht wurde.

---

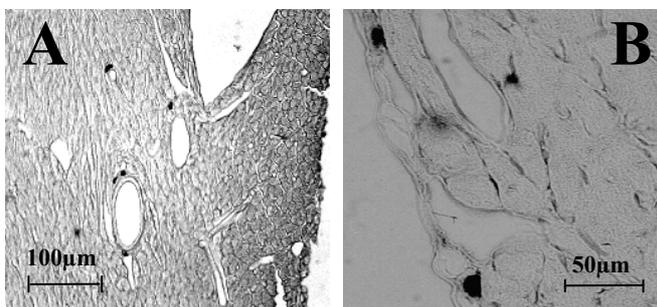
<sup>1</sup> Das Transsudat ist die sich auf dem Epikard bildende Flüssigkeit und kann als eine Mischung aus interstitieller Flüssigkeit und kardialer Lymphe betrachtet werden. Der Transsudatfluß variierte sehr stark; je nach Präparation betrug er 20-300 $\mu$ l/min.



**Abbildung 8: TNF- $\alpha$  im Transsudat von ischämischen, reperfundierten Rattenherzen.**  
\*: signifikant gegenüber prä-ischämischen Werten. #: signifikant gegenüber Zeitkontrolle.

### III.2 Quellen für TNF- $\alpha$ und TACE im Herzen

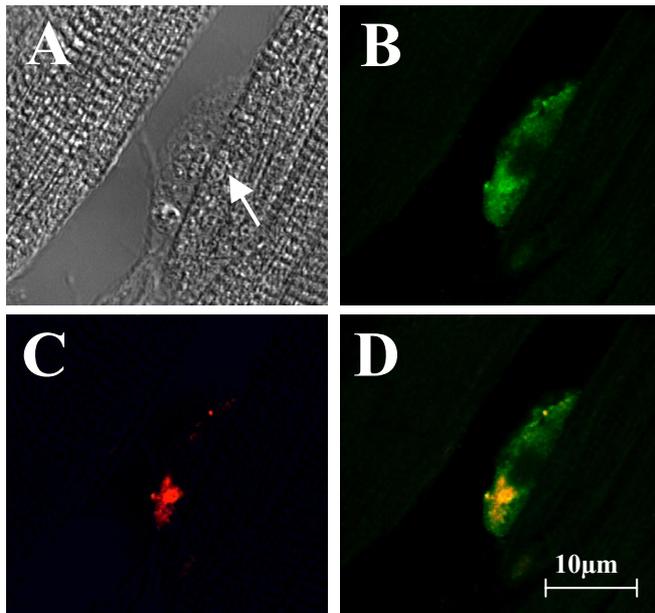
Um der Frage nach dem zellulären Ursprung von kardialem TNF- $\alpha$  in unserem Herzmodell nachzugehen, wurden Gewebeschnitte von isolierten Rattenherzen angefertigt und histochemisch/immunhistochemisch angefärbt. Die Lokalisation der TNF- $\alpha$ -"shedase" TACE im Myokard wurde ebenfalls ermittelt.



**Abbildung 9: Mastzellen und TNF- $\alpha$  im Rattenmyokard.** **A:** Alcianblau-Färbung eines Dünnschnitts durch den Ventrikel eines Rattenherzen zeigt die Verteilung von Mastzellen im Gewebe (Pfeile). Gefäßlumina sind durch Sterne gekennzeichnet. **B:** Anfärbung eines Gewebeschnitts mit einem Antikörper gegen TNF- $\alpha$ .

Alcianblau, ein Farbstoff, der z. B. an das Heparin in intrazellulären Granula bindet, wurde verwendet, um kardiale Mastzellen im Gewebe sichtbar zu machen (Abbildung 9A). Während ein Teil der Mastzellen interstitiell vorkam, fanden sich die meisten Mastzellen in unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen. Eine ähnliche Verteilung der Färbung wurde beobachtet, wenn die Gewebeschnitte mit einem Antikörper gegen TNF- $\alpha$  angefärbt wurden (Abbildung 9B). Diese deutliche TNF- $\alpha$ -Färbung ging durch globale Ischämie verloren (Ergebnis nicht gezeigt). Bemerkenswert ist, daß auch eine zweistündige Reperfusion nicht ausreichte, um wieder eine Färbungsverteilung zu sehen, wie sie für nicht-ischämische Herzen charakteristisch war (Ergebnis nicht gezeigt).

Um die Lokalisation von TNF- $\alpha$  und der TNF- $\alpha$ -Protease TACE im Myokard der Ratte genauer zu untersuchen, wurde Immunfluoreszenz-Mikroskopie an den Gewebeschnitten durchgeführt (Abbildung 10).



**Abbildung 10: TNF- $\alpha$  und TACE in einer kardialen Mastzelle.** **A:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von einer Gewebs-Mastzelle (Pfeil) in der Nachbarschaft eines Gefäßes. **B:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme derselben Mastzelle, die mit einem Antikörper gegen TACE angefärbt wurde. **C:** TNF- $\alpha$  in derselben Zelle. **D:** Kolokalisation von TNF- $\alpha$  und TACE in der Mastzelle.

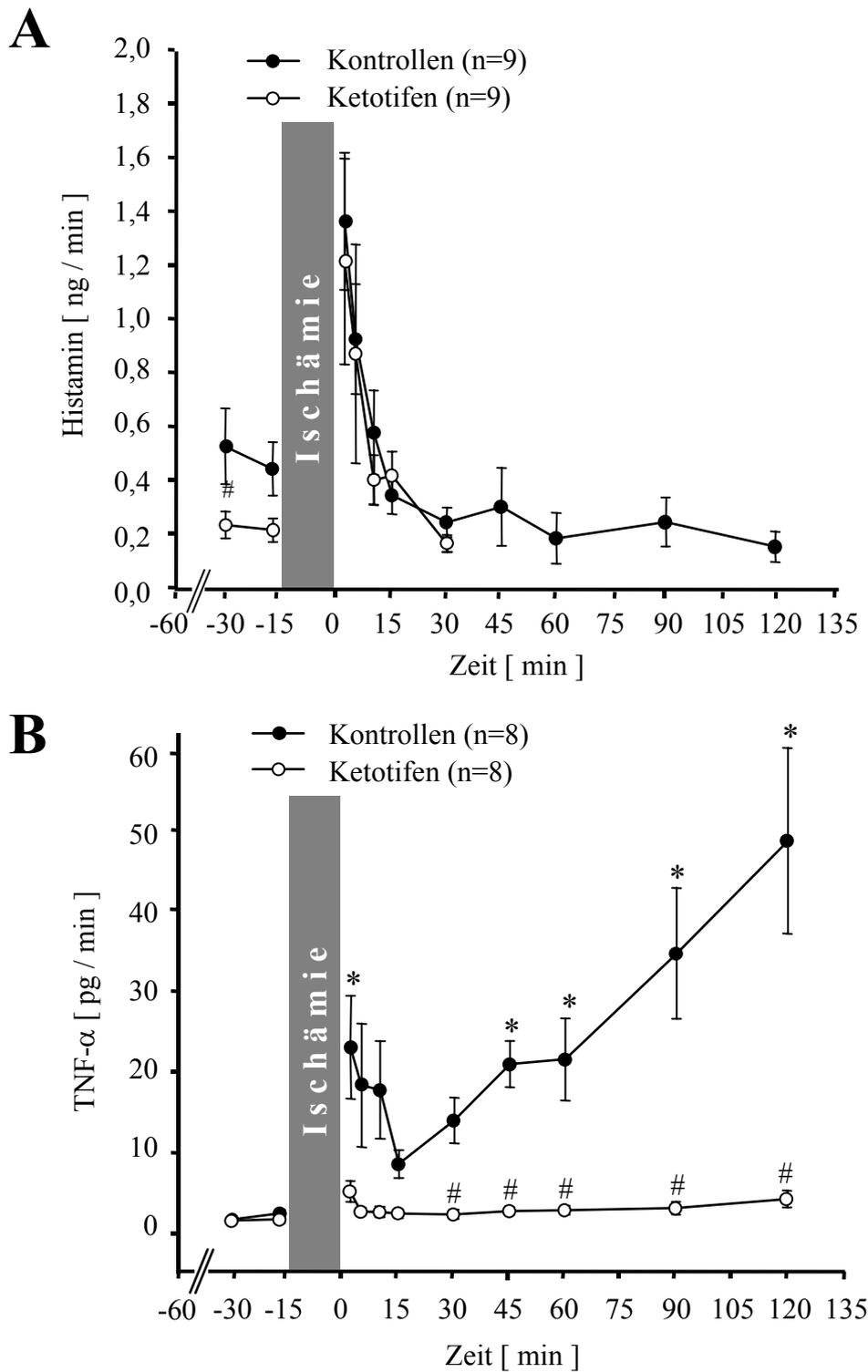
Auch hier fanden sich Mastzellen vornehmlich in der Nachbarschaft von Blutgefäßen im interstitiellen Raum (Abbildung 10A). Sie waren die einzigen Zellen im Rattenmyokard, die sich deutlich sowohl auf TNF- $\alpha$ , als auch auf TACE anfärben ließen. Während die TACE-Färbung über die gesamte Zelle verteilt war (Abbildung 10B), erschien sie am intensivsten in einem kernnahen Kompartiment, vermutlich dem trans-Golgi-Netzwerk. Auch fanden sich vereinzelt TACE-positive Granula unterhalb der Plasmamembran. Die TNF- $\alpha$ -Färbung war auf das kernnahe Kompartiment und auf die peripheren Granula beschränkt (Abbildung 10C). Legt man die Abbildungen 10B und C übereinander, ergibt sich eine eindeutige Kolokalisation von TACE und TNF- $\alpha$  in der Nähe des Zellkerns sowie in peripheren Granula der Mastzelle (Abbildung 10D).

### **III.3 Rolle der Mastzelldegranulation für die postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Rattenherzen**

Um zu untersuchen, ob der von ischämischen, reperfundierten Rattenherzen freigesetzte TNF- $\alpha$  aus Mastzell-Granula stammt, wurde die Freisetzungskinetik von TNF- $\alpha$  mit der von Histamin, einem anderen granulär gespeicherten Mastzell-Mediator, verglichen. Behandlung ischämischer, reperfundierter Rattenherzen mit einem Mastzell-Degranulationshemmer sollte darüber Aufschluß geben. Folglich wurde eine Gruppe von Herzen in Anwesenheit des Degranulationshemmers Ketotifen (100nM) äquilibriert, dann einer globalen Ischämie unterzogen und anschließend in Anwesenheit von Ketotifen reperfundiert. Die Kontrollgruppe wurde in Abwesenheit von Ketotifen einer ansonsten identischen Behandlung unterzogen.

Der Nachweis von Histamin blieb, ähnlich wie TNF- $\alpha$ , auf das Transsudat beschränkt, während sich im Koronareffluat kein Histamin messen ließ (Ergebnis nicht gezeigt). Obgleich einzelne Kontrollherzen bereits vor der Ischämie geringe Mengen an Histamin freisetzten, wurden die höchsten Werte durchwegs unmittelbar nach der Ischämie gemessen (Abbildung 11A). Es folgte eine rasche Auswaschung des Histamins. Transsudate von Herzen, die mit Ketotifen behandelt wurden, enthielten geringere Mengen an Histamin als Transsudate unbehandelter Herzen. Dagegen wurde weder die Menge an postischämisch freigesetztem Histamin, noch die Freisetzungskinetik für Histamin durch 100nM Ketotifen beeinflusst (Abbildung 11A).

Parallel zur Histaminfreisetzung wurde auch die TNF- $\alpha$ -Produktion von Herzen aus den oben beschriebenen Versuchsgruppen ermittelt. Hierbei stellte sich heraus, daß die TNF- $\alpha$ -Freisetzung ins Transsudat bei Ketotifen-behandelten Herzen gegenüber der von ischämischen Kontrollherzen signifikant verringert war (Abbildung 11B). Betroffen waren sowohl die frühe (2-10min), als auch die späte (>45min) postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung.



**Abbildung 11: Histamin und TNF- $\alpha$  im Transsudat von ischämischen, reperfundierten Rattenherzen mit und ohne Ketotifen-Behandlung. \*: Signifikant gegenüber prä-ischämischen Werten. #: Signifikant gegenüber Kontrolle ohne Ketotifen.**

### **III.4 TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Rattenherzen ist abhängig vom Redoxstatus**

Die folgenden Experimente an isolierten, perfundierten Rattenherzen wurden durchgeführt, um die Rolle von oxidativem Stress, wie er während der Reperfusion in ischämischem Gewebe entsteht, für die postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus dem Herzen zu untersuchen.

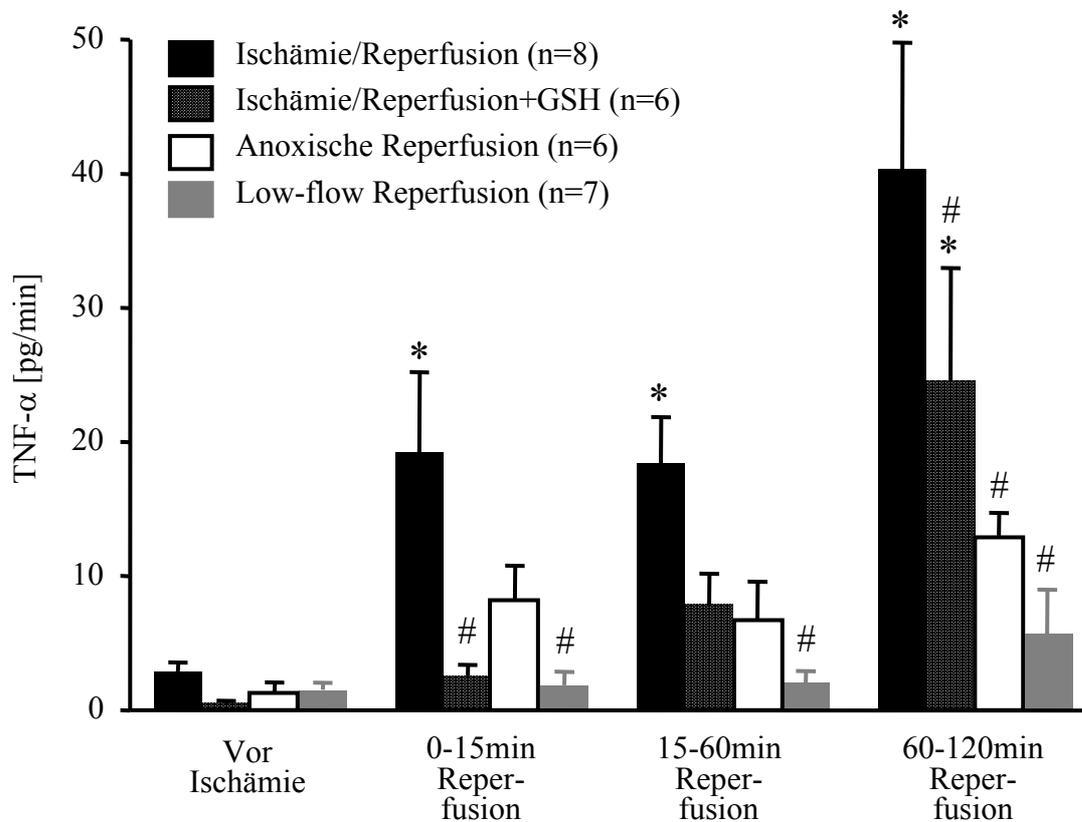
#### **III.4.1 Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung während der Reperfusion ist abhängig von molekularem Sauerstoff und vom extrazellulären Redoxstatus**

Eine Gruppe von Herzen wurde in Anwesenheit des extrazellulären Antioxidanz GSH (100 $\mu$ M) äquilibriert, anschließend einer globalen Ischämie unterzogen und schließlich wieder in Anwesenheit von 100 $\mu$ M GSH reperfundiert. In dieser Versuchsgruppe waren sowohl die frühe, als auch die späte Freisetzung von TNF- $\alpha$  gegenüber der von ischämischen Kontrollherzen reduziert (Abbildung 12). Die späte (60-120min) Freisetzung war jedoch noch immer signifikant höher als die mittlere prä-ischämische Freisetzung in derselben Gruppe.

Zwei weitere Gruppen ischämischer Herzen wurden modifizierten Reperfusionprotokollen unterzogen: die eine Gruppe wurde mit KHB reperfundiert, der mit 94,4% N<sub>2</sub> (anstelle von 94,4% O<sub>2</sub>) begast war ("anoxische Reperfusion"); die andere Gruppe wurde mit sauerstoffbegastem Puffer reperfundiert, allerdings bei konstanter, verminderter Flußrate ("low-flow Reperfusion"; Flußrate: 1ml/min)<sup>2</sup>. Sowohl die anoxischen, als auch die "low-flow"-Herzen setzten postischämisch deutlich weniger TNF- $\alpha$  frei, als ischämische Kontrollherzen (Abbildung 12).

---

<sup>2</sup> Bei der druckkonstanten Reperfusion betrug der Koronarfluß im Mittel 4-6ml/min, die reaktive Hyperämie nach der Ischämie im Mittel 12-15ml/min.

