

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

**Untersuchungen zur Rolle der myokardialen Calpaine beim  
postischämischen Reperfusionsschaden und der Regulation der  
endothelialen Barrierefunktion**

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

vorgelegt von  
Vera Gonscherowski

aus  
München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. B. F. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Krombach  
Prof. Dr. W. Siess

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: .....

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2003

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.	<b>Die Enzymfamilie der Calpaine</b>	<b>1</b>
1.1.	<b>Struktur und Aufbau von <math>\mu</math>- und m-Calpain</b>	<b>2</b>
1.2.	<b>Mechanismus der Calpain-Aktivierung</b>	<b>4</b>
1.3.	<b>Endogene Calpain-Inhibitoren</b>	<b>5</b>
1.4.	<b>Physiologische und pathophysiologische Funktionen von <math>\mu</math>- und m-Calpain</b>	<b>6</b>
2.	<b>Die Problematik des Reperfusionsschadens</b>	<b>7</b>
2.1.	<b>Erscheinungsformen des Reperfusionsschadens</b>	<b>8</b>
	a) Der letale Reperfusionsschaden	8
	b) Die Beschleunigung der Nekrose	9
	c) Reperfusionsarrhythmien	9
	d) Die mikrovaskuläre Dysfunktion	9
	e) Das myokardiale „Stunning“	10
2.2.	<b>Mögliche Ursachen des Reperfusionsschadens</b>	<b>10</b>
2.2.1.	Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies beim Reperfusionsschaden	10
2.2.2.	Inflammatorische Prozesse während der Reperfusion	11
2.2.3.	Die Störung der $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei Ischämie/Reperfusion	11
3.	<b>Fragestellung und experimenteller Ansatz</b>	<b>12</b>
<b>B</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
1.	<b>Materialien</b>	<b>14</b>
1.1.	<b>Substanzen und Bezugsquellen</b>	<b>14</b>
1.2.	<b>Lösungen</b>	<b>16</b>
1.3.	<b>Tiere</b>	<b>19</b>
2.	<b>Methoden</b>	<b>20</b>
2.1.	<b>Untersuchungen am isolierten Langendorff-Herz</b>	<b>20</b>

---

2.1.1.	Isolierung von Meerschweinchenherzen	20
2.1.2.	Perfusionsprotokoll für Herzhomogenate und Aufarbeitung der Herzen	22
2.1.3.	Perfusionsprotokoll für Transsudatmessungen	23
<b>2.2.</b>	<b>Untersuchungen an humanen Endothelzellen</b>	<b>25</b>
2.2.1.	Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen	25
2.2.2.	Zellversuche mit Calpain-Inhibitor I und Gewinnung von Zelllysaten	25
	a) Untersuchung des Fodrin-Gehalts von Zelllysaten	25
	b) Untersuchung des Gehalts an Syk in der Membranfraktion von HUVEC	26
	c) Bestimmung der Rho-Aktivität von HUVEC	26
2.2.3.	Retraktionsstudien an HUVEC mittels Phasenkontrast	28
2.2.4.	Immunfluoreszenz-Untersuchungen an HUVEC	28
<b>2.3.</b>	<b>Analytische Methoden zur Untersuchung von Herzhomogenaten und Zelllysaten</b>	<b>29</b>
2.3.1.	Zymographie	29
2.3.2.	Gelelektrophorese und Western Blot	32
2.3.3.	Proteinbestimmung	32
<b>2.4.</b>	<b>Statistik</b>	<b>33</b>
<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
<b>1.</b>	<b>Bestimmung der Calpain-Aktivität in Kontroll- und postischämischen Herzen</b>	<b>34</b>
<b>1.1.</b>	<b>Direkte Beurteilung der Calpain-Aktivität mittels Zymographie</b>	<b>34</b>
1.1.1.	Etablierung der Methode	34
1.1.2.	Calpain-Aktivität in Kontroll- und postischämischen Herzen	35
<b>1.2.</b>	<b>Indirekte Beurteilung der Calpain-Aktivität durch Quantifizierung von Calpain-Substraten mittels Western Blot</b>	<b>37</b>
1.2.1.	Calpastatin-Gehalt von Kontroll- und postischämischen Herzen	37
1.2.2.	Troponin I-Gehalt von Kontroll- und postischämischen Herzen	39
1.2.3.	Fodrin-Gehalt von Kontroll- und postischämischen Herzen	40

---

<b>2.</b>	<b>Untersuchung des Einflusses von Calpain-Inhibitoren auf die koronarvaskuläre Permeabilität</b>	<b>41</b>
2.1.	Bestimmung der Transsudatmenge isolierter Herzen	41
2.2.	Bestimmung des Verhältnisses von Feucht- zu Trockengewicht der Herzen	43
2.3.	Messung des koronaren Perfusionsdrucks der Herzen	44
<b>3.</b>	<b>Untersuchung des Einflusses von Calpain-Inhibitoren auf HUVEC</b>	<b>46</b>
3.1.	Beurteilung der Wirkung von CPP auf die Morphologie von HUVEC	46
3.2.	Quantifizierung des Fodrin-Gehalts in HUVEC-Lysaten	48
3.3.	Lokalisation von Syk in HUVEC	49
3.3.1.	Immunfluoreszenzmikroskopie	49
3.3.2.	Bestimmung des Gehalts von Syk in HUVEC mittels Western Blot	49
3.4.	Lokalisation und Aktivität von Rho in HUVEC	51
3.4.1.	Immunfluoreszenzmikroskopie	51
3.4.2.	Rho-Aktivität in HUVEC	52
3.5.	Lokalisation von Rac1 in HUVEC mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	54
<b>D</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
<b>1.</b>	<b>Die Calpain-Aktivität nach Ischämie/Reperfusion am isoliert perfundierten Herzen</b>	<b>55</b>
1.1.	Die Zymographie als Methode zur quantitativen Bestimmung der Calpain-Aktivität	55
1.2.	Quantifizierung potentieller Calpain-Substrate in Kontroll- und postischämischen Herzen mittels Western Blot	57
<b>2.</b>	<b>Einfluß von Calpain-Inhibitoren auf die koronarvaskuläre Permeabilität</b>	<b>58</b>
<b>3.</b>	<b>Einfluß von Calpain-Inhibitoren auf HUVEC</b>	<b>61</b>
3.1.	Morphologische Veränderungen an HUVEC nach Calpain-Hemmung	61

---

<b>3.2.</b>	<b>Auswirkungen der Calpain-Hemmung auf Zytoskelett- und Signalmoleküle</b>	<b>62</b>
<b>4.</b>	<b>Spezifität und Permeabilität von Calpastatin-Peptid-Penetratin</b>	<b>66</b>
<b>5.</b>	<b>Einordnung der Ergebnisse in physiologische und patho-physiologische Zusammenhänge</b>	<b>67</b>
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
<b>F</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>72</b>
<b>G</b>	<b>Literatur</b>	<b>74</b>
<b>H</b>	<b>Danksagung</b>	<b>82</b>
<b>I</b>	<b>Aus der Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen</b>	<b>83</b>
<b>J</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>84</b>

## A. Einleitung

### 1. Die Enzymfamilie der Calpaine

1964 zum ersten Mal beschrieben (Guroff, 1964), umfaßt die Familie der Calpaine mittlerweile eine Vielzahl von Isoenzymen, die teils gewebespezifisch teils ubiquitär in Säugetieren vorkommen. Wie in Tabelle 1 dargestellt, konnten bei Mensch, Maus und Ratte bisher 12 verschiedene Proteine der großen und 2 verschiedene Proteine der kleinen Untereinheit mit den dazugehörigen Genen identifiziert werden (Huang and Wang, 2001). Die Calpaine sind jedoch auch in allen anderen Vertebraten und niederen Organismen, wie Insekten, Würmern, Pilzen und Hefen – hier zum Teil als atypische Calpain-Homologe - vertreten. Die Mitglieder dieser „Superfamilie“ haben eine homologe Protease-Domäne und bilden somit eine eigene evolutionäre Gruppe von Cysteinproteasen (Sorimachi H *et al.*, 1997).

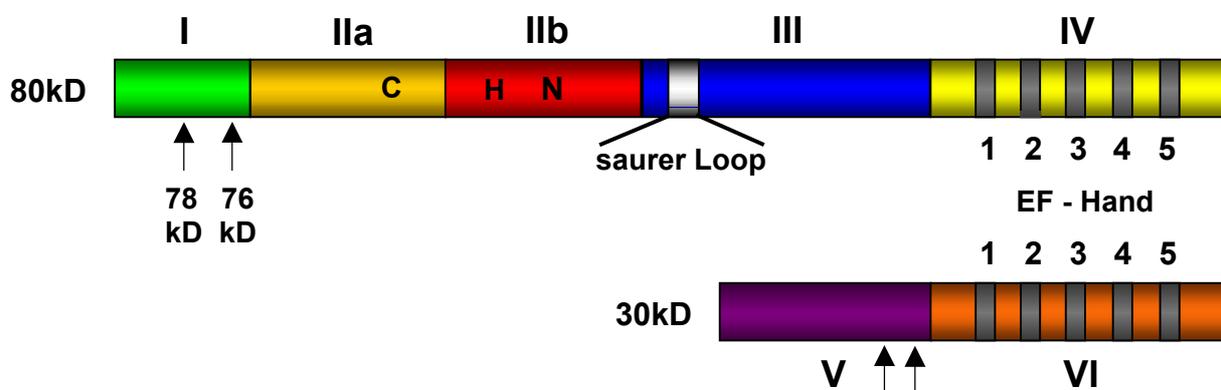
Den Namen *Calpaine* haben die im Cytosol lokalisierten und früher als neutrale,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Cysteinproteasen bezeichneten Enzyme schließlich durch ihre Calmodulin-ähnlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungseigenschaften und die Ähnlichkeit ihrer katalytischen Domäne mit der von Papain bekommen.