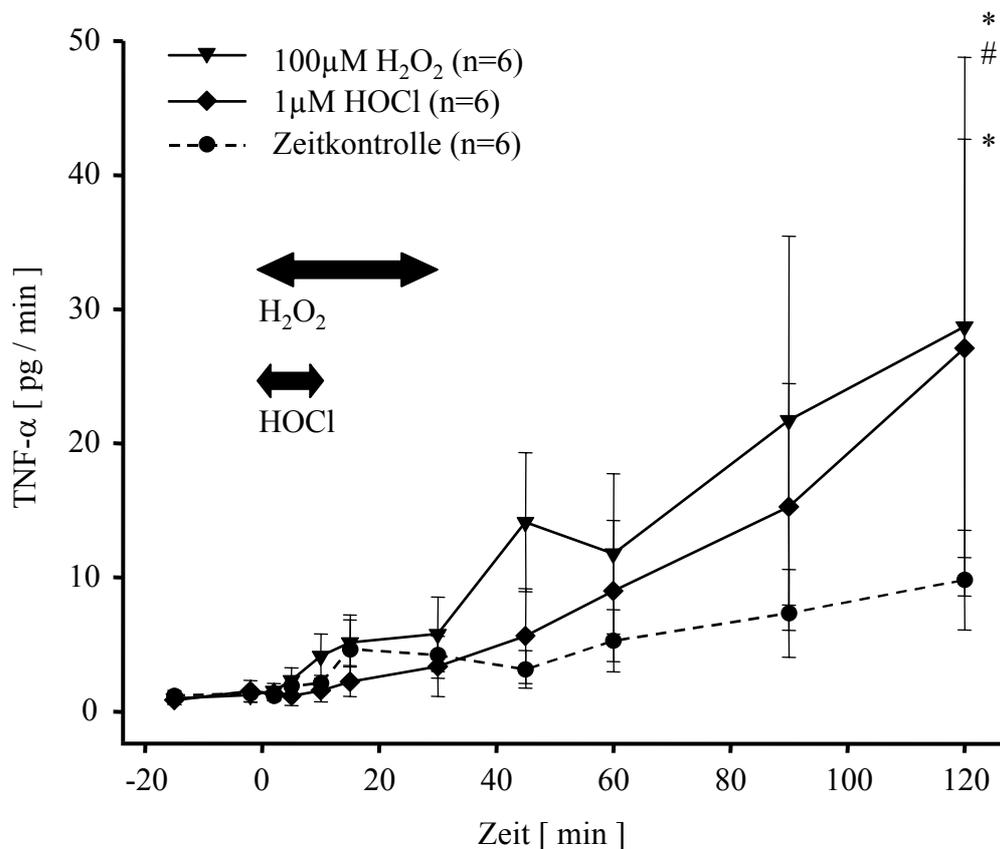


**Abbildung 12: TNF- $\alpha$  im Transsudat ischämischer Herzen, die unter verschiedenen Bedingungen reperfundiert wurden.** \*: signifikant gegenüber prä-ischämischem Wert. #: signifikant gegenüber Herzen aus der Kontrollgruppe (Ischämie/ Reperfusion).

### III.4.2 Bei nichtischämischen Herzen wird durch Behandlung mit Oxidanzien eine TNF- $\alpha$ -Freisetzung ausgelöst

Zwei weitere Gruppen von Herzen wurden keiner globalen Ischämie unterzogen, sondern erhielten stattdessen nach einer Äquilibrationsphase jeweils Infusionen mit unterschiedlichen Oxidanzien (30min 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. 10min 1 $\mu$ M HOCl).

Herzen beider Gruppen zeigten eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Produktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollherzen (Abbildung 13). Die TNF- $\alpha$ -Werte im Transsudat von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Herzen waren bereits kurz nach Beginn der Infusion signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu stieg die TNF- $\alpha$ -Freisetzung der HOCl-behandelten Herzen erst 90min nach Beginn der Infusion signifikant an. Bemerkenswert ist, daß die TNF- $\alpha$ -Produktion in beiden Versuchsgruppen weiter anstieg, selbst nachdem die Infusion bereits eingestellt war.



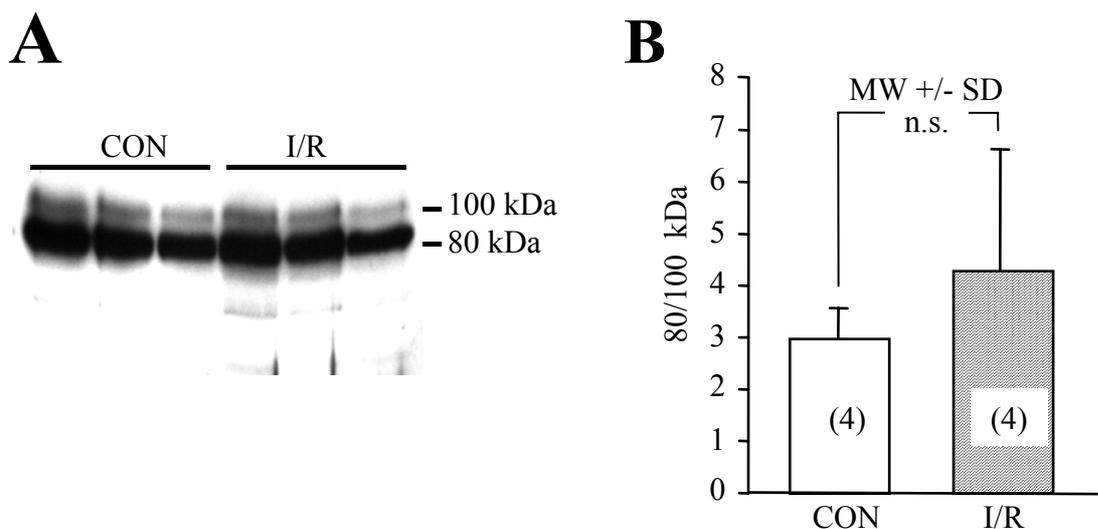
**Abbildung 13: TNF- $\alpha$  im Transsudat nicht-ischämischer Rattenherzen, die mit Oxidanzien behandelt wurden.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Infusion: 30min, HOCl-Infusion: 10min. \*: signifikant gegenüber Wert vor der Intervention. #: signifikant gegenüber Zeitkontrolle.

### III.5 Rolle von TACE für die postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus dem Herzen

Die im folgenden beschriebenen Experimente am isolierten Rattenherzen wurden durchgeführt, um Hinweise dafür zu sammeln, welche Rolle eine akute/chronische Aktivierung von TACE und/oder anderer möglicher TNF- $\alpha$ -Sheddasen bei der postischämischen Freisetzung des Cytokins aus dem Herzen spielt.

### III.5.1 Ischämie/Reperfusion führt weder zu einer Induktion, noch zur vermehrten proteolytischen Aktivierung von myokardialem TACE

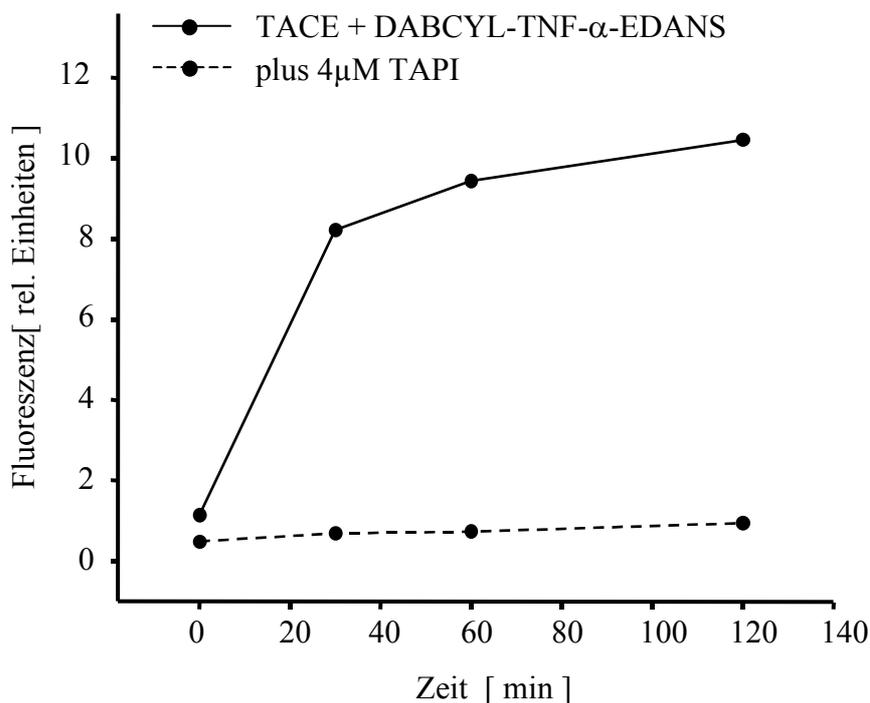
Gewebe von isolierten Rattenherzen, welche entweder 180min ohne Behandlung perfundiert ("CON"), oder nach 45min Einschlagzeit einer 15-minütigen globalen Ischämie unterzogen und 120min aerob reperfundiert worden waren ("I/R"), wurden homogenisiert und die Homogenate auf die Menge an TACE-Protein hin analysiert. Im Western Blot zeigten sich zwei Banden, welche mit einem gegen den TACE-C-Terminus gerichteten Antikörper reagierten: Eine ca. 100kDa und eine ca. 80kDa Bande (Abbildung 14A). Kalkulationen der Molekularmasse nach ist anzunehmen, daß es sich um die beiden Formen von TACE, das Proenzym (100kDa) und die prozessierte Form (80kDa), handelt. Die 80kDa Spezies ("reifes" TACE ohne Prodomäne) war im Herzgewebe deutlich stärker repräsentiert als die höhermolekulare Form. Weder die Gesamtmenge an TACE-Protein, noch das Verhältnis der beiden TACE-Spezies zueinander (80kDa/100kDa Bande) veränderte sich durch Ischämie und Reperfusion in signifikanter Weise (Abbildung 14B).



**Abbildung 14: TACE im Rattenmyokard.** **A:** Western-Analyse von Homogenaten aus Rattenherzen, die entweder kontrollperfundiert (CON), oder nach der globalen Ischämie einer 2-stündigen Reperfusion (I/R) unterzogen worden waren. 100kDa: Pro-TACE, 80kDa: prozessiertes TACE ohne Prodomäne. Aufgetragene Proteinmengen: 50µg (Spuren 1 und 4), 33µg (Spuren 2 und 5) oder 25µg (Spuren 3 und 6). Antikörper: C-15 (C-terminal, Chemicon). **B:** Vergleich des Verhältnisses der beiden TACE-Spezies zueinander in kontrollperfundiertem (CON) und ischämischem, reperfundiertem (I/R) Herzgewebe.

### III.5.2 Ischämie/Reperfusion bewirkt keine signifikante Zunahme der TACE-spezifischen proteolytischen Aktivität in Herzgewebe

Ein synthetisches TACE-Substrat, das fluorogene TNF- $\alpha$ -Peptid DABCYL-TNF- $\alpha$ -EDANS, sollte dazu verwendet werden, die TACE-Aktivität in Herzgewebe vor und nach der Ischämie zu bestimmen.



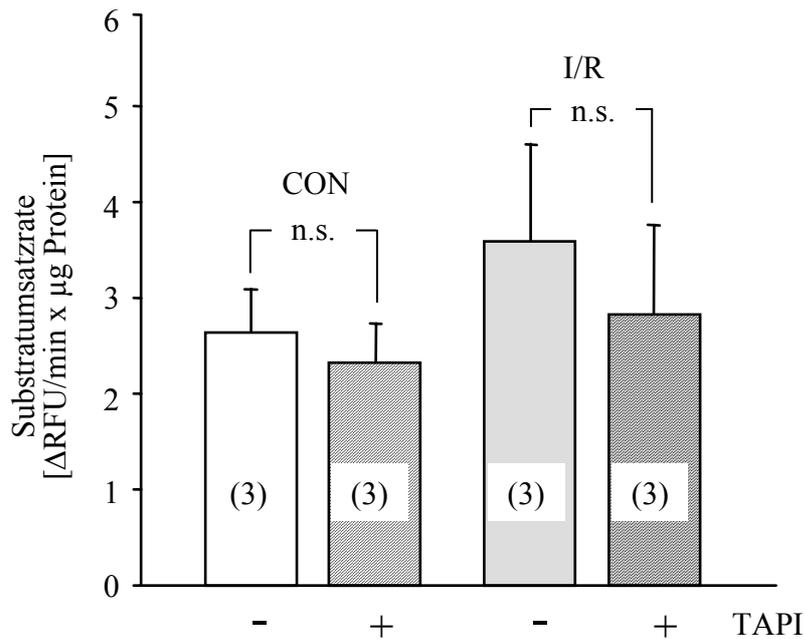
**Abbildung 15: Spaltung eines fluorogenen Substrats durch die katalytische Domäne von human rekombinatem TACE.**

Zunächst wurde die Funktionalität des Peptids anhand seiner Spaltung durch humanes, rekombinantes TACE (katalytische Domäne) getestet (Abbildung 15).

Wie sich durch die zunehmende Fluoreszenzintensität der Probe zeigte, wurde das Peptid von TACE innerhalb von 120min komplett umgesetzt. Zugabe von 4 $\mu$ M TAPI, einem TACE-Inhibitor, reichte aus, um die Enzymaktivität komplett zu unterdrücken.

Als nächstes wurden Homogenate von Rattenherzen, die entweder 80min unbehindert perfundiert ("CON"), oder nach 15min globaler Ischämie 65min reperfundiert worden waren ("I/R"), mit dem fluorogenen Peptid inkubiert. Ein Teil der Proben wurde jeweils mit dem TACE-Inhibitor TAPI (50 $\mu$ M) behandelt. Die Zunahme der Fluoreszenz der Proben wurde, im Abstand von jeweils 5min, über einen Zeitraum von insgesamt 45min verfolgt. Für jede

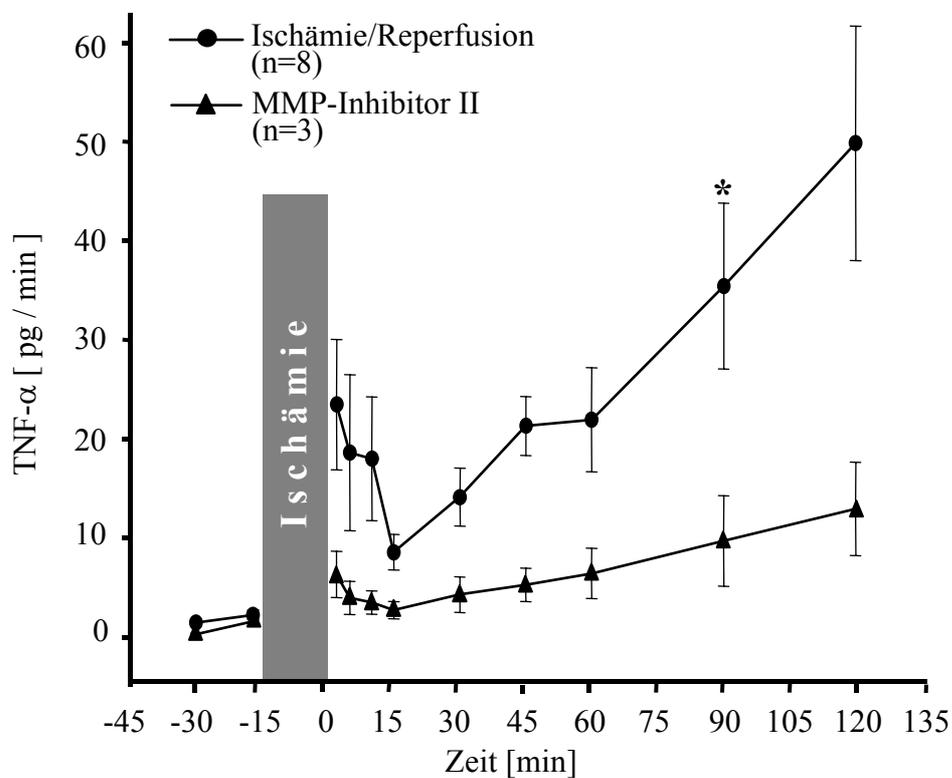
Probe wurde sodann der mittlere Anstieg der Fluoreszenz pro Zeiteinheit ermittelt (= mittlere Substratumsatzgeschwindigkeit) und diese auf die eingesetzte Menge Gesamtprotein bezogen. Ischämie und Reperfusion führten dabei zu keiner signifikanten Zunahme des Substratumsatzes (Abbildung 16). Behandlung mit TAPI führte in beiden Versuchsgruppen nur zu schwacher Hemmung des Substratumsatzes, die in keinem Fall statistisch signifikant war.



**Abbildung 16: TACE-Aktivität in Herzgewebe.** Dargestellt ist die Aktivität in Homogenaten aus Rattenherzen, die entweder kontrollperfundiert (CON) oder nach globaler Ischämie 1h reperfundiert (I/R) worden waren. RFU = relative Fluoreszenz-Einheiten (units)

### III.5.3 Ein MMP-Inhibitor hemmt die Freisetzung von TNF- $\alpha$ aus Rattenherzen

Um die Beteiligung anderer möglicher TNF- $\alpha$ -Sheddases (z. B. MMPs) an der TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus dem Herzen zu untersuchen, wurden isolierte, perfundierte Rattenherzen einer Ischämie unterzogen und während der Reperfusion mit 1  $\mu$ M MMP-Inhibitor II (Calbiochem)<sup>3</sup> behandelt. Gemessen wurde die Abgabe von TNF- $\alpha$  ins Transsudat vor und nach der Ischämie. Als Kontrolle dienten Transsudate von ischämischen, reperfundierten Herzen, die keine Inhibitor-Infusion erhielten. Wie Abbildung 17 zeigt, ist die TNF- $\alpha$ -Produktion von Herzen, die mit MMP-Inhibitor II behandelt wurden, gegenüber der ischämischer Kontrollherzen signifikant verringert.



**Abbildung 17: TNF- $\alpha$  in Transsudaten ischämischer, reperfundierter Rattenherzen, die mit 1  $\mu$ M MMP-Inhibitor II behandelt wurden.** \*: signifikant gegenüber Herzen der Kontrollgruppe (Ischämie/Reperfusion).

<sup>3</sup> Der MMP-Inhibitor II hemmt laut Hersteller MMP-1 ( $IC_{50} = 24$ nM), MMP-3 ( $IC_{50} = 18,4$ nM), MMP-7 ( $IC_{50} = 30$ nM) und MMP-9 ( $IC_{50} = 2,7$  nM).

### III.6 Oxidative Aktivierung von TACE im Zellmodell

Die folgenden Versuche wurden an unterschiedlichen zellulären Modellen durchgeführt, um Aufschluß darüber zu erhalten, ob die TNF- $\alpha$ -Sheddase TACE sich oxidativ, insbesondere durch Denaturierung des redox-sensitiven "cysteine-switch", aktivieren läßt.

#### III.6.1 Spaltung von TNF- $\alpha$ -Peptid durch intakte PBL und PBL-Membranfraktionen

Leukozyten aus humanem, peripherem Blut (PBL) wurden mit dem fluorogenen TACE-Substrat DABCYL-TNF- $\alpha$ -EDANS ohne bzw. in Gegenwart von TAPI (10 $\mu$ M) inkubiert. Ein Teil der Zellen war vor Beginn der Peptidinkubation mit HOCl (50 $\mu$ M) vorbehandelt worden; als Kontrollen dienten Zellen, die ohne HOCl vorinkubiert worden waren. Das TNF- $\alpha$ -Peptid wurde durch die PBL gespalten; die proteolytische Aktivität jedoch ließ sich nicht durch 10 $\mu$ M TAPI hemmen (Abbildung 18). Die Vorbehandlung der Zellen mit HOCl führte weder zu einem vermehrten, noch zu einem beschleunigten Umsatz des Peptids (Abbildung 18).

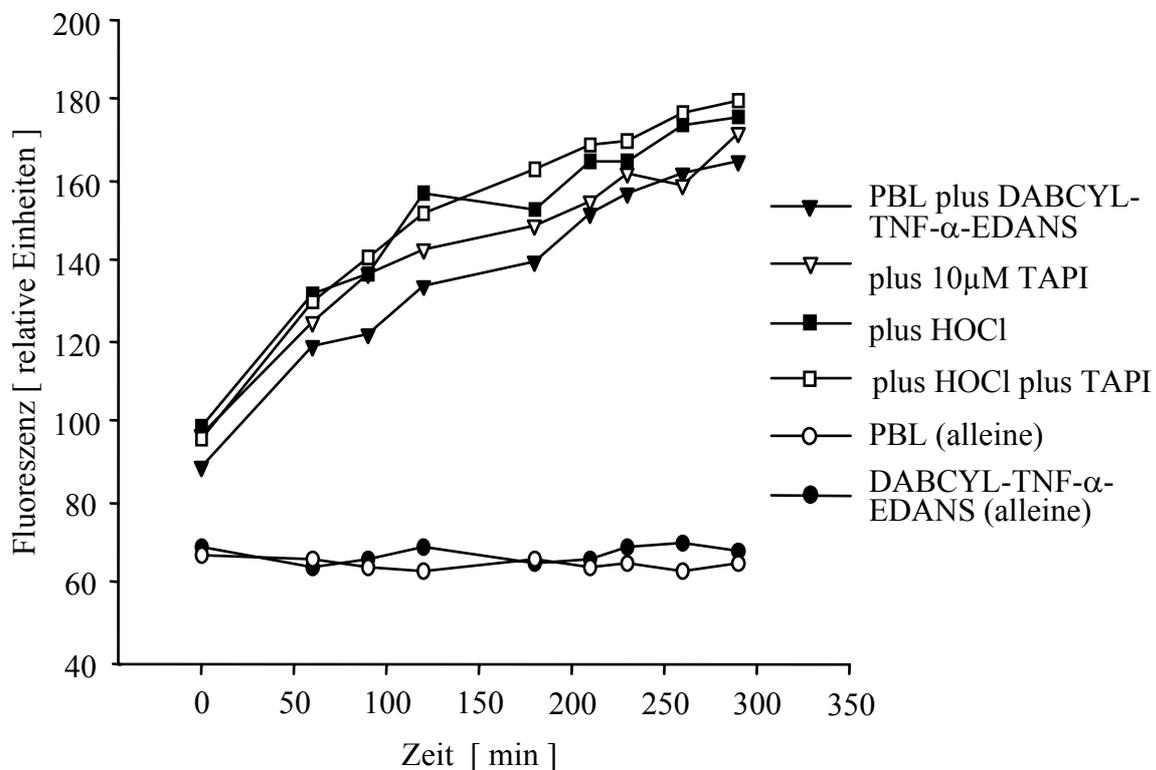
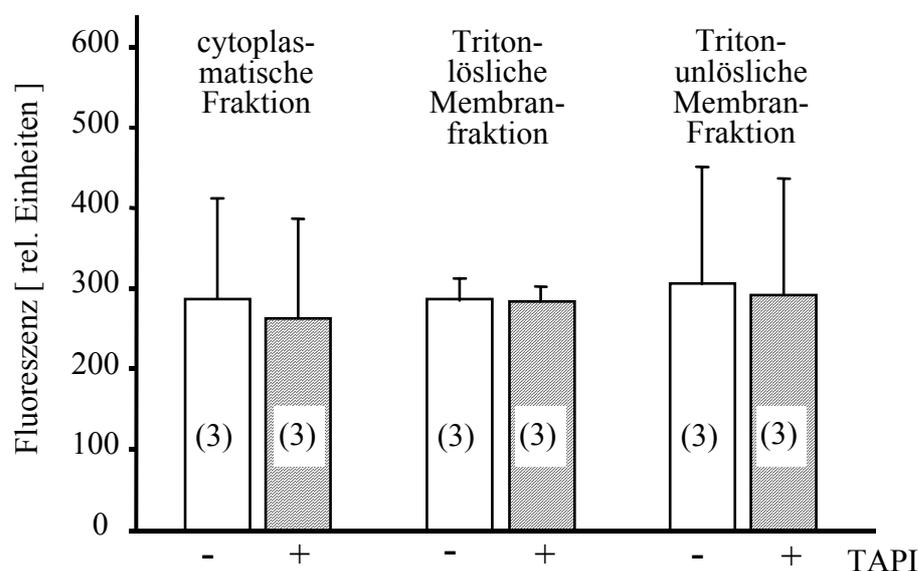


Abbildung 18: Spaltung des fluorogenen TNF- $\alpha$ -Peptids durch intakte Leukozyten aus humanem peripherem Blut (PBL).

Da der weitaus größte Teil der eingesetzten PBL bei Inkubation mit dem Peptid tatsächlich noch intakt war (Ergebnisse nicht gezeigt), schließt dieser Befund nicht aus, daß eine TAPI-hemmende Aktivität im Inneren der Zellen vorhanden war. Um zu untersuchen, ob sich eine solche Aktivität in einem intrazellulären Membrankompartiment nachweisen läßt, wurden PBL lysiert und die Lysate in drei verschiedene Fraktionen aufgeteilt (cytoplasmatische, Triton-lösliche und Triton-unlösliche Membranfraktion). Jede der drei Fraktionen wurde, mit oder ohne Zusatz von TAPI (50µM), mit dem TNF- $\alpha$ -Peptid inkubiert (Abbildung 19). Obwohl in allen drei Fraktionen ein Umsatz des Substrats erfolgte, ließ sich dieser in keinem Fall durch TAPI hemmen.



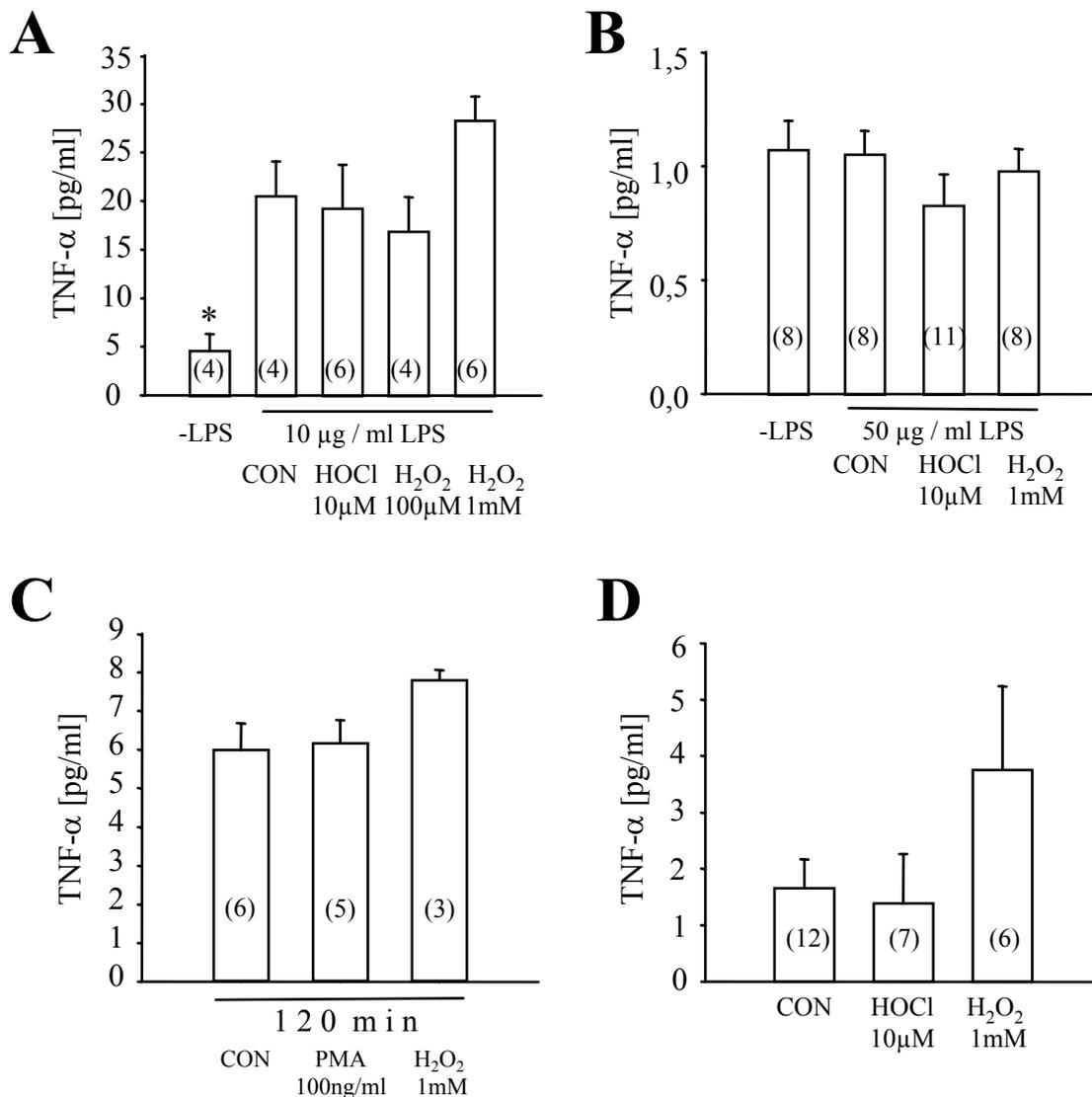
**Abbildung 19: TACE-Aktivität in Membranfraktionen von PBL.** Untersucht wurde die Spaltung des fluorogenen Substrats DABCYL-TNF- $\alpha$ -EDANS in fraktionierten Zellsaten.

### III.6.2 Akute Abgabe von TNF- $\alpha$ in den Überstand oxidativ stimulierter Zellen

Das akute Shedding von TNF- $\alpha$  in Antwort auf oxidative Stimuli sollte anhand eines geeigneten Zellmodells untersucht werden. Getestet wurden verschiedene Zelllinien, die mit den unterschiedlichen Blutzellen verwandt sind (Jurkat T-Zellen: abstammend von Lymphozyten, Mono Mac 6: abstammend von Monozyten, HMC-1: abstammend von Mastzellen), sowie frisch isolierte Leukozyten aus humanem, peripherem Blut (PBL).

Im Überstand von unstimulierten Mono Mac 6, die für 30min in Puffer inkubiert worden waren, wurden niedrige (ca. 5pg/ml) TNF- $\alpha$ -Spiegel gemessen (Abbildung 20A). Dagegen enthielt der Überstand von Mono Mac 6, die zunächst über Nacht mit LPS (10µg/ml) vorstimuliert, dann gewaschen und anschließend 30min in Puffer inkubiert worden waren,

bedeutend größere Mengen an TNF- $\alpha$  (20pg/ml). Die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Medium von über Nacht mit LPS stimulierten Mono Mac 6 war dabei noch wesentlich höher (Ergebnis nicht gezeigt). Eine 30-minütige Behandlung LPS-vorstimulierter Zellen mit HOCl (10 $\mu$ M) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 $\mu$ M) führte nicht zu einem weiteren Anstieg der TNF- $\alpha$ -Sekretion, während 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer etwa 30% höheren Freisetzung führte (Abbildung 20A). Eine Färbung der Zellen mit Trypanblau im Anschluß an das Experiment zeigte jedoch, daß die Inkubation mit 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Puffer zur Lyse von etwa 90% der Zellen geführt hatte (Ergebnis nicht gezeigt).



**Abbildung 20: TNF- $\alpha$  im Überstand verschiedener oxidativ stimulierter Zellen.** **A:** Überstände von Mono Mac 6. Alle Inkubationen wurden für 30min in PBS durchgeführt. **B:** Überstände von Jurkat Zellen. Die Inkubation erfolgte für 30min in PBS. **C:** Überstände von HMC-1. Inkubation in Tyrode-Lösung. **D:** Überstände von PBL. Inkubation 30min in PBS. CON = unstimulierte Zellen. \*: signifikant gegenüber Überständen von LPS-unbehandelten Zellen. PMA = Phorbol Myristat Acetat

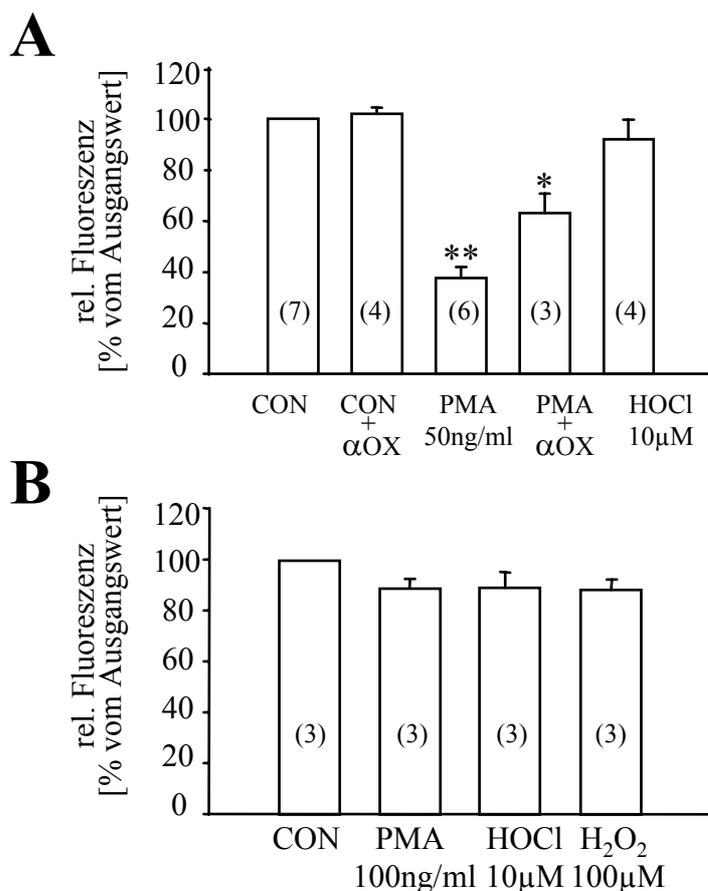
Jurkat T-Zellen gaben ebenfalls sehr wenig TNF- $\alpha$  ab (1pg/ml). Weder Inkubation mit LPS, noch eine zusätzliche Stimulation mit Oxidanzien bewirkten eine erhöhte Sekretion (Abbildung 20B).

Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung unstimulierter HMC-1 war ebenfalls gering (6pg/ml). Stimulation mit LPS bewirkte keine Steigerung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung (Ergebnis nicht gezeigt), und auch PMA (100ng/ml) hatte keinen Effekt (Abbildung 20C), ebenso wenig wie eine kombinierte Stimulation mit LPS und PMA (Ergebnis nicht gezeigt). Eine 2-stündige Behandlung von HMC-1 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) in Medium führte zu geringfügig erhöhter TNF- $\alpha$ -Sekretion; der Unterschied zu unbehandelten Zellen ist jedoch nicht signifikant (Abbildung 20C).

Die basale TNF- $\alpha$ -Produktion von PBL variierte sehr stark von Spender zu Spender (Ergebnis nicht gezeigt). Im Mittel setzten unstimulierte PBL während einer 30-minütigen Inkubation in Puffer nur 2pg/ml TNF- $\alpha$  frei, und Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) führte zu einer Verdoppelung der Sekretion (Abbildung 20D). Allerdings betrug die Zytolyse von PBL in Puffer mit 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 90%.

### **III.6.3 Akute Freisetzung von TNF- $\alpha$ von der Oberfläche oxidativ stimulierter Zellen**

Eine weitere Möglichkeit, das "shedding" von TNF- $\alpha$  in Antwort auf oxidative Stimuli zu quantifizieren, besteht darin, die Fluoreszenzintensität von Antikörper-markiertem, an der Zelloberfläche befindlichem TNF- $\alpha$  im Zeitverlauf zu verfolgen (Abbildung 21). Nach 30-minütiger Stimulation mit PMA (50ng/ml) hatten PBL, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen, etwa 60% ihres oberflächengebundenen TNF- $\alpha$  abgeworfen. Dieser Effekt konnte teilweise durch Zugabe von Antioxidanzien verhindert werden (Abbildung 21A). HOCl (10 $\mu$ M) hatte dagegen keinen Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Expression an der Plasmamembran von PBL.



**Abbildung 21: Freisetzung von TNF- $\alpha$  von der Plasmamembran oxidativ stimulierter Zellen.**

**A:** TNF- $\alpha$  auf der Oberfläche von PBL. **B:** TNF- $\alpha$  auf der Plasmamembran von HMC-1. CON = unbehandelte Zellen;  $\alpha$ -OX = Cocktail aus verschiedenen Antioxidanzien (100 $\mu$ M reduziertes Glutathion, 100 $\mu$ M Ascorbinsäure, 200U/ml Superoxid-Dismutase und 100 $\mu$ M Oxypurinol). \*\*: signifikant gegenüber CON; \*: signifikant gegenüber PMA-behandelten Zellen. PMA = Phorbol Myristat Acetat

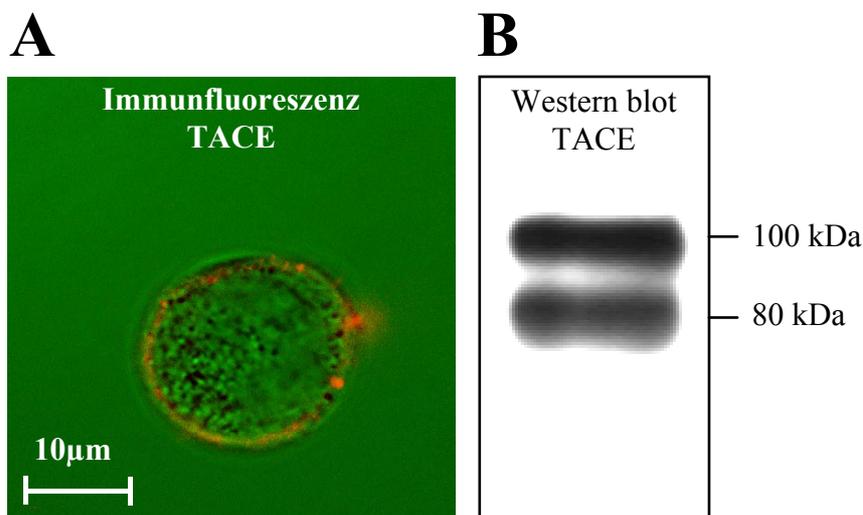
Im Vergleich zu PBL exprimierten HMC-1 noch wesentlich geringere Mengen an TNF- $\alpha$  auf der Zelloberfläche (Ergebnis nicht gezeigt). Die TNF- $\alpha$ -Expression von HMC-1, die mit PMA (100ng/ml), HOCl (10 $\mu$ M) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 $\mu$ M) stimuliert wurden, blieb im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Zeitkontrollen) unverändert (Abbildung 21B).