**Tabelle 1: Bereits beschriebene Calpaine aus Mensch, Maus und Ratte**  
(nach Huang and Wang, 2001)

Protein	Gen	C-term. EF-Hand	Gewebelokalisation
Calpain 1 ( $\mu$ )	capn 1	+	ubiquitär
Calpain 2 (m)	capn 2	+	ubiquitär
Calpain 3 (p94)	capn 3	+	Skelettmuskel, Linse, Retina
kl. Untereinheit 1	capn 4	+	ubiquitär (kl. UE von Calpain 1 und 2)
Calpain 5	capn 5	-	ubiquitär (v.a. Kolon, Dünndarm, Hoden)
Calpain 6	capn 6	-	Plazenta
Calpain 7	capn 7	-	ubiquitär
Calpain 8	capn 8	+	Magen, Mukosa
Calpain 9	capn 9	+	Verdauungstrakt
Calpain 10	capn 10	-	ubiquitär
Calpain 11	capn 11	+	Hoden
Calpain 12	capn 12	+	ubiquitär (v.a. Haarfollikel)
Calpain 13	capn 13	-	ubiquitär
kl. Untereinheit 2	capn 14	+	nicht untersucht

### 1.1. Struktur und Aufbau von $\mu$ - und m-Calpain

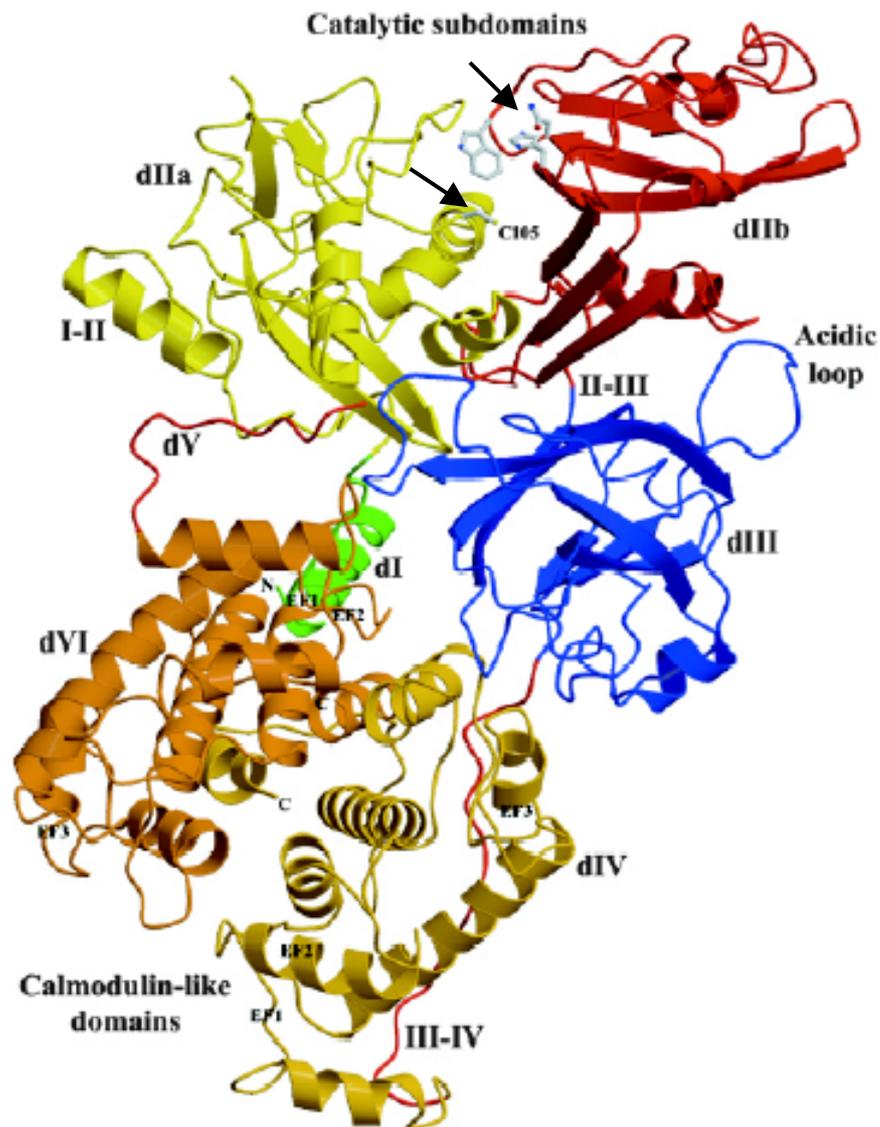
Die wohl am besten untersuchten Vertreter der Calpain-Familie sind  $\mu$ -Calpain (= Calpain 1) und m-Calpain (=Calpain 2). Abbildung 1 zeigt den Aufbau dieser ubiquitären Enzyme: Die große (80kD) Untereinheit von  $\mu$ - und m-Calpain weist eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz auf und lässt sich in 4 Domänen (I – IV) unterteilen, während die kleine (30kD) Untereinheit bei beiden Enzymen identisch ist und aus 2 Domänen (V/VI) besteht. In der N-terminalen Domäne I findet die autolytische Spaltung der großen Untereinheit in eine 78kD Zwischenstufe und ein 76kD Produkt statt. Domäne II setzt sich aus zwei Subdomänen (IIa/IIb) zusammen die sich bei Aktivierung der Protease durch  $\text{Ca}^{2+}$  aufeinander zubewegen und so das katalytische Zentrum bilden. Dieses ist aus 3 Aminosäuren (Cys, His, Asn) aufgebaut, wobei dem Cystein die größte Bedeutung bei der Katalyse zukommt. Domäne III zeigt einen ähnlichen Aufbau wie die C2 Domäne verschiedener Proteine (z.B. Proteinkinase C, Phospholipase C), für die eine Interaktion mit  $\text{Ca}^{2+}$  und Phospholipiden bekannt ist. Zudem befindet sich in Domäne III ein saurer Loop, der bei der Calpain-Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  eine Rolle spielen soll. Die zwei gut charakterisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Domänen IV und VI haben je 5 EF-Hand Motive und zeigen somit einen Calmodulin-ähnlichen Aufbau. Ihnen kommt eine wichtige Funktion bei der Dimerisierung der zwei Untereinheiten zu. Die Glycin-reiche Domäne V soll eine Rolle in der Interaktion des Enzyms mit Membranen spielen und ist gleichzeitig der Ort für die autolytische Spaltung der kleinen Untereinheit (Strobl *et al.*, 2000; Khorchid and Ikura, 2002; Arthur and Mykles, 2000).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der großen und kleinen Untereinheit von  $\mu$ - und m-Calpain**