### III.7 HMC-1 als Modell für Mastzellen

Die folgenden Abschnitte zeigen Experimente, deren Ziel es war, ein Modell für kardiale Mastzellen zu testen; dieses Mastzell-Modell sollte geeignet sein, eine mögliche akute Aktivierung von TACE durch Redoxstress zu studieren.

#### III.7.1 HMC-1 exprimieren TACE, jedoch kaum TNF- $\alpha$

Permeabilisierte und nicht-permeabilisierte HMC-1, die mit einem Antikörper gegen humanen TNF- $\alpha$  angefärbt worden waren, wurden immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Wie bereits die Versuche zum "shedding" von TNF- $\alpha$  vermuten ließen, enthalten HMC-1 kaum TNF- $\alpha$ ; in jedem Präparat ließen sich nur vereinzelt Zellen finden, die ein einziges TNF- $\alpha$ -positives Granulum aufwiesen (Ergebnis nicht gezeigt). Dagegen lieferte die Markierung von HMC-1 mit unterschiedlichen Antikörpern gegen TACE den Befund, daß das Enzym in diesen Zellen nicht nur exprimiert wird, sondern sich überraschenderweise so gut wie ausschließlich an der Plasmamembran findet (Abbildung 22A).



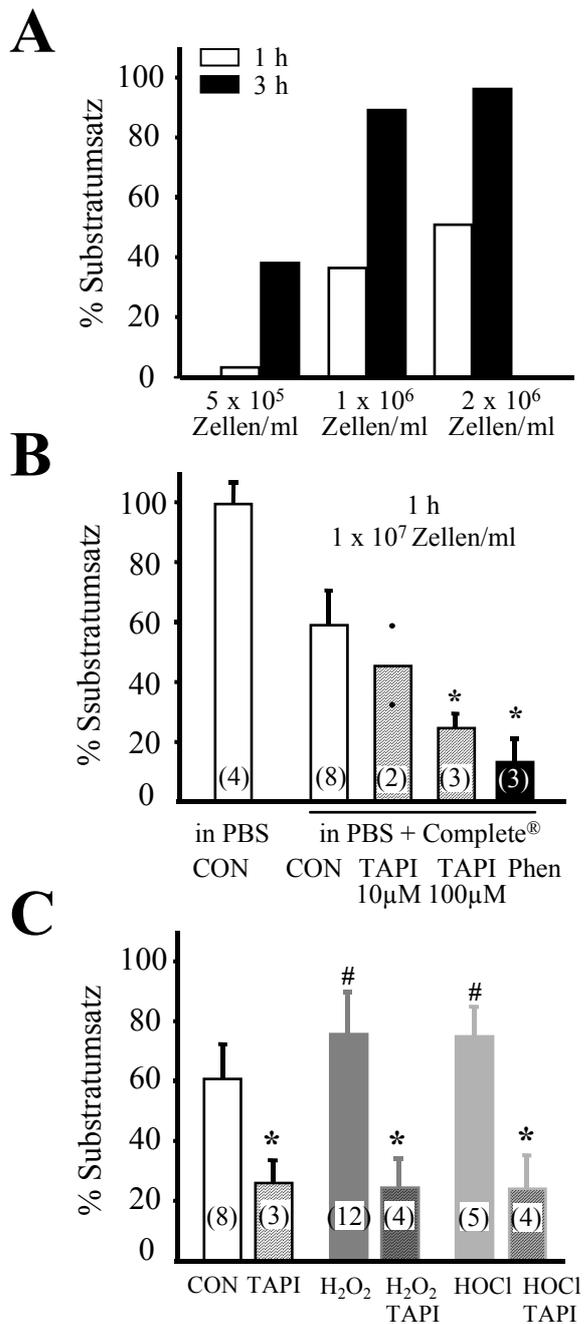
**Abbildung 22: TACE in der humanen Mastzelllinie HMC-1.** **A:** Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme einer Triton-permeabilisierten Zelle, die mit einem Antikörper gegen den (intrazellulären) C-Terminus von TACE (C-15, Chemicon) angefärbt ist. **B:** Exemplarischer Western blot von HMC-1 Lysat. Immunodetektion von TACE im Zellysate erfolgte mittels des C-terminalen Anti-TACE Antikörpers C-15 (Chemicon).

Das auf der Zelloberfläche von HMC-1 exprimierte TACE reagierte auch mit einem Antikörper, der gegen die Prodomäne des Enzyms gerichtet ist und daher nur inaktives, proteolytisch noch nicht prozessiertes TACE erkennt.

In Übereinstimmung mit den fluoreszenzmikroskopischen Daten waren die Ergebnisse der Western Analyse von HMC-1-Lysaten (Abbildung 22B). Im Immunoblot zeigten sich zwei Banden, welche mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von TACE reagierten: eine ca. 100kDa Bande (Pro-TACE) und eine ca. 80kDa Bande (prozessiertes TACE). Im Gegensatz zur Situation in Herzgewebe war in HMC-1-Lysaten die höhermolekulare Form von TACE stärker exprimiert als die prozessierte Form (Verhältnis ca. 1 : 0,6).

### **III.7.2 Die Spaltung eines TNF- $\alpha$ -Peptids durch HMC-1 ist oxidativ stimulierbar**

Da HMC-1 membranständiges TACE, aber kaum TNF- $\alpha$  exprimieren, sollte die spezifische Spaltung eines synthetischen TACE-Substrats (Ac-SPLAQAVRSSSR-NH<sub>2</sub> = "TNF- $\alpha$ -Peptid") Aufschluß darüber geben, ob eine oxidative Aktivierung von Pro-TACE an der Oberfläche von HMC-1 möglich ist. Vorversuche mit dem TNF- $\alpha$ -Peptid und humanem rekombinantem TACE (katalytische Domäne) waren bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden. Der Abbau des Substrats sowie die gleichzeitige Bildung eines der beiden TACE-spezifischen Abbauprodukte (Ac-SPLAQA) ließ sich mittels HPLC verfolgen.



**Abbildung 23: Spaltung eines TNF- $\alpha$ -Peptids durch intakte HMC-1.** **A:** Substratumsatz in Abhängigkeit von Zellzahl und Inkubationszeit in PBS. **B:** Substratumsatz in Gegenwart verschiedener Proteaseninhibitoren. CON = unbehandelte Zellen. Complete<sup>®</sup> = kommerziell erhältlicher Proteaseninhibitor-Cocktail (Roche). Phen = 1mM o-Phenanthrolin. \*: signifikant gegenüber CON. **C:** Stimulation der Zellen mit Oxidanzien. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 300-500 $\mu$ M; HOCl: 50 $\mu$ M; TAPI-2: 100 $\mu$ M. #: signifikant gegenüber CON. \*: signifikant gegenüber entsprechende Probe ohne TAPI

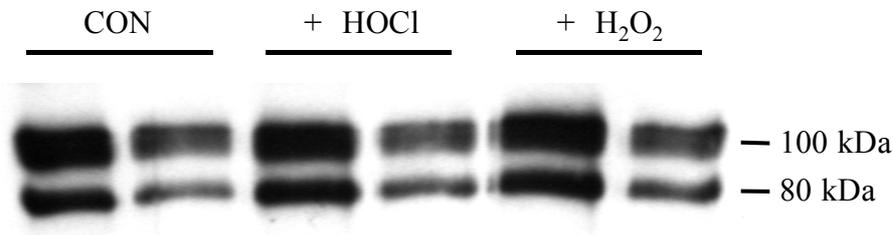
Obgleich das 12-mer von den HMC-1 sehr effizient gespalten wurde, konnte das TACE-spezifische Spaltprodukt Ac-SPLAQA weder in Überständen, noch in Zell-Lysaten jemals nachgewiesen werden. Dies lag nicht an einer selektiven Degradation von Ac-SPLAQA durch die Zellen, da das 6-mer, inkubiert mit HMC-1, bis zu 3h im Überstand stabil blieb (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Substratumsatz, gemessen als Abbau des 12-mers, durch intakte HMC-1 in Puffer war abhängig von Zellzahl und Inkubationsdauer (Abbildung 23A). Ein nahezu kompletter Umsatz des Substrats ließ sich, bei einer Zellzahl von  $10^7$ /ml, nach einer Stunde beobachten. Die Peptid-spaltende Aktivität war dabei nicht auf die Zellmembranen beschränkt, sondern ließ sich auch im konditionierten Überstand von HMC-1 nachweisen (Daten nicht gezeigt). Einstündige Inkubation des TNF- $\alpha$ -peptids mit  $10^7$  HMC-1/ml in Puffer mit Complete<sup>®</sup> Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche) führte zu einer etwa 40%igen Verringerung des unspezifischen Abbaus (Abbildung 23B). Eine weitere Reduktion wurde durch Zugabe des TACE-Inhibitors TAPI-2 erzielt, wobei  $10\mu\text{M}$  weniger effektiv waren als  $100\mu\text{M}$  (Abbildung 23B). Eine nahezu vollständige Inhibition des Substratabbaus wurde durch Zugabe von  $1\text{mM}$  o-Phenanthrolin, einem universellen Metalloproteaseinhibitor, erzielt<sup>4</sup> (Abbildung 23B). Die Behandlung von HMC-1 mit Oxidanzien ( $300\text{-}500\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw.  $50\mu\text{M}$  HOCl) sorgte für eine signifikante Zunahme des Substratumsatzes durch die Zellen (Abbildung 23C). Diese Zunahme ließ sich in beiden Fällen durch Zusatz von  $100\mu\text{M}$  TAPI-2 vollständig hemmen (Abbildung 23C).

### **III.7.3 Die Behandlung von HMC-1 mit Oxidanzien führt nicht zu einer vermehrten proteolytischen Aktivierung von TACE**

Um zu klären, ob eine 1-stündige Behandlung von HMC-1 mit Oxidanzien die vermehrte proteolytische Prozessierung von Pro-TACE bewirkt, wurden unstimulierte und mit Oxidanzien ( $50\mu\text{M}$  HOCl oder  $1\text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) behandelte HMC-1 lysiert und die Lysate einer Western Analyse unterzogen (Abbildung 24). Das Verhältnis der beiden TACE-reaktiven Banden zueinander ( $80/100\text{kDa}$ ) war in Lysaten aller drei Proben nahezu gleich (ca. 0,6).

---

<sup>4</sup> o-Phenanthrolin komplexiert divalente Metall-Ionen

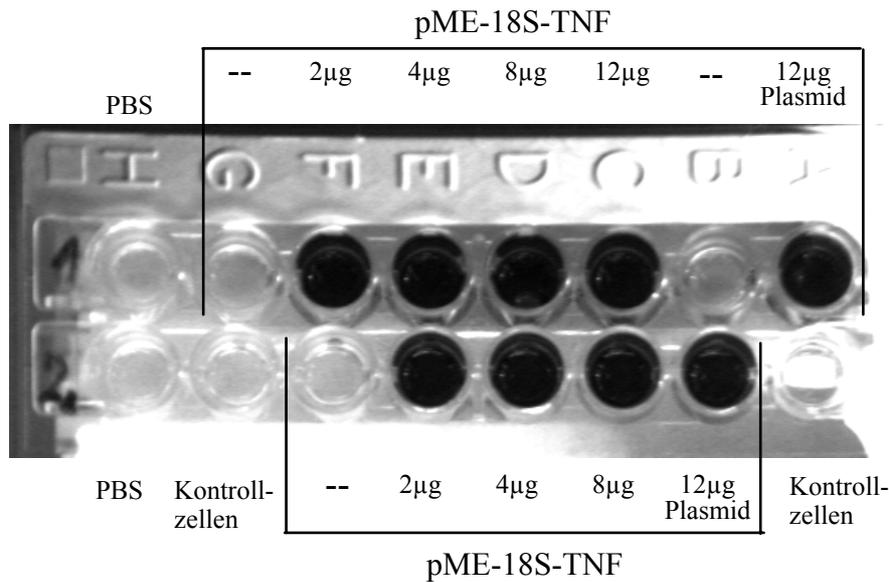


**Abbildung 24: TACE in Lysaten oxidativ stimulierter HMC-1.** Repräsentativer Western blot. Spuren 1-2: Lysate unstimulierter Zellen. Spuren 3-4: Lysate von Zellen, die für 1h mit 50 $\mu$ M HOCl stimuliert wurden; Spuren 5-6: Lysate von Zellen, die für 1h mit 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert wurden. Aufgetragene Mengen Gesamtprotein: 50 $\mu$ g (Spuren 1,3 und 5) oder 25 $\mu$ g (Spuren 2, 4 und 6). 100kDa = Pro-TACE, 80kDa = prozessiertes TACE ohne Prodomäne.

### III.7.4 Vorarbeiten: Transiente Expression von TNF- $\alpha$ in HMC-1

Der Umsatz synthetischer TACE-Substrate durch HMC-1 ist, wegen des hohen Anteils an unspezifischem Abbau, nur bedingt als Maß für die TACE-Aktivität geeignet. Andererseits exprimieren HMC-1 zu wenig TNF- $\alpha$ , um ein akutes "shedding" durch das in diesen Zellen ausreichend vorhandene TACE nachzuweisen. Ein Ausweg aus diesem Dilemma könnte die Überexpression von TNF- $\alpha$  in HMC-1 sein.

Zur transienten Überexpression von TNF- $\alpha$  in HMC-1 wurde das Plasmid pME-18S-TNF, welches die cDNA für humanes TNF- $\alpha$  enthält, in die Zellen transfiziert und die TNF- $\alpha$ -Sekretion in den Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion untersucht.



**Abbildung 25: TNF- $\alpha$  im Überstand von HMC-1.** Abgebildet ist die Farbstoffentwicklung in einem ELISA; der Farbstoff in den Vertiefungen der Tüpfelplatte zeigt an, daß TNF- $\alpha$  in der Probe vorhanden war. PBS = nur Puffer aufgetragen. Als Transfektionskontrolle (--) dienten Zellen aus derselben Charge wie die Plasmid-transfizierten Zellen; sie wurden jedoch nur mit Transfektionsreagenz behandelt. Kontrollzellen = HMC-1 aus einer Kultur, die sich in der Wachstumsphase befand ( $10^5$  Zellen/ml).

Während untransfizierte HMC-1 weder nach zwei, noch nach drei Tagen Inkubation meßbare Mengen an TNF- $\alpha$  ins Medium abgaben, wurden hohe Mengen an TNF- $\alpha$  (>32pg/ml, mit dem verwendeten ELISA nicht mehr abgestuft quantifizierbar) im Überstand aller transfizierten Zellen nachgewiesen (Abbildung 25). Die Expression war dabei bereits 24h nach der Transfektion nachweisbar und dauerte mindestens drei Tage an (Ergebnis nicht gezeigt). Transfizierte HMC-1, die gewaschen und 1h in Puffer inkubiert wurden, setzten in dieser Zeit ebenfalls so große Mengen an TNF- $\alpha$  frei, daß mit dem verwendeten ELISA keine quantitative Aussage mehr zu treffen war.

## IV. Diskussion

### IV.1 Die postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Herzen ist abhängig von Redox-Streß

Die akute Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus dem Herzen wurde bereits in Studien an Patienten nach CABG und in Arbeiten am isolierten, reperfundierte Herzen gezeigt (Kupatt, Habazettl et al., 1999; Massoudy, Zahler et al., 2000). Ungeklärt waren bislang jedoch Ursache und genauer Zeitverlauf der Freisetzung, sowie die zelluläre Quelle von myokardialem TNF- $\alpha$ . Die ersten Experimente, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden waren, zeigten, daß ischämische Rattenherzen während der Reperfusion TNF- $\alpha$  ins Interstium abgaben. Die Freisetzung des Cytokins erfolgte dabei sowohl in der frühen Phase der Reperfusion (2-10min nach der Ischämie), als auch während der späteren Reperfusion (>45min). Während der späte Anstieg der TNF- $\alpha$ -Freisetzung wahrscheinlich auf eine *de novo*-Synthese des Cytokins zurückzuführen ist, kommt die akute Freisetzung ohne eine Geninduktion aus. Sie ließe sich auf zweierlei Weise erklären: (1) Durch die schnelle Freisetzung von präformiertem, löslichem TNF- $\alpha$  aus granulären Speichern oder (2) durch die vermehrte proteolytische Abspaltung von Pro-TNF- $\alpha$  von der Zellmembran.

Anoxisch oder unter "low-flow"-Bedingungen reperfundierte Herzen, sowie Herzen, die in Gegenwart des Antioxidanz GSH reperfundierte worden waren, gaben weniger TNF- $\alpha$  ab, als ischämische Kontrollherzen. Diese Befunde weisen darauf hin, daß oxidativer Stress für die postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung vonnöten ist. Besonders die Tatsache, daß der initiale

TNF- $\alpha$ -Anstieg im Transsudat von GSH-behandelten Herzen fehlt, legt nahe, daß die rasche TNF- $\alpha$ -Abgabe vom extrazellulären Redoxstatus abhängt.

Infusionen von HOCl (10min, 1 $\mu$ M) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30min, 100 $\mu$ M) induzierten eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus nicht-ischämischen Herzen. Obgleich eine makroskopische Untersuchung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Herzen sowie deren funktionelle Parameter keinerlei Hinweis auf eine unmittelbare oxidative Schädigung lieferten, kann dennoch nicht absolut ausgeschlossen werden, daß die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung eine Nekrotisierung von Teilen des Herzgewebes verursacht und damit eine partielle Ischämie ausgelöst haben könnte. Da Ischämie an sich, ebenso wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Stimuli sind, die in Kardiomyozyten *in vitro* die TNF- $\alpha$ -Synthese induzieren können (Meldrum, 1998), muß eine Deutung des Ergebnisses unter Vorbehalt erfolgen. Wäre jedoch die Ischämie alleine ein ausreichender Stimulus für die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Herzgewebe, so hätte man auch bei ischämischen Herzen, die mit verminderter koronarer Flußrate reperfundiert wurden, einen TNF- $\alpha$ -Anstieg erwarten müssen. Das Gegenteil war der Fall: die TNF- $\alpha$ -Produktion von "low-flow"-Herzen war ebenso niedrig wie die von nicht-ischämischen Herzen.

Auch die Infusion von HOCl führte zu erhöhter TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Herzen. Die niedrige HOCl-Konzentration von 1 $\mu$ M sowie die kurze Infusionsdauer (10min) wurden gewählt, um Nebeneffekte wie eine Konstriktion der Koronargefäße möglichst zu vermeiden. Selbst eine zehnminütige Behandlung mit 1 $\mu$ M HOCl führte noch zu einer – relativ schwach ausgeprägten – Vasokonstriktion, die sich in einem Rückgang der koronaren Flußrate um 0,5-1ml/min äußerte. Interessanterweise hielt die durch die HOCl-Infusion ausgelöste TNF- $\alpha$ -Produktion selbst dann noch an, als die Intervention längst vorüber war.

Faßt man die Befunde zusammen, die aus (1) der oxidativen Stimulation nicht-ischämischer Herzen und (2) der "low-flow"-Reperfusion ischämischer Herzen gewonnen wurden, so liegt der Verdacht nahe, daß nicht die Ischämie selbst, sondern vielmehr der oxidative Streß (wie er in der aeroben Reperfusion im Herzgewebe entsteht) für die TNF- $\alpha$ -Freisetzung verantwortlich ist. Mechanistisch sind sowohl eine erhöhte Mastzell-Degranulation, als auch eine akute Aktivierung von TACE und/oder verwandten Metalloproteasen durch oxidativen Streß vorstellbar. Inzwischen gelang es einer Arbeitsgruppe, zu demonstrieren, daß rekombinantes pro-TACE *in vitro* durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert werden kann, und zwar durch Oxidation der SH-Gruppe des inhibitorischen "cysteine switch" (Zhang, Oliver et al., 2001). Auch viele Metalloproteasen verfügen über einen derartigen "cysteine switch". In einer Arbeit konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, pro-MMP-7 durch HOCl – vermutlich über einen ähnlichen Mechanismus – zu aktivieren (Fu, Kassim et al., 2001). Eine andere Studie weist MMP-7 als mögliche TNF- $\alpha$ -"Sheddase" aus (Haro, Crawford et al., 2000).

Die Frage nach den Auswirkungen von postischämisch freigesetztem TNF- $\alpha$  auf das Herz wird kontrovers diskutiert (Entman, Youker et al., 2000; Frangogiannis, Smith, Entman, 2002; Kupatt, Habazettl et al., 1999; Kurrelmeyer, Michael et al., 2000; Yokoyama, Vaca et al., 1993). Patienten zeigten unmittelbar nach Legen eines arteriellen Bypass erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel in koronarvenösen Blut. Interessanterweise besteht eine negative Korrelation zwischen der unmittelbar vom Herzen abgegebenen TNF- $\alpha$ -Menge (erste 5min) und dem *cardiac index*<sup>5</sup>, der erst mehrere Stunden nach der Operation ermittelt wurde (Freyholdt, Massoudy et al., 2003). Da TNF- $\alpha$  so früh im Verlauf des myokardialen Reperfusionsschadens freigesetzt wird, läßt sich vorstellen, daß ihm eine bedeutende Rolle im Krankheitsgeschehen zukommt.

## IV.2 Rolle von Mastzellen

### IV.2.1 Quellen für TNF- $\alpha$ im Herzgewebe

Die immunhistochemischen Färbungen von Schnitten durch Herzgewebe der Ratte zeigten eine hohe Dichte an TNF- $\alpha$ -positiven Mastzellen. Entsprechende Verteilungen wiesen auch Gewebeschnitte von Mäuse- und menschlichen Herzen auf (Daten nicht gezeigt). Die Bedeutung von Mastzellen für die myokardiale TNF- $\alpha$  Produktion in der Reperfusion wird durch eine Reihe von Arbeiten unterstrichen (Entman, Youker et al., 2000; Frangogiannis, Lindsey et al., 1998). Sie konnte anhand des hier vorgestellten Modells für Ischämie/Reperfusion größtenteils bestätigt werden. Dennoch können zusätzliche Quellen für TNF- $\alpha$  im Herzen durch histologische Färbungen alleine nicht ausgeschlossen werden. Neben CD68-positiven Gewebe-Makrophagen kommen auch Kardiomyozyten als Lieferanten für TNF- $\alpha$  in Frage, vor allem dann, wenn die Herzen langanhaltenden inflammatorischen Stimuli ausgesetzt sind (Meldrum, 1998).

Immunfärbungen von Ventrikelgewebe der Ratte zeigten, daß der in Mastzellen enthaltene TNF- $\alpha$  innerhalb von 10min Reperfusion verloren geht (Daten nicht gezeigt). Demnach ist anzunehmen, daß die kardialen Mastzellen über einen Mechanismus verfügen, über den vorhandener TNF- $\alpha$  sehr schnell freigesetzt werden kann. Die Beobachtung, daß Ketotifen die frühe Freisetzung hemmt, scheint auf den ersten Blick für die Mastzell-Degranulation zu sprechen. Allerdings blieb ein anderer Degranulationsvorgang, nämlich die Histamin-

---

<sup>5</sup> Der *cardiac index* [ $l \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ] errechnet sich aus dem Herzminutenvolumen [ $l/\text{min}$ ] dividiert durch die Körperoberfläche [ $\text{m}^2$ ].

Freisetzung, durch Ketotifen in der gewählten Konzentration (100nM) unbeeinflusst. Falls demnach kardialer TNF- $\alpha$ , wie Histamin, aus Mastzellgranula stammt, so sind es höchstwahrscheinlich nicht dieselben Speicher, aus denen das Histamin freigesetzt wird. Hier könnte es möglicherweise aufschlußreich sein, Gewebeschnitte von Ketotifen-behandelten, kurz reperfundierten Herzen auf das Vorhandensein TNF- $\alpha$ -positiver Mastzell-Granula hin zu untersuchen.

#### IV.2.2 TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Mastzellen: Degranulation oder regulierte Exozytose?

Die Art und Weise, auf welche die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Mastzellen erfolgt, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt, die Literatur zum Teil widersprüchlich. Es lassen sich sowohl Belege für die Speicherung von präformiertem, löslichem TNF- $\alpha$  in cytoplasmatischen Granula (Kaartinen, Penttila, Kovanen, 1996; Thomas, Pennington et al., 1996), als auch Hinweise auf eine regulierte *de novo* Synthese (Baumgartner, Yamada et al., 1994) und Expression des Cytokins in membrangebundener Form finden. Entsprechend finden sich Studien, denzufolge die Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus Mastzellen durch Degranulation erfolgt (Beil, Login et al., 1996; Kaartinen, Penttila, Kovanen, 1996; Walsh, Trinchieri et al., 1991), und andere Studien, die besagen, daß TNF- $\alpha$  durch regulierte Exozytose von den Mastzellen sezerniert wird (Baumgartner, Yamada et al., 1994; Queralt, Brazis et al., 2000). Die intrazellulären Signaltransduktions-Kaskaden, über welche die – wie auch immer geartete – Freisetzung von präformierten und/oder *de novo* synthetisierten Mediatoren aus Mastzellen reguliert ist, sind noch nicht endgültig identifiziert; ein möglicher Kandidat ist vor allem der Ca<sup>2+</sup>/PKC-Signalweg (Queralt, Brazis et al., 2000) {Genovese, Patella, et al. 1997 183 /id} (Baumgartner, Yamada et al., 1994). In der Ratten-Mastzelllinie RBL-2H3 wird zudem durch erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spiegel die intrazelluläre Calcium-Antwort gehemmt, was wiederum eine Unterdrückung der TNF- $\alpha$ -Sekretion zur Folge hat (Guerin-Marchand, Senechal et al., 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Redox-Streß-vermittelte Freisetzung aus Herzen widerspricht einem solchen Mechanismus.

Auch andere Zellspezies betreffend herrschen durchaus widersprüchliche Ansichten dazu, zu welchem Ausmaß und in welchem subzellulären Kompartiment die Abspaltung von membranständigem pro-TNF- $\alpha$  stattfindet. Die ursprüngliche Annahme, derzufolge die TNF- $\alpha$ -Prozessierung an der Zelloberfläche stattfindet (Black, Rauch et al., 1997; Decoster, Vanhaesebroeck et al., 1995; Glaser, Pease et al., 1999), ist insofern relativiert worden, als sich ebenso zahlreiche Hinweise auf eine TNF- $\alpha$ -Abspaltung im Golgi-Apparat finden lassen (Jue, Sherry et al., 1990; Newton, Solomon et al., 2001; Shurety, Merino-Trigo et al., 2000; Watanabe, Nakada, Kobayashi, 1998). Einigkeit herrscht alleine darüber, daß es neben dem konstitutiven Transport auch regulierte Sekretion von TNF- $\alpha$  gibt. Unter den beteiligten intrazellulären Signaltransduktions-Kaskaden sind der Calcium/PKC-Weg (Nakada-Tsukui,

Watanabe, Kobayashi, 1999; Watanabe, Nakada, Kobayashi, 1998) und der cAMP/PKA-Weg (Kassis, Prabhakar, Lee, 1993; Prabhakar, Lipshutz et al., 1994) die am häufigsten genannten.

### IV.2.3 Ketotifen als Inhibitor der TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus dem Herzen

Ketotifen gilt anerkanntermaßen als Inhibitor der Mastzelldegranulation. Die vorliegende Arbeit konnte dies für 100nM Ketotifen nicht bestätigen. In Übereinstimmung damit gibt es einen Literaturhinweis dafür, daß die Ketotifen-Konzentration von 100nM, obwohl ausreichend, um die TNF- $\alpha$ -Freisetzung im oben beschriebenen Experiment zu unterdrücken, schlicht nicht genügt, um die Entleerung der Histamin-Granula zu inhibieren (Vleeming, van Rooij et al., 1991). Die beobachtete Inhibition der TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus ischämischen, reperfundierten Herzen durch Ketotifen scheint ferner nicht auf einer Verminderung des Redox-Streß zu beruhen, da ein unmittelbarer antioxidativer Effekt der Substanz nirgends beschrieben ist. Interessanterweise gibt es einen Bericht, in dem Ketotifen als Inhibitor der TNF- $\alpha$ -Produktion von Monozyten aus peripherem Blut (PBMC) bezeichnet wird. In dieser Arbeit wurde Ketotifen erfolgreich zur Behandlung der Cachexie von HIV-Patienten eingesetzt (Ockenga, Rohde et al., 1996). Darüberhinaus erwies sich Ketotifen als hilfreich bei der Behandlung einiger Formen des Nesselfiebers, wo es die TNF- $\alpha$ -Expression in der Haut und im Serum reduzierte (Frezolini, De Pita et al., 2002). Schließlich wird dem Ketotifen eine protektive Wirkung in einem Modell der experimentellen Dünndarm-Entzündung zugesprochen (Rachmilewitz, Okon, Karmeli, 1997); die bei diesem Entzündungs-Modell auftretenden Symptome ähneln denen von Morbus Crohn, einer Erkrankung, an der bekanntermaßen TNF- $\alpha$  beteiligt ist.

Am isolierten Rattenherzen unterdrückte Ketotifen überraschenderweise nicht nur die frühe, sondern auch die späte TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Dies spricht dafür, daß eine Aktivierung kardialer Mastzellen auch für die Induktion der späten TNF- $\alpha$ -Freisetzung wichtig ist. Eine autokrine Stimulation der TNF- $\alpha$ -Expression ist bereits beschrieben worden (Wu, Boyer et al., 1993). Die Unterdrückung der späten TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Ketotifen könnte möglicherweise auch über einen anderen, vielfach beschriebenen Effekt der Substanz vermittelt werden: so bewirkt Ketotifen bei Mastzellen und Basophilen eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Castillo, Sanz, Oehling, 1986; Fernandez, Neffen et al., 1981). Auch eine Phosphodiesterase-(PDE-) Hemmung durch Ketotifen ist beschrieben worden (Castillo, Gamboa et al., 1990; Castillo, Oehling, Gamboa, 1991). Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels kann zur Folge haben, daß die Freisetzung von Mastzell-Mediatoren (z. B. Histamin, aber auch proinflammatorische Cytokine) unterbunden wird (Weston & Peachell, 1998). Andere Arbeiten berichten über eine Hemmung der LPS- oder ROS-induzierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus perfundierten Rattenherzen durch den  $\beta$ -2-Adrenozeptor-Agonisten Isoproterenol (Newman, Castresana et al., 2000; Newman, Castresana et al., 2002). Unterstellt

man dem Ketotifen jedoch eine ähnliche Wirkung wie den  $\beta$ -2-Adrenozeptor-Agonisten, nämlich eine Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels, so müßte man bei Infusion der Substanz in isolierte Herzen positiv chronotrope und inotrope Effekte erwarten. Solche sympathomimetische Effekte wurden in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet.

Die niedrige Ketotifen-Konzentration von 100nM wurde gewählt, da höhere Konzentrationen (200nM bis 1 $\mu$ M) am isolierten Herzen eine starke Konstriktion der Koronargefäße zur Folge hatten. Selbst mit 100nM Ketotifen wurde noch eine leichte Verminderung der koronaren Flußrate (von durchschnittlich ca. 5ml/min auf 3-4ml/min) sowie eine Abschwächung der reaktiven Hyperämie beobachtet. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß die verminderte TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Ketotifen-behandelten Herzen auf ein reduziertes Sauerstoffangebot während der Reperfusion zurückzuführen ist, denn eine Behandlung von Herzen mit HOCl, die ebenfalls mit einer leichten Vasokonstriktion einherging, führte nicht zu verringerter, sondern im Gegenteil zu verstärkter TNF- $\alpha$ -Produktion.

In Anbetracht der wichtigen Rolle, die dem TNF- $\alpha$  im Zuge des myokardialen Reperfusionsschadens zukommt, könnten die Resultate der Ketotifen-Versuche, wenn auch bisher nicht leicht zu deuten, möglicherweise von Relevanz für die Klinik sein.

### **IV.3 Rolle von TACE**

Die immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen zeigten, daß TACE und TNF- $\alpha$  in kardialen Mastzellen perinukleär und in membrannahen Granula kolokalisiert waren. Darüberhinaus ließen sich beide Formen von TACE, das Proenzym und die prozessierte Form, in Homogenaten aus Rattenherzen nachweisen. Allerdings war hier die prozessierte Form (d. h. reifes TACE ohne die Prodomäne, welche den "cysteine switch" enthält) deutlich stärker vertreten als die Proform. Es ist daher anzunehmen, daß für eine oxidative Aktivierung von pro-TACE im Herzen relativ wenig Spielraum bleibt. Zudem verschob sich durch Ischämie/Reperfusion das Verhältnis der beiden TACE-Spezies (100/80kDa) nicht zugunsten der kleineren Molekülform. Dies spricht gegen eine verstärkte proteolytische Prozessierung von TACE in Antwort auf die Ischämie und Reperfusion. Sollte aber eine oxidative oder proteolytische Aktivierung von TACE nur in einem kleinen Teil aller kardialen Zellen (z. B. nur in Mastzellen) stattfinden, so könnte dieser Effekt leicht übersehen werden, wenn Homogenate aus Gesamtgewebe analysiert werden.

Die postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus isolierten Rattenherzen ließ sich durch den MMP-Inhibitor II hemmen. Dieser Inhibitor hemmt neben MMP-1 und -3 auch MMP-7 (IC<sub>50</sub>

= 30nM). Da noch nicht untersucht wurde, ob bei der verwendeten Konzentration von 1µM evtl. eine unspezifische Hemmung von TACE erfolgt, läßt sich TACE als verantwortliche TNF- $\alpha$ -Convertase zwar nicht ausschließen; das Ergebnis kann jedoch, im Zusammenhang mit den oben bereits diskutierten Befunden, als Hinweis auf die Beteiligung einer MMP gedeutet werden. Es sind neben TACE noch mindestens drei mögliche TNF- $\alpha$ -Convertasen bekannt, neben ADAM-10 und MMP-17 auch MMP-7 (English, Puente et al., 2000; Haro, Crawford et al., 2000; Lunn, Fan et al., 1997). Die Frage nach der Beteiligung von MMPs an der postischämischen TNF- $\alpha$ -Produktion von Herzen ließe sich möglicherweise durch Vorbehandlung ischämischer, reperfundierter Rattenherzen mit unterschiedlichen TIMPs klären. So hemmen TIMP-1 und -2 ein breites Spektrum an MMPs, während TACE nur durch TIMP-3 gehemmt wird (Amour, Slocombe et al., 1998; Gomez, Alonso et al., 1997).

Faßt man die beschriebenen Befunde zusammen, erwächst zunehmender Zweifel an der alleinigen Verantwortlichkeit von TACE für die TNF- $\alpha$ -Freisetzung während der myokardialen Reperfusion. Eine kardioprotektive Wirkung von TACE-Inhibitoren am Ischämie- und Reperfusionsgeschädigten Herzen muß – insbesondere in Hinsicht auf künftige klinische Anwendungen – in Frage gestellt werden.

#### **IV.4 Oxidative Aktivierung von TACE im Zellmodell**

Die Induktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung in Antwort auf oxidative Stimulation wurde an unterschiedlichen Zelltypen untersucht, von denen angenommen wurde, daß sie prinzipiell in der Lage sind, TNF- $\alpha$  zu exprimieren: Lymphozyten (Jurkat T), Monozyten (Mono Mac 6), Leukozyten aus peripherem Blut (PBL) und Mastzellen (HMC-1). Es wurden entweder die Abgabe von löslichem TNF- $\alpha$  in den Überstand, oder die relative Menge an TNF- $\alpha$  auf der Zellmembran vor und nach der oxidativen Stimulation ermittelt.