Aminosäuren des katalytischen Zentrums: C = Cystein, H = Histidin, N = Asparagin,  $\uparrow$  Stellen einer autolytischen Spaltung

In Abbildung 2 ist die 3D-Struktur von  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem m-Calpain dargestellt. Der Spalt zwischen den Subdomänen IIa und IIb im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Milieu, der die „katalytische Triade“ aus Cys, His und Asn voneinander trennt, ist gut zu erkennen und verdeutlicht die Notwendigkeit der Enzymaktivierung, bevor proteolytische Aktivität stattfinden kann.



**Abb. 2: 3D-Struktur von  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem m-Calpain**

→ Aminosäuren des katalytischen Zentrums; grün = Domäne I, gelb = Subdomäne IIa, rot = Subdomäne IIb, blau = Domäne III, rot = Übergang von Domäne III → IV, gold = Domäne IV, rot = Domäne V, orange = Domäne VI; (modifiziert nach Reverter *et al.*, 2001)

## 1.2. Mechanismus der Calpain-Aktivierung

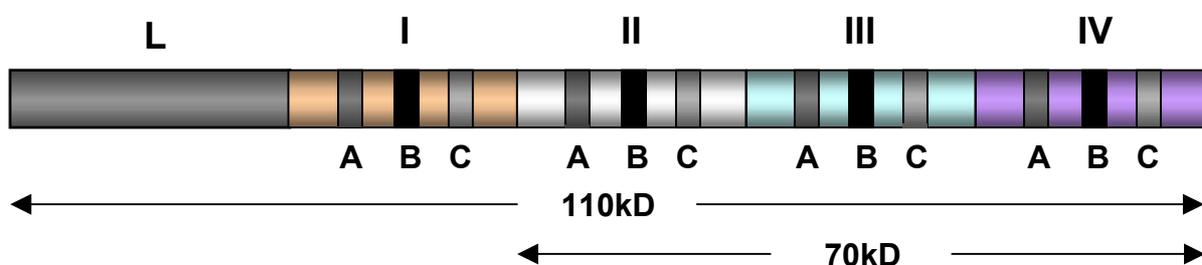
Basierend auf *in vitro* Versuchen wurde zunächst eine Aktivierung von  $\mu$ - und m-Calpain alleine durch hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel postuliert. Es stellte sich jedoch bald heraus, daß die hierbei benötigten Konzentrationen von 5-50 $\mu\text{M}$  für  $\mu$ -Calpain bzw. 200-1.000 $\mu\text{M}$  für m-Calpain unter physiologischen Bedingungen *in vivo* kaum bzw. gar nicht zu erreichen sind. Um die Aktivierung der Enzyme unter physiologischen Bedingungen dennoch erklären zu können, sind seitdem viele verschiedene, möglicherweise alternative oder auch sich ergänzende Aktivierungsmechanismen untersucht worden (Glading *et al.*, 2002; Khorchid and Ikura, 2002). Hierbei wurde unter anderem eine, die benötigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration senkende, Interaktion mit Phospholipiden über das in Domäne III befindliche C2-Motiv vorgeschlagen (Arthur and Crawford, 1996; Tompa *et al.*, 2001). Auch über sogenannte Calpain-Aktivatoren, die die Enzymaktivität durch Protein-Protein-Interaktionen modifizieren sollen, wurde berichtet (Melloni *et al.*, 1998; Melloni *et al.*, 2000). Ebenso denkbar erscheint die Regulation der Proteaseaktivität über den Phosphorylierungsgrad, wie sie von vielen anderen Enzymen bekannt ist (Shiraha *et al.*, 2002).

Trotz dieser Unklarheiten ist jedoch unbestritten, daß die Aktivierung von  $\mu$ - und m-Calpain durch  $\text{Ca}^{2+}$  ausgelöst wird (Moldoveanu *et al.*, 2002) und von einer Translokation der Enzyme an die Plasmamembran (Suzuki *et al.*, 1992) sowie der autolytischen Spaltung der großen Untereinheit begleitet ist (Baki *et al.*, 1996). Gezeigt ist ebenfalls, daß die Autolyseprodukte (78kD bzw. 76kD) von  $\mu$ - bzw. m-Calpain proteolytisch aktiv sind, hierfür deutlich niedrigere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen als das intakte Enzym (80kD) benötigen (Baki *et al.*, 1996) und einem weiteren Abbau mit folgender Inaktivierung leichter zugänglich sind (Suzuki *et al.*, 1992). Außerdem konnte bestätigt werden, daß weder die Dissoziation der Untereinheiten, noch die autolytische Spaltung der großen Untereinheit eine Voraussetzung für das Erlangen der Proteaseaktivität darstellen (Nakagawa *et al.*, 2001; Johnson and Guttman, 1997).