Jurkat setzten während kurzer Inkubationszeiten nur sehr wenig TNF- $\alpha$  frei; die im Pufferüberstand gemessenen Konzentrationen lagen durchwegs im unteren Nachweisbereich des (ohnein schon ultrasensitiven) ELISAs. Möglicherweise hätte man durch ein anderes Vorstimulations-Protokoll die TNF- $\alpha$ -Expression erhöhen können. So sezernierten z. B. Lymphozyten aus peripherem Blut, die gleichzeitig mit einem monoklonalen Antikörper gegen OKT3 und mit PMA behandelt worden waren, binnen 24h offensichtlich ausreichende Mengen an TNF- $\alpha$  ins Medium (Mohler, Sleath et al., 1994). Allerdings ist die gleichzeitige Vorbehandlung mit mehreren Substanzen wenig wünschenswert, da sich die Wahrscheinlichkeit von Nebeneffekten erhöht. Zudem war für die vorliegende Arbeit die akute Veränderung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung von Interesse.

Bei Mono Mac 6 wirkte sich die Vorstimulation mit LPS selbst auf die kurzfristige TNF- $\alpha$ -Produktion aus: mit LPS vorbehandelte Mono Mac 6 sezernierten innerhalb einer halben Stunde etwa viermal mehr TNF- $\alpha$  als nicht vorstimulierte Zellen. Allerdings rief eine halbstündige Behandlung mit 10 $\mu$ M HOCl oder 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keine zusätzliche Steigerung der Sekretion hervor. Der nach 30min Inkubation mit 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachtete TNF- $\alpha$ -Anstieg war sicherlich nicht auf verstärktes "shedding", sondern eher auf Lyse der Zellen zurückzuführen. In einer Arbeit, in der das PMA-induzierte "shedding" von TNFR-1 in Antwort auf oxidative Stimuli untersucht wurde, wurden Mono Mac 6 für 2h in Medium mit 4mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert (Zhang, Oliver et al., 2001). Obwohl das dem Kulturmedium zugesetzte Serum eine Reihe von Radikalfängern und antioxidativen Substanzen enthält, kann man spekulieren, daß auch in diesem Fall ein erheblicher Prozentsatz an Zellen während des Versuchs lysiert war. Die Ergebnisse aus eigenen Versuchen sprechen gegen ein oxidativ induziertes TNF- $\alpha$ -shedding bei Mono Mac 6, da tolerierbare Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder HOCl ineffektiv waren. Hier könnten durchflußzytometrische Messungen von TNF- $\alpha$  auf der Zellmembran sinnvolle Ergänzungen liefern: dieses Verfahren erfaßt nur intakte Zellen, so daß eine Unterscheidung zwischen TNF- $\alpha$ -Verlust durch Lyse und durch echtes "shedding" möglich sein sollte.

Unstimulierte HMC-1 setzten innerhalb von zwei Stunden nur wenig TNF- $\alpha$  (ca. 6pg/10<sup>6</sup> Zellen) frei. Die akute Freisetzung ließ sich weder durch zweistündige Stimulation mit LPS, noch mit 100ng/ml PMA wesentlich steigern. Es ist berichtet worden, daß eine kombinierte Stimulation mit PMA und Calcium-Ionophor für 3h HMC-1 dazu veranlassen kann, TNF- $\alpha$  freizusetzen (Queralt, Brazis et al., 2000). Ein derartiges Stimulations-Protokoll war jedoch für die Untersuchung des akuten TNF- $\alpha$ -shedding nicht wünschenswert. Der geringfügige (statistisch nicht signifikante) Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Medium von HMC-1, die mit 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurden, ist zwar nicht auf vermehrte Zell-Lyse zurückzuführen; aufgrund der relativ langen Inkubationszeit (120min) fällt es jedoch schwer, den Effekt auf oxidative Aktivierung von pro-TACE zurückzuführen; als Erklärungen kämen möglicherweise auch eine vermehrte Proteolyse des Proenzym oder eine verstärkte Synthese von TACE in Frage. Die negativen Ergebnisse der FACS-Analyse nach nur 30minütiger Stimulation lassen die Zweifel in dieser Hinsicht noch angebrachter erscheinen. Allgemein reicht die akute TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus HMC-1 nicht aus, um eine oxidative TACE-Stimulation zweifelsfrei nachzuweisen.

Auch die akute TNF- $\alpha$ -Produktion von PBL erwies sich als zu niedrig, um deutliche Unterschiede zwischen unstimulierten und oxidativ stimulierten Zellen beobachten zu können. Die erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand von Zellen, die mit 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert worden waren, geht vermutlich, wie bei Mono Mac 6, nicht auf verstärktes "shedding" zurück, da 90% der Zellen durch die Behandlung lysiert und niedrigere

Konzentrationen von Oxidanz ineffektiv waren. Die FACS-Analyse erwies sich als aussagekräftiger. Hier konnte Inkubation mit PMA die TNF- $\alpha$ -Freisetzung von der Membran stimulieren, ein Effekt, der sich durch gleichzeitige Gegenwart von Antioxidanzien unterdrücken ließ. Die Behandlung mit PMA kann insofern als oxidativer Stimulus angesehen werden, als sie die intrazelluläre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induziert (Miyanoshta, Takahashi, Endou, 1989; Zhang, Oliver et al., 2001). Die Tatsache, daß PMA die einzige Substanz war, die eine steigernde Wirkung auf das TNF- $\alpha$ -„shedding“ hatte – HOCl und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blieben ohne Effekt –, könnte darauf hinweisen, daß neben Ca<sup>2+</sup>/PKC auch endogene ROS zur Aktivierung von TACE führen können.

Das folgende Problem ergab sich bei allen durchgeführten Zell-Stimulationsversuchen: Einerseits reichten die kurzen Inkubationszeiten – für die Aussagekraft der Experimente absolut unerlässlich – nicht aus, um eine quantitativ genügende TNF- $\alpha$ -Freisetzung zu erzielen. (Dies galt für alle untersuchten Zellspezies.) Auf der anderen Seite führte eine längere Inkubation zwar zu einer, je nach Zellspezies unterschiedlich starken Akkumulation von TNF- $\alpha$  im Überstand, dabei jedoch auch zum Verlust der Aussagekraft des Experiments. Dieses Dilemma ließe sich umgehen, hätte man eine Zellspezies zur Verfügung, die in der Lage ist, binnen kurzer Zeit (maximal 30min) meßbare Mengen an TNF- $\alpha$  zu sezernieren.

#### **IV.5 HMC-1 als Modell für kardiale Mastzellen**

Da einerseits Mastzellen die Hauptlieferanten von TNF- $\alpha$  im Herzen sind, andererseits die Gewinnung originärer Mastzellen aus Herzgewebe nicht realisierbar ist, wurde untersucht, ob sich die humane Mastzelllinie HMC-1 als Modellsystem für künftige Studien zur oxidativen TACE-Aktivierung eignet. Die Zellen exprimierten beide Formen von TACE (pro-Form und prozessierte Form), wobei in Lysaten aus HMC-1, im Gegensatz zum Herzgewebe, die pro-Form überwog. TACE war hauptsächlich an der Plasmamembran von HMC-1 lokalisiert; dies galt auch für die unprozessierte Form. Dieser Befund war insofern überraschend, als Studien zur Reifung und intrazellulären Lokalisation von TACE zeigten, daß unprozessiertes TACE – zumindest in THP-1 und COS Zellen – ausschließlich intrazellulär vorkommt, während alles an der Oberfläche der Zellen exprimierte Protein bereits seine Prodomäne eingebüßt hat (Schlondorff, Becherer, Blobel, 2000).

Behandlung von HMC-1 mit HOCl oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu keiner verstärkten Proteolyse von pro-TACE. Alternativ zur proteolytischen Aktivierung durch eine Furin-ähnliche Convertase ist damit eine akute Aktivierung, die durch die Oxidation des „cysteine switch“ innerhalb der Prodomäne vermittelt wird, durchaus vorstellbar. Unglücklicherweise exprimierten unstimulierte HMC-1 kaum TNF- $\alpha$ . Um dieses Problem zu umgehen, wurde das TNF- $\alpha$ -Peptid

Ac-SPLAQAVRSSSR-NH<sub>2</sub> als Substrat verwendet. Intakte HMC-1 degradierten das Peptid sehr effizient, allerdings ohne das TACE-spezifische Hexamer Ac-SPLAQA zu bilden, eines der beiden Produkte, die nach Inkubation des TNF- $\alpha$ -Peptids mit der katalytischen Domäne von human-rekombinantem TACE entstehen (Black, Rauch et al., 1997). Nachdem weder extra-, noch intrazellulär eine selektive Degradation des Hexamers beobachtet wurde, muß davon ausgegangen werden, daß die Peptidspaltung zum überwiegenden Teil durch (eine) andere Protease(n) katalysiert wurde. Die naheliegende Erklärung wäre ein Enzym, das nahe verwandt mit TACE ist. Zumindest handelt es sich zwingend um eine (mehrere) Metalloprotease(n), da der Substratabbau sich nahezu komplett durch *o*-Phenanthrolin blockieren ließ. Nachdem die Peptid-spaltende Aktivität von HMC-1 nicht auf die Zellmembran beschränkt blieb, sondern auch im Überstand nachweisbar war, kommen neben membranverankerten Metalloproteasen auch MMPs in Frage. Bekannte TNF- $\alpha$ -Convertasen sind, wie oben bereits erwähnt, neben TACE auch ADAM-10, MMP-17 und MMP-7. Welche dieser Enzyme (oder anderer möglicher Kandidaten) von HMC-1 exprimiert werden, bleibt noch festzustellen.

Verfolgt man ausschließlich den Substratabbau durch HMC-1, so wurde dieser durch Behandlung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder HOCl gesteigert, ein Effekt, der sich durch 100 $\mu$ M TAPI-2 komplett unterdrücken ließ. Untersuchungen zur Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus THP-1-Zellen ergaben für den nahe verwandten Inhibitor TAPI<sup>6</sup> einen IC<sub>50</sub> von 50-100 $\mu$ M (Hooper, Karran, Turner, 1997; Mohler, Sleath et al., 1994). Dieser Befund könnte also, läßt man die Frage nach dem fehlenden Produkt Ac-SPLAQA außer Betracht, auf eine oxidative Aktivierung von TACE-verwandten Proteasen mit einem "cysteine-switch" hinweisen.

---

<sup>6</sup> TAPI unterscheidet sich von TAPI-2 durch die Substitution der *t*-butyl-Gruppe durch einen Naphtylrest

#### **IV.6 TNF- $\alpha$ -exprimierende HMC-1: Ein geeignetes Modell für Studien zur oxidativen TACE-Aktivierung?**

Allgemein ist es – wegen des hohen Anteils an unspezifischem Abbau synthetischer TACE-Substrate – vorzuziehen, die Freisetzung authentischer, zellgebundener Substrate zu untersuchen. Da HMC-1 pro-TACE in großen Mengen an der Plasmamembran exprimierten, wurde es als lohnend betrachtet, die Zellen mit einem TNF- $\alpha$ -Expressionsvektor zu transfizieren. Vorversuche mit transfizierten, TNF- $\alpha$ -exprimierenden HMC-1 ergaben, daß das Cytokin in großen Mengen sezerniert wurde. Der künftigen Erstellung von Freisetzungskinetiken sowie der Durchführung von Hemm- und Stimulationsversuchen ist damit der Weg geebnet.

Mit den TNF- $\alpha$ -transfizierten HMC-1 steht nunmehr ein zelluläres Modell zur Verfügung, das (1) den "cysteine switch" enthaltendes pro-TACE exprimiert, (2) keiner Vorstimulation, z. B. durch LPS, PMA oder Calcium-Ionophor, mehr bedarf und (3) bereits innerhalb kurzer Zeit gut meßbare Mengen an TNF- $\alpha$  produziert. Dies sind erstmals günstige Voraussetzungen für künftige funktionelle Studien zur oxidativen TACE-Stimulation in intakten Zellen.

## V. Zusammenfassung

Die Reoxygenierung des ischämischen Myokards geht mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Oxidanzien im Gewebe sowie mit der Synthese und Freisetzung zahlreicher pro-inflammatorischer Cytokine (u. a. auch TNF- $\alpha$ ) einher. TNF- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle als Entzündungsmediator und ist möglicherweise ursächlich beteiligt an der Entstehung des myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens. Als Hauptquelle von TNF- $\alpha$  im Herzen werden Gewebs-Mastzellen diskutiert, jedoch kommen auch diverse andere Zellspezies als TNF- $\alpha$ -Produzenten in Frage. TACE (TNF- $\alpha$ -converting enzyme), ein Enzym aus der ADAM-Familie der Metalloproteasen, katalysiert die Umwandlung von membran-assoziiertem pro-TNF- $\alpha$  in die lösliche Form. TACE wird als inaktives Zymogen synthetisiert und normalerweise durch proteolytische Entfernung der inhibitorischen Prodomäne aktiviert. Darüberhinaus verfügt TACE, wie die nahe verwandten MMPs, innerhalb der Prodomäne über einen redox-sensitiven "cysteine switch". Vor allem in Situationen, in denen es zur vermehrten Bildung von ROS/oxidierenden Substanzen kommt, wie z. B. bei der Reperfusion des ischämischen Myokards, ist daher eine akute Aktivierung von pro-TACE durch Oxidation des "cysteine switch" vorstellbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die folgenden Fragestellungen untersucht werden: Was sind die zellulären Quellen für postischämisch freigesetzten TNF- $\alpha$  im Herzen? Welche Rolle spielt TACE bei der TNF- $\alpha$ -Freisetzung während der Reperfusion des ischämischen Herzens? Kann Pro-TACE prinzipiell durch Oxidation des "cysteine switch" aktiviert werden? Falls ja, spielt dieser Mechanismus bei myokardialer Ischämie/Reperfusion eine Rolle, oder erfolgt die Aktivierung von TACE in der Reperfusion durch einen anderen Mechanismus (z. B. gesteigerte Transkription/Translation, vermehrte proteolytische Prozessierung)?

Zur Klärung dieser Fragen wurden zwei Modelle verwendet: das isolierte, perfundierte Rattenherzpräparat in der Anordnung nach Langendorff und verschiedene Zellspezies (Leukozyten aus humanem, peripheren Blut, humane Lymphozyten-, Monozyten- und Mastzelllinien).

Die Ergebnisse der Arbeit fassen sich wie folgt zusammen:

Ischämische, salin reperfundierte Rattenherzen setzten während zweistündiger Reperfusion bis zu 60pg/min TNF- $\alpha$  frei, während nicht-ischämische Kontrollherzen in derselben Zeit kaum TNF- $\alpha$  (max. 3pg/min) produzierten. Die postischämische TNF- $\alpha$ -Freisetzung erfolgte in zwei Schüben (+2 bis +10min und  $\geq$  +60min) und war abhängig von der Gegenwart von Sauerstoff/oxidativem Stress während der Reperfusion. Anoxische Reperfusion (94,4% N<sub>2</sub>), Reperfusion mit verminderter koronarer Flußrate (1ml/min) sowie Reperfusion in Gegenwart von Antioxidanz (GSH, 100 $\mu$ M) verringerten die postischämische TNF- $\alpha$ -Produktion gegenüber der Produktion von normoxisch (94,4% O<sub>2</sub>) reperfundierten Herzen. Zudem löste eine kurze Behandlung nicht-ischämischer Herzen mit Oxidanz (30min 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 10min 1 $\mu$ M HOCl) eine gegenüber Kontrollherzen erhöhte TNF- $\alpha$ -Produktion aus. Letzteres legt nahe, daß nicht die Ischämie an sich, sondern der Redox-Streß während der Reperfusion die kardiale TNF- $\alpha$ -Produktion auslöst.

In histologischen Schnitten durch Ratten-Ventrikel wurden Gewebs-Mastzellen als Hauptquelle für TNF- $\alpha$  identifiziert. Diese Zellen waren sowohl TNF- $\alpha$ - als auch TACE-positiv; die Kolokalisation war vor allem in Kernnähe (Golgi) sowie in Granula nahe der Plasmamembran sichtbar. Kardiale Mastzellen der Ratte verloren gespeicherten TNF- $\alpha$  bereits in der Frühphase (+10min) der Reperfusion. Ketotifen, ein Hemmer der Mastzell-Degranulation, unterdrückte in einer Konzentration von 100nM im ischämischen Rattenherzen sowohl die frühe, als auch die späte Phase der TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Die postischämische Histamin-Produktion blieb dagegen von Ketotifen in submikromolarer Konzentration unbeeinflusst. Diese Befunde legen nahe, daß der postischämisch aus kardialen Mastzellen freigesetzte TNF- $\alpha$  aus anderen intrazellulären Speichern stammt, als Histamin; vermutlich handelt es sich bei der frühen postischämischen TNF- $\alpha$ -Freisetzung dennoch um einen Degranulationsvorgang.

Sowohl die Pro-, als auch die reife Form von TACE sind in Rattenmyokard exprimiert, wobei die reife Form ohne Prodomäne mengenmäßig stark überwiegt. Ischämie/Reperfusion führte weder zu einer verstärkten Synthese von TACE, noch zu vermehrter proteolytischer Aktivierung des Proenzym. Auch die TACE-Aktivität im Herzgewebe (gemessen als spezifische Spaltung eines synthetischen TACE-Substrats) wurde durch Ischämie/Reperfusion global nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse sprechen gegen TACE als ausschließlich verantwortliche TNF- $\alpha$ - "Sheddase" bei myokardialer Ischämie/Reperfusion. In Übereinstim-

mung hiermit bewirkte am isolierten Rattenherzen ein Metalloprotease-Inhibitor, der MMP-1, -3 und -7 hemmt, eine Reduktion der postischämischen TNF- $\alpha$ -Freisetzung auf maximal 10 pg/min. Dieser überraschende Befund läßt auf die Beteiligung einer MMP an der postischämischen TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus dem Herzen schließen.