### 1.3. Endogene Calpain-Inhibitoren

Calpastatin ist der bedeutendste endogene Inhibitor der Calpaine (Abb. 3). Er ist ubiquitär lokalisiert, meist im Überschuß zu den Calpainen vorhanden und kommt als sehr spezifischer Inhibitor in zwei verschiedenen Formen vor. Im Gewebe findet man Calpastatin als ein elektrophoretisch bei 110kD laufendes Protein, das sich aus einer N-terminalen L-Domäne und 4 sich wiederholenden, inhibitorischen Domänen zusammensetzt. Die inhibitorischen Domänen bestehen jeweils aus etwa 140 Aminosäuren und jede kann ein Calpain-Molekül hemmen. Sie enthalten konservierte, in 3 Regionen (A, B, C) gehäuft auftretende Reste. Calpastatin aus Erythrozyten ist ein in der Elektrophorese bei 70kD erscheinendes Protein, dem die L-Domäne und die erste inhibitorische Domäne fehlen. Die konservierten, nahe des katalytischen Zentrums bindenden B-Regionen des Inhibitors sind essentiell für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Hemmung der Calpaine. Die konservierten Regionen A und C des Inhibitors binden jeweils an die Domänen IV und VI der Enzyme und verstärken so die Bindung von Region B (Takano *et al.*, 1988; Maki *et al.*, 1988; Kawasaki *et al.*, 1989; Ma *et al.*, 1994). Calpastatin gilt als Suizid-Substrat der Calpaine und Abbauprodukte bis 15kD weisen noch die Fähigkeit zur Calpain-Hemmung auf (Nakamura *et al.*, 1989). So ist ein 27 Aminosäuren langes Peptid aus der B-Region für eine effektive Hemmung von  $\mu$ -und m-Calpain in vitro ausreichend (Maki *et al.*, 1989).

Neben Calpastatin wurden noch für andere, endogene Proteine inhibitorische Eigenschaften gegenüber Calpainen gefunden. So konnte für die Domäne 2 aus humanem Kininogen eine Hemmwirkung auf Calpain nachgewiesen werden (Colman, 1996). Ebenso zeigte Gas2, ein wichtiges Protein bei der Apoptose, eine inhibitorische Wirkung auf m-Calpain (Benetti *et al.*, 2001).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des endogenen Calpain-Inhibitors Calpastatin**

In den 4 inhibitorischen Domänen sind die konservierten Regionen A, B und C eingezeichnet. In der Gelelektrophorese erscheint Gewebe-Calpastatin als 110kD Protein, während Calpastatin aus Erythrozyten eine Größe von 70kD aufweist.

#### 1.4. Physiologische und pathophysiologische Funktionen von $\mu$ - und m-Calpain

Die Zuordnung klarer, physiologischer Funktionen zu den Proteasen  $\mu$ - und m-Calpain ist bis heute nicht ganz gelungen. Die Gründe hierfür sind zum Teil in der noch immer nicht abgeschlossenen Aufklärung des Aktivierungsmechanismus, der großen Zahl an Substraten und der noch ungeklärten, physiologischen Regulation ihrer Enzymaktivität zu suchen. Dennoch konnten in letzter Zeit einige Hinweise auf die Beteiligung dieser Enzyme an bestimmten physiologischen Prozessen gewonnen werden.

Zu den Substraten von  $\mu$ - und m-Calpain zählen einerseits Zytoskelettproteine, wie z.B. Talin, Filamin, Fodrin oder die zytoplasmatische Domäne der  $\beta$ -Integrine (Du *et al.*, 1995; Fujitani *et al.*, 1997; Saido *et al.*, 1993), andererseits aber auch Signalkaskadenmoleküle, darunter Proteinphosphatasen und -kinasen, wie z.B. PTP-1B, PKC, FAK, Src oder Syk (Baldock *et al.*, 2000; Sato and Kawashima, 2001). Durch den „limitierten“ Abbau ihrer Substrate zu größeren Fragmenten, der teilweise zu deren Aktivierung teilweise aber auch zur Inaktivierung führt, sollen beide Calpaine eine wichtige Rolle bei vielen zellulären, den zytoskelettalen Umbau betreffenden Prozessen, z.B. während dem Zell-Spreading und der Zellmigration aber auch beim Integrin-Signalling, spielen (Bialkowska *et al.*, 2000; Schoenwaelder *et al.*, 2000; Glading *et al.*, 2002). Auch eine Beteiligung der Enzyme an Prozessen des Zellzyklus und der Apoptose wurde beschrieben (Abb. 4) (Sato and Kawashima, 2001; Carragher and Frame, 2002).

Neben dieser Aktivierung von  $\mu$ - und m-Calpain unter physiologischen Bedingungen wird auch eine Aktivierung der Enzyme bei pathologischen Prozessen, die mit einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einhergehen, wie z.B. Morbus Alzheimer und die zerebrale bzw. myokardiale Ischämie/Reperfusion, postuliert (Huang and Wang, 2001). Als mögliche Calpain-Substrate werden in diesem Zusammenhang u. a. Fodrin und kardiales Troponin I bzw. T diskutiert (Yoshida *et al.*, 1995; Di Lisa *et al.*, 1995).

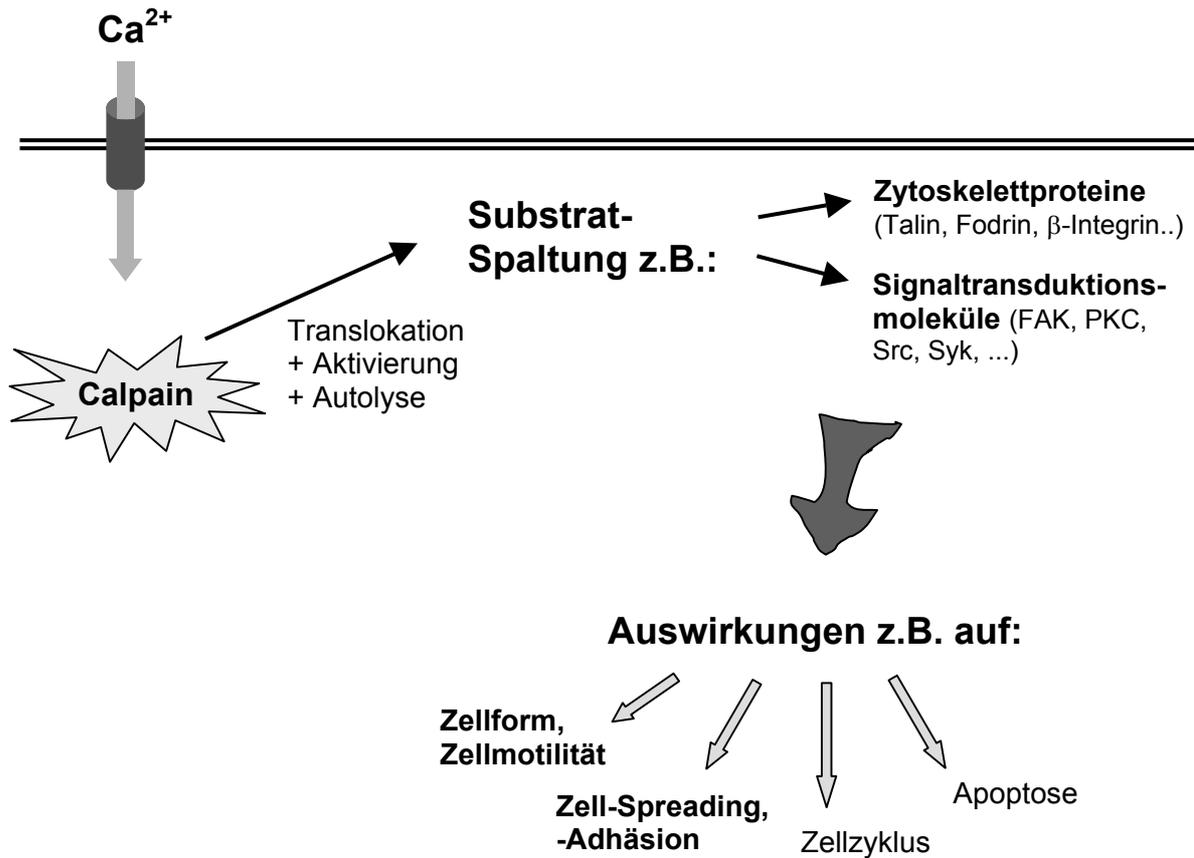


Abb. 4: Schematische Darstellung der Calpain-Aktivierung und -Aktivität unter physiologischen Bedingungen

## 2. Die Problematik des Reperfusionsschadens

Jede Ischämie führt zur Unterversorgung der Zellen mit Substraten und Sauerstoff sowie zum fehlenden Abtransport von Stoffwechselprodukten. Über kurz oder lang kommt es daher zur Energieverknappung, Gewebsazidose, Ansammlung toxischer Metabolite und schließlich zum Absterben der betroffenen Zellen. Jedoch nicht nur die Ischämie selbst löst zellschädigende Prozesse aus, sondern auch die während der Reperfusion ablaufenden Vorgänge können massive Funktionsbeeinträchtigungen am Organ nach sich ziehen.

Bereits im Jahr 1935 erkannte man (Tennant and Wiggers, 1935), daß es bei der Reperfusion ischämischer Herzen zu einer Veränderung der Herzmuskelkontraktion

kam. Es dauerte jedoch bis in die 70iger Jahre, bevor weitere Untersuchungen durchgeführt wurden, die die Aufklärung der daran beteiligten Mechanismen zum Ziel hatten. Seither sind Funktionseinschränkungen nach Ischämie/Reperfusion an einer Vielzahl von Organen beschrieben und mit einer Reihe von pathologischen Vorgängen in Verbindung gebracht worden (Skelettmuskel: Formigli *et al.*, 1992; Gehirn: Nelson *et al.*, 1992; Niere: Schneeberger *et al.*, 1989).

Besondere Bedeutung hat die Aufklärung der mit dem Reperfusionsschaden verbundenen Prozesse in der Kardiologie erlangt. Grund hierfür war die stetig wachsende Zahl therapeutischer Maßnahmen wie z.B. Angioplastie, Thrombolyse, koronare Bypass-Operationen aber auch Herztransplantationen, die die Zahl der mit Ischämie verbundenen Eingriffe am Herzen dramatisch steigen ließ.