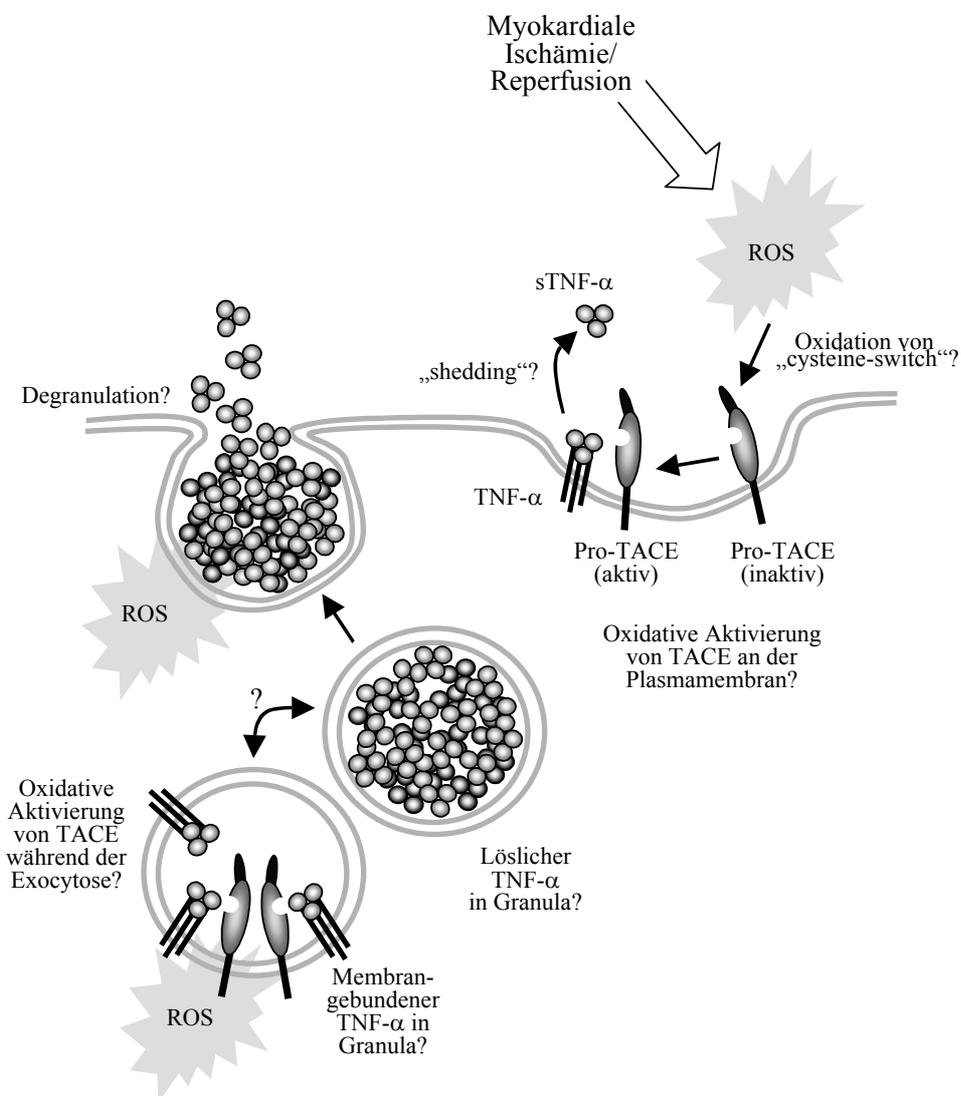
Stimulation von Jurkat, Mono Mac 6, PBL und HMC-1 mit Oxidanzien ( $H_2O_2$ , HOCl) in nicht unmittelbar toxischen Konzentrationen bewirkte akut, d. h. innerhalb von 30min, keine erhöhte TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Eine 30-minütige  $H_2O_2$ -Behandlung von Mono Mac 6 oder PBL in hoher Dosis (1mM) hatte dagegen 90% Zell-Lyse zur Folge und führte somit zu keiner echten Verstärkung von TNF- $\alpha$ -*"shedding"*. Stimulation von PBL mit PMA führte zu verstärkter Abspaltung von TNF- $\alpha$  von der Zellmembran; diese Wirkung von PMA war in Gegenwart von Antioxidanz (100 $\mu$ M GSH, 100 $\mu$ M Ascorbinsäure, 100 $\mu$ M Oxypurinol und 200 U/ml SOD) um etwa 60% vermindert. Allgemein war die *akute* TNF- $\alpha$ -Produktion bei allen untersuchten Zellspezies sehr gering (unstimulierte PBL: Spender-abhängig, durchschnittlich 5pg/10<sup>6</sup> Zellen; Jurkat, HMC-1: 1-6pg/10<sup>6</sup> Zellen; Mono Mac 6: unstimuliert 5 pg/10<sup>6</sup> Zellen, LPS-vorstimuliert 20pg/10<sup>6</sup> Zellen), so daß sich Unterschiede zwischen Intervention und Kontrolle nur schwer nachweisen ließen. Zwar sprechen die Befunde der Stimulationsversuche an Jurkat, Mono Mac 6 und PBL eher gegen einen oxidativ vermittelten Mechanismus der akuten TACE-Aktivierung; die Ergebnisse der Versuche an PMA-stimulierten PBL könnten jedoch darauf hinweisen, daß endogen erzeugte ROS in der Lage sind, ein vermehrtes TNF- $\alpha$ -*"shedding"* – möglicherweise vermittelt durch oxidative TACE-Aktivierung – zu bewirken.

Die Untersuchung der TACE-Aktivität intakter Zellen anhand des Abbaus synthetischer Substrate erwies sich aufgrund der starken unspezifischen Aktivität ebenfalls als problematisch. So ließ sich nach Inkubation der humanen Mastzelllinie HMC-1 mit einem TNF- $\alpha$ -Peptid (Ac-SPLAQAVRSSSR-NH<sub>2</sub>) das TACE-spezifische Abbauprodukt (Ac-SPLAQA) weder in Lysaten, noch im Überstand nachweisen, obgleich ein entsprechendes Test-Peptid in Gegenwart von HMC-1 für mindestens 3h stabil war. Der Substanz-*Abbau* erwies sich als Metalloprotease-abhängig (Hemmung durch 1mM o-Phenanthrolin) und ließ sich durch Gabe von  $H_2O_2$  in nicht-toxischen Konzentrationen (300-500 $\mu$ M) oder durch HOCl (50 $\mu$ M) stimulieren. Dieser vermehrte Umsatz des TNF- $\alpha$ -Peptids wurde durch gleichzeitige Gegenwart des TACE-Inhibitors TAPI-2 (100 $\mu$ M) komplett unterdrückt. HMC-1 exprimieren demnach eine Protease, die das TNF- $\alpha$ -Peptid spaltet, sich oxidativ stimulieren läßt sowie durch TAPI-2 hemmbar ist. Da das TACE-spezifische Abbauprodukt jedoch fehlt, handelt es sich möglicherweise nicht um TACE, sondern um eine nahe verwandte Metalloprotease.

HMC-1 exprimieren TACE (pro- und reife Form), wobei hier die Pro-Form überwiegt. Beide Formen von TACE befinden sich an der Zelloberfläche von HMC-1. Oxidative Stimulation führte nicht zur vermehrten proteolytischen Prozessierung von pro-TACE. Eine

oxidative Aktivierung der Proform von TACE wäre demnach in HMC-1 prinzipiell denkbar. Die TNF- $\alpha$ -Expression unstimulierter HMC-1 ist dagegen äußerst gering (Freisetzung  $\leq 6\text{pg}/10^6$  Zellen und Stunde). HMC-1, die mit einem TNF- $\alpha$ -Expressionskonstrukt transfiziert wurden, sezernierten akut große Mengen an TNF- $\alpha$  ( $>>32\text{pg}/10^6$  Zellen und Stunde, bisher nicht genauer quantifiziert), was sie zum geeigneten Werkzeug für künftige Studien zur oxidativen TACE-Aktivierung machen dürfte.

Was den Mechanismus der postschämischen TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus dem Herzen betrifft, gibt es noch immer eine Reihe offener Fragen (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Denkbare Möglichkeiten der TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus myokardialen Mastzellen.**  
ROS = reaktive Sauerstoffspezies. sTNF- $\alpha$  = löslicher TNF- $\alpha$ .

So bleibt zu untersuchen, aus welcher zellulären Quelle der in der Spätphase der Reperfusion vom Herzen abgegebene TNF- $\alpha$  stammt (z. B. Kardiomyozyten). Ferner bleibt der – gezeigtermaßen redox-sensitive – Mechanismus der TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus kardialen Mastzellen zu klären: handelt es sich um Degranulation oder um "shedding"? Interessant wäre insbesondere die Untersuchung der Frage, inwieweit der Vorgang der Mastzell-Degranulation oxidativ stimulierbar ist. Denkbar wäre zudem eine Beteiligung von Metalloproteasen/MMPs an der Degranulation. Schließlich wäre von Interesse, ob der nachweislich in Mastzell-Granula lokalisierte TNF- $\alpha$  tatsächlich bereits in löslicher Form vorliegt, oder ob er membranassoziiert ist und es für seine Freisetzung noch der proteolytischen Spaltung, z. B. durch kolokalisiertes TACE (oder eine andere in denselben Granula befindliche Metalloprotease), bedarf.

Hinsichtlich einer klinischen Bedeutung von Teilbefunden der vorliegenden Arbeit scheint vor allem die Frage klärens-wert, durch welchen Mechanismus Ketotifen eine Hemmung der kardialen TNF- $\alpha$ -Freisetzung (Früh- und Spätphase) bewirkt. In Anbetracht der Bedeutung von TNF- $\alpha$  für den postischämischen Reperfusionsschaden kann angenommen werden, daß Mastzellstabilisation und/oder antioxidative Intervention sich möglicherweise positiv auf die Erholung der Herzfunktion nach Ischämie und Reperfusion auswirken könnten.

## VI. Literaturverzeichnis

Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* **260** (1985), 2345-2354.

Althoff K, Mullberg J, Aasland D et al. Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem J* **353** (2001), 663-672.

Althoff K, Reddy P, Voltz N et al. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem* **267** (2000), 2624-2631.

Amour A, Slocombe PM, Webster A et al. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* **435** (1998), 39-44.

Arribas J, Lopez-Casillas F, & Massague J. Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor- alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding. *J Biol Chem* **272** (1997), 17160-17165.

Baumgartner RA, Yamada K, Deramo VA et al. Secretion of TNF from a rat mast cell line is a brefeldin A-sensitive and a calcium/protein kinase C-regulated process. *J Immunol* **153** (1994), 2609-2617.

Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* **14** (1993), 615-631.

Becker BF, Kupatt C, Massoudy P et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion. *Z Kardiol* **89 Suppl 9** (2000), IX/88-IX/91.

Becker BF, Massoudy P, Permanetter B et al. [Possible significance of free oxygen radicals for reperfusion injury]. *Z Kardiol* **82 Suppl 5** (1993), 49-58.

Beekman B, Drijfhout JW, Bloemhoff W et al. Convenient fluorometric assay for matrix metalloproteinase activity and its application in biological media. *FEBS Lett* **390** (1996), 221-225.

Beil WJ, Login GR, Aoki M et al. Tumor necrosis factor alpha immunoreactivity of rat peritoneal mast cell granules decreases during early secretion induced by compound 48/80: an ultrastructural immunogold morphometric analysis. *Int Arch Allergy Immunol* **109** (1996), 383-389.

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- alpha from cells. *Nature* **385** (1997), 729-733.

Bridges LC, Tani PH, Hanson KR et al. The lymphocyte metalloprotease MDC-L (ADAM 28) is a ligand for the integrin alpha4beta1. *J Biol Chem* **277** (2002), 3784-3792.

Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y et al. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* **273** (1998), 27765-27767.

Cal S, Freije JM, Lopez JM et al. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol Biol Cell* **11** (2000), 1457-1469.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72** (1975), 3666-3670.

Castillo JG, Gamboa PM, Garcia BE et al. Effect of ketotifen on phosphodiesterase activity from asthmatic individuals. *Allergol Immunopathol (Madr)* **18** (1990), 197-201.

Castillo JG, Oehling A, & Gamboa PM. Mechanism of ketotifen action in hypersensitivity reactions. Its effect on cellular enzymatic activities. *J Investig Allergol Clin Immunol* **1** (1991), 315-323.

Castillo JG, Sanz ML, & Oehling A. Action of ketotifen on histamine release and intracellular cAMP levels in basophil cultures from pollinic subjects. *Allergol Immunopathol (Madr)* **14** (1986), 107-113.

Clarke HR, Wolfson MF, Rauch CT et al. Expression and purification of correctly processed, active human TACE catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* **13** (1998), 104-110.

Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC et al. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* **59** (1999), 1196-1201.

Curtis MJ, Pugsley MK, & Walker MJ. Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* **27** (1993), 703-719.

Decoster E, Vanhaesebroeck B, Vandenabeele P et al. Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **270** (1995), 18473-18478.

Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Esparis-Ogando A et al. Extracellular Signal-regulated Kinase Phosphorylates Tumor Necrosis Factor alpha-converting Enzyme at Threonine 735: A Potential Role in Regulated Shedding. *Mol Biol Cell* **13** (2002), 2031-2044.

English WR, Puente XS, Freije JM et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem* **275** (2000), 14046-14055.

Entman ML, Youker KA, Frangogiannis N et al. Is inflammation good for the ischemic heart--perspectives beyond the ordinary. *Z Kardiol* **89 Suppl 9** (2000), IX/82-IX/87.

Eto K, Puzon-McLaughlin W, Sheppard D et al. RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J Biol Chem* **275** (2000), 34922-34930.

Fernandez M, Neffen H, Sanz ML et al. A study of the circadian rhythm in 3, 5 cAMP in bronchial asthma after administration of ketotifen. *Allergol Immunopathol (Madr)* **9** (1981), 405-410.

Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW et al. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* **148** (2000), 811-824.

Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **98** (1998), 699-710.

Frangogiannis NG, Smith CW, & Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **53** (2002), 31-47.

Freyholdt T, Massoudy P, Zahler S et al. Coronary artery bypass surgery: pump-function correlates inversely with cardiac release of proinflammatory cytokines. *J Cardiovasc Pharmacol* (2003), accepted for publication.

Frezzolini A, De Pita O, Cassano N et al. Evaluation of inflammatory parameters in physical urticarias and effects of an anti-inflammatory/antiallergic treatment. *Int J Dermatol* **41** (2002), 431-438.

Fu X, Kassim SY, Parks WC et al. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro- matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* **276** (2001), 41279-41287.

Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ et al. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res* **61** (1987), 757-760.

Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* **370** (1994), 555-557.

Gechtman Z, Alonso JL, Raab G et al. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem* **274** (1999), 28828-28835.

Gilles S, Zahler S, & Becker BF. Oxidative stress is essential for postischemic TNFalpha release of isolated rat hearts. *Pflügers Arch -Europ J Physiol* **441(Suppl)** (2001), R235

Glaser KB, Pease L, Li J et al. Enhancement of the surface expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) but not the p55 TNFalpha receptor in the THP-1 monocytic cell line by matrix metalloprotease inhibitors. *Biochem Pharmacol* **57** (1999), 291-302.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* **74** (1997), 111-122.

Grams F, Huber R, Kress LF et al. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett* **335** (1993), 76-80.

Guerin-Marchand C, Senechal H, Pelletier C et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impairs inflammatory mediator release from immunologically stimulated RBL-2H3 cells through a redox-sensitive, calcium-dependent mechanism. *Inflamm Res* **50** (2001), 341-349.

Harlow, E. and Lane, D. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Press, New York, (1988)

Haro H, Crawford HC, Fingleton B et al. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor- alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest* **105** (2000), 143-150.

- Hearse DJ. Stunning: a radical re-view. *Cardiovasc Drugs Ther* **5** (1991), 853-876.
- Hearse DJ & Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res* **26** (1992), 101-108.
- Hooper NM, Karran EH, & Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J* **321** ( Pt 2) (1997), 265-279.
- Jue DM, Sherry B, Luedke C et al. Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochemistry* **29** (1990), 8371-8377.
- Kaartinen M, Penttila A, & Kovanen PT. Mast cells in rupture-prone areas of human coronary atheromas produce and store TNF-alpha. *Circulation* **94** (1996), 2787-2792.
- Kassis S, Prabhakar U, & Lee JC. Inhibition of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) production by pyridinyl imidazole compounds is independent of cAMP elevating mechanisms. *Agents Actions* **39 Spec No** (1993), C64-C66.
- Kukreja RC & Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* **26** (1992), 641-655.
- Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A et al. Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res* **84** (1999), 392-400.
- Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G et al. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (2000), 5456-5461.
- Kyhse-Andersen J. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10** (1984), 203-209.

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

Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Separat-Abdruck aus dem Archiv für die ges. Physiologie* (Bd. 61) Verlag von Emil Strauss, Bonn (1895)

Latini R, Bianchi M, Correale E et al. Cytokines in acute myocardial infarction: selective increase in circulating tumor necrosis factor, its soluble receptor, and interleukin-1 receptor antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol* **23** (1994), 1-6.

Lefer DJ & Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* **109** (2000), 315-323.

Leipert B, Becker BF, & Gerlach E. Different endothelial mechanisms involved in coronary responses to known vasodilators. *Am J Physiol* **262** (1992), H1676-H1683.

Loechel F, Gilpin BJ, Engvall E et al. Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. *J Biol Chem* **273** (1998), 16993-16997.

Lucchesi BR, Werns SW, & Fantone JC. The role of the neutrophil and free radicals in ischemic myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* **21** (1989), 1241-1251.

Lum L, Reid MS, & Blobel CP. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J Biol Chem* **273** (1998), 26236-26247.

Lum L, Wong BR, Josien R et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)- converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* **274** (1999), 13613-13618.

Lunn CA, Fan X, Dalie B et al. Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. *FEBS Lett* **400** (1997), 333-335.

Massoudy P, Zahler S, Freyholdt T et al. Sodium nitroprusside in patients with compromised left ventricular function undergoing coronary bypass: reduction of cardiac proinflammatory substances. *J Thorac Cardiovasc Surg* **119** (2000), 566-574.

McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC, Jr. et al. Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* **370** (1994), 558-561.

Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* **274** (1998), R577-R595.

Miyanoshta A, Takahashi T, & Endou H. Inhibitory effect of cyclic AMP on phorbol ester-stimulated production of reactive oxygen metabolites in rat glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* **165** (1989), 519-525.

Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN et al. Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* **370** (1994), 218-220.

Moss ML, Jin SL, Milla ME et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* **385** (1997), 733-736.

Nakada-Tsukui K, Watanabe N, & Kobayashi Y. Regulation of the processing and release of tumor necrosis factor alpha in a human macrophage cell line. *J Leukoc Biol* **66** (1999), 968-973.