Nach den unter Kardioplegie ablaufenden Operationen am Herzen kommt es jedoch bei der anschließenden Wiederdurchblutung nur zu einer bedingten Wiederherstellung der normalen Organfunktion. So treten unter anderem Arrhythmien, Ödeme, Hyperkontraktur, myokardiales „Stunning“ und teilweise ausgedehnte Nekrosen auf, die sich mit den bisherigen präventiven Maßnahmen nicht ganz verhindern lassen. Weiterführende Untersuchungen zur Entstehung und Eindämmung des Reperfusionsschadens sind deshalb unerlässlich. Dabei gestaltet sich die Abgrenzung zwischen ischämiebedingten und reperfusionsbedingten Schäden problematisch, da es keine Reperfusion ohne vorherige Ischämie gibt. Trotz der Schwierigkeiten in der Begriffsdefinition, konnten mit Hilfe experimenteller Methoden bisher fünf Erscheinungsformen des Reperfusionsschadens herausgearbeitet werden (Hearse, 1992; Fox, 1992).

## **2.1. Erscheinungsformen des Reperfusionsschadens**

### a) Der letale Reperfusionsschaden

Unter letalem Reperfusionsschaden versteht man das durch die Reperfusion verursachte Absterben von Zellen, die während der Ischämie noch „lebensfähig“ waren. Allerdings ist die Existenz dieser Form des Reperfusionsschadens sehr umstritten, da es bisher keine Studien gibt, die zeigen können, daß der Zelltod

tatsächlich aufgrund der Wiederdurchblutung eingetreten ist und nicht schon durch die Ischämie ausgelöst wurde (Hearse, 1992).

#### b) Die Beschleunigung der Nekrose

Als ein weiterer reperfusionsbedingter Schaden wurde die Beschleunigung der Nekrose postuliert. Im Gegensatz zum letalen Reperfusionsschaden findet hier jedoch keine weitere Zellschädigung in der Reperfusion statt, sondern es wird nur die Kinetik der Infarktausbreitung erhöht. Inwieweit dies jedoch die Funktion des Herzens beeinträchtigt und klinisch relevant ist, ist bis heute nicht geklärt (Hearse, 1992).

#### c) Reperfusionsarrhythmien

Zu Reperfusionsarrhythmien, wie z.B. ventrikulären Tachykardien, kommt es während der Reperfusion vor allem dann, wenn die vorausgegangene Ischämie nur kurz war. Diese Form des Reperfusionsschadens war früher eher bei experimentellen Modellen im Labor beobachtet worden als in klinischen Studien (Fox, 1992). Da die Ischämiephasen beim Menschen aufgrund der modernen therapeutischen Möglichkeiten jedoch mittlerweile ebenfalls wesentlich verkürzt werden können, gewinnt das Problem der Reperfusionsarrhythmien auch in der Klinik mehr und mehr an Bedeutung (Hearse, 1992; White, 1992).

#### d) Die mikrovaskuläre Dysfunktion

Reperfusionsbedingte Defekte auf mikrovaskulärer Ebene wurden in vielen verschiedenen Studien an Herzen beschrieben. Einerseits kommt es nach anfänglicher Hyperämie zur länger anhaltenden Abnahme der Durchblutung - bis hin zum „no-reflow“ in nekrotischem Gewebe - und zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes, andererseits ist das Gefäßsystem nicht mehr in der Lage auf vasodilatierende Substanzen adäquat zu reagieren (Kloner *et al.*, 1974; Bolli *et al.*, 1990; Duncan *et al.*, 1988). Auch eine erhöhte Gefäßpermeabilität mit gesteigerter Ödembildung konnte gezeigt werden (Dauber *et al.*, 1990). Als Auslöser dieser Funktionsveränderungen im mikrovaskulären Gefäßsystem, die unter anderem durch Anschwellen der Endothelzellen, Verminderung der endothelialen NO-Produktion und die Adhäsion von Plättchen und Leukozyten gekennzeichnet sind, werden vor

allem freie Sauerstoffradikale diskutiert (Jackson *et al.*, 1986; Fox, 1992; Becker *et al.*, 2000).

#### e) Das myokardiale „Stunning“

Die wohl am Besten untersuchte Form des Reperfusionsschadens ist das myokardiale „Stunning“. Es bezeichnet die Verminderung der Kontraktilität der Herzmuskelzellen, die während der Reperfusion auftritt und für Stunden oder Tage anhalten kann, jedoch voll reversibel und nicht auf ein Versorgungsdefizit des Myokards zurückzuführen ist. Obwohl die Zellen für  $\text{Ca}^{2+}$  desensibilisiert sind, kann die kontraktile Dysfunktion dennoch durch Gabe positiv inotroper Substanzen überspielt werden. Als Auslöser werden vor allem reaktive Sauerstoffspezies und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zellen diskutiert, die möglicherweise selbst oder durch Aktivierung von Proteasen zu einer Zerstörung des kontraktile Apparates oder des Zytoskeletts führen könnten (Hearse, 1992; Bolli and Marban, 1999).

Da schon kurze diagnostische Eingriffe oder Belastungstests bei Patienten mit KHK zu Kontraktionseinbußen führen können, ist dieser Erscheinungsform des Reperfusionsschadens im Hinblick auf seine Entstehung und mögliche Therapie besondere Bedeutung zu schenken.