Nath D, Williamson NJ, Jarvis R et al. Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* **114** (2001), 1213-1220.

Neumann FJ, Ott I, Gawaz M et al. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* **92** (1995), 748-755.

Newman WH, Castresana MR, Webb JG et al. Isoproterenol inhibits transcription of cardiac cytokine genes induced by reactive oxygen intermediates. *Anesthesiology* **96** (2002), 947-954.

Newman WH, Castresana MR, Webb JG et al. Stimulation of beta-adrenergic receptors inhibits the release of tumor necrosis factor-alpha from the isolated rat heart. *Crit Care Med* **28** (2000), 3593-3598.

Newton RC, Solomon KA, Covington MB et al. Biology of TACE inhibition. *Ann Rheum Dis* **60 Suppl 3** (2001), iii25-iii32.

Ockenga J, Rohde F, Suttman U et al. Ketotifen in HIV-infected patients: effects on body weight and release of TNF-alpha. *Eur J Clin Pharmacol* **50** (1996), 167-170.

Oliff A, Defeo-Jones D, Boyer M et al. Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell* **50** (1987), 555-563.

Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS et al. Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** (1985), 6060-6064.

Peschon JJ, Slack JL, Reddy P et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282** (1998), 1281-1284.

Prabhakar U, Lipshutz D, Bartus JO et al. Characterization of cAMP-dependent inhibition of LPS-induced TNF alpha production by rolipram, a specific phosphodiesterase IV (PDE IV) inhibitor. *Int J Immunopharmacol* **16** (1994), 805-816.

Primakoff P & Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* **16** (2000), 83-87.

Queralt M, Brazis P, Merlos M et al. In vitro inhibitory effect of rupatadine on histamine and TNF-alpha release from dispersed canine skin mast cells and the human mast cell line HMC-1. *Inflamm Res* **49** (2000), 355-360.

Rachmilewitz D, Okon E, & Karmeli F. Sulphydryl blocker induced small intestinal inflammation in rats: a new model mimicking Crohn's disease. *Gut* **41** (1997), 358-365.

Reimer KA, Murry CE, & Richard VJ. The role of neutrophils and free radicals in the ischemic-reperfused heart: why the confusion and controversy? *J Mol Cell Cardiol* **21** (1989), 1225-1239.

Roghani M, Becherer JD, Moss ML et al. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* **274** (1999), 3531-3540.

Rovida E, Paccagnini A, Del Rosso M et al. TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J Immunol* **166** (2001), 1583-1589.

Sambrook, K., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Press, New York, (1989)

Schlondorff J, Becherer JD, & Blobel CP. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* **347 Pt 1** (2000), 131-138.

Sherry B, Jue DM, Zentella A et al. Characterization of high molecular weight glycosylated forms of murine tumor necrosis factor. *Biochem Biophys Res Commun* **173** (1990), 1072-1078.

Shirai T, Yamaguchi H, Ito H et al. Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* **313** (1985), 803-806.

Shurety W, Merino-Trigo A, Brown D et al. Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *J Interferon Cytokine Res* **20** (2000), 427-438.

Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* **104** (2001), 826-831.

Svendsen JH & Bjerrum PJ. Effects of exogenous oxygen derived free radicals on myocardial capillary permeability, vascular tone, and incidence of ventricular arrhythmias in the canine heart. *Cardiovasc Res* **26** (1992), 1181-1188.

Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J et al. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* **8** (1988), 466-472.

Tang P, Hung M-C, & Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* **35** (1996), 8216-8225.

Thomas PS, Pennington DW, Schreck RE et al. Authentic 17 kDa tumour necrosis factor alpha is synthesized and released by canine mast cells and up-regulated by stem cell factor. *Clin Exp Allergy* **26** (1996), 710-718.

Tortolani AJ, Powell SR, Misik V et al. Detection of alkoxyl and carbon-centered free radicals in coronary sinus blood from patients undergoing elective cardioplegia. *Free Radic Biol Med* **14** (1993), 421-426.

Van Wart HE & Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (1990), 5578-5582.

Vleeming W, van Rooij HH, Wemer J et al. Characterization and modulation of antigen-induced effects in isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **18** (1991), 556-565.

Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA et al. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (1991), 4220-4224.

Wan S, Arifi AA, Wan IY et al. Cytokine responses to myocardial revascularization on cardiopulmonary bypass: intermittent crossclamping versus blood cardioplegic arrest. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* **8** (2002), 12-17.

Wang AM, Creasey AA, Ladner MB et al. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* **228** (1985), 149-154.

Watanabe N, Nakada K, & Kobayashi Y. Processing and release of tumor necrosis factor alpha. *Eur J Biochem* **253** (1998), 576-582.

Weston MC & Peachell PT. Regulation of human mast cell and basophil function by cAMP. *Gen Pharmacol* **31** (1998), 715-719.

Wu S, Boyer CM, Whitaker RS et al. Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. *Cancer Research* **53** (1993), 1939-1944.

Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD et al. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* **92** (1993), 2303-2312.

Zhang Y, Jiang J, Black RA et al. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: the metalloprotease TACE/ADAM-17 is critical for (PMA-induced) GH receptor proteolysis and GHBP generation. *Endocrinology* **141** (2000), 4342-4348.

Zhang Z, Kolls JK, Oliver P et al. Activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide. *J Biol Chem* **275** (2000), 15839-15844.

Zhang Z, Oliver P, Lancaster JR, Jr. et al. Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *FASEB J* **15** (2001), 303-305.

Zhou M, Graham R, Russell G et al. MDC-9 (ADAM-9/Meltrin gamma) functions as an adhesion molecule by binding the alpha(v)beta(5) integrin. *Biochem Biophys Res Commun* **280** (2001), 574-580.

Zweier JL, Flaherty JT, & Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987), 1404-1407.

Zweier JL, Kuppusamy P, Williams R et al. Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J Biol Chem* **264** (1989), 18890-18895.

## VII. Publikationen

### Kongreßbeiträge (Abstracts):

Gilles S, Zahler S, & Becker BF. Oxidative stress is essential for postischemic TNF $\alpha$  release of isolated rat hearts. *Pflügers Arch* **441 (Suppl)** (2001), R235

Gilles S, Zahler S and Becker BF. Oxidative activation of TNF $\alpha$  convertase in ischemia and reperfusion of rat hearts. *Basic Res Cardiol* **96 (Suppl 1)** (2001), I/11

Becker BF, Gilles S, Hültner L, et al. Role of myocardial mast cells in release of TNF- $\alpha$  from hearts of rat and mouse after ischemia. *Pflügers Arch* **443 (Suppl)** (2002), S189

Gilles S, Zahler S, Reil JC, Sommerhoff CP, Welsch U, and Becker BF. Post-ischemic TNF $\alpha$  release of hearts due to oxidative activation of TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE) *Z Kardiol* **91 (Suppl 1)** (2002), I/130

Gilles S, Becker BF, Welsch U and Zahler S. Mast cells liberate TNF- $\alpha$  by selective degranulation in the reperfused heart. *Z Kardiol* **92 (Suppl 1)** (2003), I/95

### Originalarbeiten:

Becker BF, Gilles S, Sommerhoff CP and Zahler S. Application of Peptides Containing the Cleavage Sequence of Pro-TNF $\alpha$  in Assessing TACE Activity of Whole Cells. *Biol Chem* **383** (2002), 1821-1826

Becker BF, Gilles S, Gonscherowski V, Gabrijelcic-Geiger D et al. Assessing Experimental Models in Myocardial Injury: Lack of Activation of the Proteases TACE and Calpain in Brief Ischaemia and Reperfusion. *Heart, Lung & Circulation* (2003), im Druck

Gilles S, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, and Becker BF. Release of TNF- $\alpha$  During Myocardial Reperfusion Depends on Oxidative Stress and is Prevented by Mast Cell Stabilizers. *Cardiovasc Res* **60** (2003), 608-618

## VIII. Anhang

### VIII.1 Abkürzungen

ADAM	A disintegrin and metalloproteinase	FCS	Fetal Calf Serum
BSA	Bovine Serum Albumin	GSH	reduziertes Glutathion
CABG	Coronary Artery Bypass Grafting	HMC-1	Human Mast Cell-Line-1
cAMP	cyclic Adenosine Mono-Phosphate	IC <sub>50</sub>	die Konzentration eines Inhibitors, mit der halb-maximale Hemmung erfolgt
cDNA	complementary DNA	ICAM	Inter-cellular Adhesion Molecule
COS	fibroblastenartige Zelllinie; Ursprung: African green monkey kidney; transformiert mit einer (ORI <sup>-</sup> ) SV-40-Mutante	IgG	Immunglobulin G
COX	Cyclooxygenase	IL	Interleukin
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	I/R	Ischämie/Reperfusion
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie	kb	Kilobasen
FACS	Fluorescence-Activated Cell-Sorting	KHB	Krebs-Henseleit buffer
		LOX	Lipoxygenase
		LPS	Lipopolysaccharid
		MAO	Monoaminoxidase
		M-CSFR	Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor
		MMP	Matrix-Metalloproteinase

MPO	Myeloperoxidase	pro-TNF- $\alpha$	ungespaltener, membran- gebundener TNF- $\alpha$
mTNF- $\alpha$	membrangebundener TNF- $\alpha$	RGD	Arg-Gly-Asp
OKT3	Synonym für CD3, eine Komponente des T-Zell-Rezeptor- Komplexes	ROS	Reactive Oxygen Species
		SH-	Sulphydryl-
		SOD	Superoxid-Dismutase
		sTNF- $\alpha$	löslicher TNF- $\alpha$
PBS	Phosphate buffered saline	TACE	TNF- $\alpha$ -converting enzyme
PBL	Peripheral Blood Leucocyte	TAPI	TNF- $\alpha$ -protease Inhibitor
PBMC	Peripheral Blood Mono- nuclear Cell	THP-1	humane leukämische Monozyten-Zelllinie
		TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor- $\alpha$
PDE	Phosphodiesterase	TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
PKA	cAMP-abhängige Protein- Kinase (Protein-Kinase A)	TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
PKC	Calcium-abhängige Protein-Kinase (Protein- Kinase C)	TNFR	TNF-Receptor
		U	Einheit für Enzym- aktivität
$p_{\text{konst}}$	konstanter Perfusionsdruck	VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
PMA	Phorbol Myristate Acetate	$V_{\text{konst}}$	flußkonstante Perfusion
PMN	Polymorphonuclear Phagocyte (granulocyte)	XO	Xanthin-Oxidase
pro-TACE	TACE Proenzym (inklusive Prodomäne)		

## VIII.2 Sequenzen

### Nucleotidsequenz TNF- $\alpha$ cDNA (human):

Gene bank accession No. M10988

Literatur: Wang, Creasey et al., 1985

```

1  cacaccctga caagctgcca ggcaggttct cttcctctca catactgacc cacggctcca
61  ccctctctcc cctggaaagg acaccatgag cactgaaagc atgatccggg acgtggagct
121 ggccgaggag gcgctcccca agaagacagg ggggccccag ggctccaggc ggtgcttggt
181 cctcagcctc ttctccttcc tgatcgtggc aggggccacc acgctcttct gcctgctgca
241 ctttgaggatg atcggccccc agaggaaga gtccccagc gacctctctc taatcagccc
301 tctggcccag gcagtcagat catcttctcg aaccccgagt gacaagcctg tagcccatgt
361 tgtagcaaac cctcaagctg aggggcagct ccagtggtg aaccgcccgg ccaatgccct
421 cctggccaat ggcgtggagc tgagagataa ccagctgggtg gtgccatcag agggcctgta
481 cctcatctac tcccagggtc tcttcaaggg ccaaggctgc ccctccaccc atgtgctcct
541 cacccacacc atcagccgca tcgccgtctc ctaccagacc aaggtcaacc tctctctgca
601 catcaagagc ccctgccaga gggagacccc agagggggct gaggccaagc cctggtatga
661 gcccatctat ctgggagggg tcttccagct ggagaagggg gaccgactca gcgctgagat
721 caatcgcccc gactatctcg actttgccga gtctgggcag gtctactttg ggatcattgc
781 cctgtgagga ggacgaacat ccaaccttcc caaacgcctc ccctgcccc aatccctttat
841 taccctctcc ttcagacacc ctcaacctct tctggctcaa aaagagaatt gggggcttag
901 ggtcggaacc caagcttaga actttaagca acaagaccac cacttcgaaa cctgggattc
961 aggaatgtgt ggcctgcaca gtgaagtgtc ggcaaccact aagaattcaa actggggcct
1021 ccagaactca ctggggccta cagctttgat ccctgacatc tggaatctgg agaccagggg
1081 gcctttgggt ctggccagaa tgctgcagga cttgagaaga cctcacctag aaattgacac
1141 aagtggacct taggccttcc tctctccaga tgtttccaga cttccttgag acacggagcc
1201 cagccctccc catggagcca gctccctcta tttatgtttg cacttgatgat tatttattat
1261 ttatttatta tttatttatt tacagatgaa tgtatttatt tgggagaccg ggtatcctg
1321 ggggacccaa tgtaggagct gccttggctc agacatggtt tccgtgaaaa cggaggctga
1381 acaataggct gttcccatgt agccccctgg cctctgtgcc ttcttttgat tatgtttttt
1441 aaaatattat ctgattaagt tgtctaaaca atgctgattt ggtgaccaac tgtcactcat
1501 tgctgaggcc tctgctcccc agggagttgt gtctgtaatc ggccactat tcagtggcga
1561 gaaataaagg ttgcttagga aagaa

```

Aminosäuresequenz humaner Pro-TNF- $\alpha$ :

Gene bank accession No. AAA61198

(TACE spaltet zwischen Alanin und Valin innerhalb der fett gedruckten Konsensus-Sequenz)

```
1  mstesmirdv elaeaalpkk tggpqsrrc lflslfsfli vagattlfcl lhfgvigpqr
61  eesprdlsl splaqavrss srtpsdkpva hvvanpqaeg qlqwlrran allangvelr
121 dnqlvvpseg lyliysqvlf kgqgcpsthv llthtisria vsyqtkvnll saikspcgre
181 tpegaeakpw yepiylggvf qlekgdrlsa einrpdyldf aeqqvyfygi ial
```

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Stefanie Gilles  
Geburtsdatum: 12.11.1972 in München  
Familienstand: ledig  
Eltern: Robert Franz Gilles, Schriftsetzer und Bärbel Gilles-Weber, kaufmännische Angestellte

### Schulausbildung

1979 – 1982: Städtische Grundschule an der Farinellstraße  
1982 – 1983: Städtische Grundschule an der Haimhauserstraße  
1983 – 1992: Städtisches Willi-Graf-Gymnasium  
1992: Abschluß Abitur

### Studium

1992 – 1999: Studium der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München  
05/1994: Diplom-Vorprüfung  
04 – 07/1996: Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik; Projekt: Charakterisierung von morphologischen REMI-Mutanten in *Ustilage maydis*  
01 – 09/1999: Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik und Mikrobiologie im Fach Genetik; Thema: "Konstruktion und Anwendungen synthetischer Minimalpromotoren in *Ustilage maydis*"  
11/1999: Abschluß Diplom

### Berufliche Tätigkeit

1991/1992: Aushilfstätigkeit am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Abteilung Mikrobiologie  
seit 04/2000: Promotion am Institut für vegetative Physiologie der Ludwig-Maximilians-Universität bei Prof. Dr. B. F. Becker

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl für die Gelegenheit bedanken, an seinem Lehrstuhl promovieren zu können.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard F. Becker für die Bereitstellung eines interessanten, methodisch vielseitigen Projekts und für die ausgenommen engagierte Betreuung. Die ausgewogene Mischung aus fundierter Anleitung und Gelegenheit zum selbständigen Experimentieren sowie die angenehme Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe sorgten dafür, daß ich nicht nur viel, sondern das Viele auch meist in guter Stimmung lernen konnte. Ganz besonderer Dank gebührt ihm dafür, daß er es mir ermöglichte, die Doktorarbeit fertigzustellen, nachdem mein Sohn geboren war.

Herrn Dr. Stefan Zahler danke ich für die gute experimentelle Anleitung, für seine Bereitschaft zu kritischen Diskussionen und – in Momenten scheinbarer Ausweglosigkeit – nicht zuletzt für den einen oder anderen intellektuellen Anstoß, der "den Stein wieder ins Rollen brachte".

Meinen Kollegen aus dem "Herzlabor", Vera Gonscherowski und Jan Reil, danke ich für die nette gemeinsame Arbeitszeit und für ausgiebiges Bauchmuskeltraining, Johannes Zimmermann für gemeinsame Rauchpausen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Veronika Frei für ihre Hilfe beim Präparieren, die, wenn auch nicht mit Tränen, so doch manchmal mit jeder Menge Schweiß verbunden war. Auch Sabine D'Aviss, Dorothee Gössel, Britta Bscheider und Dora Kiesel waren mir oft eine unentbehrliche Hilfe und jederzeit um Rat ansprechbar.

Allen anderen Kollegen und Kolleginnen, die hier nicht gesondert erwähnt sind, gilt ebenfalls mein Dank für das angenehme Arbeitsklima.

Außerhalb des Labors danke ich den folgenden Mitarbeitern des Instituts für Klinische Biochemie der Poliklinik Innenstadt: Herrn Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff für die Bereitstellung der HMC-1 Zellen, Clara Hönecke für ihre Hilfe mit der Transfektion, Herrn Dr. Peter J. Nelson und Frau Dr. Roghieh Djafarzadeh für ihr großes Interesse und für die – hoffentlich fruchtbare – weitere Zusammenarbeit. Herrn Prof. Dr. Ulrich Welsch und Pia Unterberger vom Institut für Anatomie gilt mein Dank bezüglich der Histologie.

Das Plasmid pME18S-TNF- $\alpha$  wurde von W. H. Newman (Mercer University, Macon, GA, USA) zur Verfügung gestellt, rekombinantes TACE von Dr. Roy Black (Immunex, Seattle, USA) und Dr. Ulf Neumann (Novartis, Basel, Schweiz). Auch ihnen sei an dieser Stelle gedankt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des SFB469 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert. Daher gilt mein Dank auch dieser Einrichtung, insbesondere der Sprecherin des SFB469, Frau Prof. Dr. Marianne Jochum.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Wolf-Dietrich Moelter danken, der mir im letzten Drittel der Doktorarbeit einen gesunden, hübschen und intelligenten Sohn schenkte.