## **2.2. Mögliche Ursachen des Reperfusionsschadens**

In vielen der zum Thema Ischämie/Reperfusion durchgeführten Studien zeigte sich, daß die beobachteten Reperfusionsschäden im Wesentlichen auf drei Ursachen zurückzuführen sind: 1) reaktive Sauerstoffspezies, 2) inflammatorische Prozesse und 3) eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zellen.

### **2.2.1. Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies beim Reperfusionsschaden**

Große Bedeutung bei der Entstehung des Reperfusionsschadens wird den reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. Hydroxylradikal, Superoxidradikal, Wasserstoffperoxid, hypochlorige Säure/Hypochlorit) beigemessen (Becker *et al.*, 1993; Hearse, 1992). Daß es tatsächlich zu einem dramatischen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies in den ersten Minuten der Reperfusion kommt, wurde schon in den 80iger Jahren in

---

Studien mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) gezeigt (Bolli *et al.*, 1989; Zweier *et al.*, 1987). Ein Zusammenhang zwischen der Entstehung des Reperfusionsschadens und den reaktiven Sauerstoffspezies konnte insofern hergestellt werden, als es erstens durch exogene Gabe Radikal-bildender Systeme gelingt, genau gleichartige Schäden am Herzen zu induzieren (Leipert *et al.*, 1992; Bolli, 1992) und zweitens der Einsatz von antioxidativen Maßnahmen in vielen Studien positive Effekte auf die Herzleistung zeigte (Becker *et al.*, 1993; Kukreja and Hess, 1992).

### **2.2.2. Inflammatorische Prozesse während der Reperfusion**

Auch inflammatorische Prozesse spielen bei der Entwicklung des Reperfusionsschadens eine Rolle. Verursacht werden diese vor allem durch eine während der Reperfusion der Herzen ausgelöste Komplementaktivierung (Pinckard *et al.*, 1975) und die Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten (PMN) an das Endothel (Kupatt *et al.*, 1996).

### **2.2.3. Die Störung der $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei Ischämie/Reperfusion**

Schon im Verlauf der Ischämie - und noch in viel stärkerem Maße während der Reperfusion - kommt es zu einem dramatischen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die hierbei ablaufenden Prozesse lassen sich grob wie folgt beschreiben (Piper *et al.*, 1996):

Der ATP-Mangel löst einerseits, durch die fehlende Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ - und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe, eine Überladung der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$ , andererseits durch anaerobe Glykolyse im Gewebe eine Azidose aus. Mit dem Einsetzen der Reperfusion werden extrazellulär angereicherte  $\text{H}^+$ -Ionen schnell ausgeschwemmt, so daß sich ein Protonen-Gradient vom Zellinneren ins umgebende Gewebe ergibt. Daraus resultiert ein Austausch der  $\text{H}^+$ -Ionen des Zellinneren gegen  $\text{Na}^+$ -Ionen von außen und somit ein weiterer Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Konzentration. Dieser wird zwar durch die mit der Reoxygenierung einsetzende Reaktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase des Sarkolemms eingedämmt, verursacht aber trotzdem eine Umkehr im Transport der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher des Sarkolemms, so daß  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle aufgenommen wird.

Der hierdurch erfolgende weitere drastische, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg kann aber, mangels ausreichender Speicherkapazität des Sarkoplasmatischen Retikulums, auch durch die reaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des SR nicht verhindert werden und führt zur Hyperkontraktur der Herzmuskelzellen und möglicherweise zum Teil auch zu den anderen, oben erläuterten Schäden am Herzen.

### 3. Fragestellung und experimenteller Ansatz

Aus den oben geschilderten Mechanismen der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Calpain-Aktivierung einerseits und der bei Ischämie/Reperfusion ablaufenden Prozesse, die mit einem dramatischen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einhergehen andererseits, ergaben sich folgende, im Rahmen dieser Arbeit zu klärende Fragen:

- (1) Kommt es bereits im Zuge einer 15 minütigen, normothermen Ischämie mit anschließender Reperfusion zu einer Aktivierung der Proteasen  $\mu$ - und m-Calpain?
- (2) Welche Substrate sind von einer eventuellen, pathologischen Calpain-Aktivierung im Herzen betroffen?
- (3) Lässt sich eine mögliche durch Ischämie/Reperfusion ausgelöste Calpain-Aktivierung durch Gabe von Calpain-Inhibitoren verhindern und wäre dies für die Herzen mit benefiziellen Effekten verbunden?
- (4) Sind die eventuell mit Calpain-Inhibitoren erreichbaren kardioprotektiven Effekte vergleichbar mit den durch Behandlung der Herzen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten erzielbaren Wirkungen?

Die Bearbeitung der dargelegten Fragestellungen erschien insbesondere notwendig, da in der Literatur über eine Aktivierung und signifikante proteolytische Aktivität von  $\mu$ - bzw. m-Calpain erst nach 20 minütiger, normothermer Ischämie und anschließender Reperfusion berichtet wurde (Yoshida *et al.*, 1995; Yoshida and Harada, 1997; Urthaler *et al.*, 1997), frühere Arbeiten in unserem Labor aber eine signifikante Einschränkung der Herzfunktion bereits nach einer 15 minütigen, normothermen Ischämie und folgender Reperfusion zeigten (Zahler *et al.*, 1999; Massoudy *et al.*, 1997; Massoudy *et al.*, 1999). Ebenso konnte in früheren Studien

---

unseres Labors durch Gabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten eine Verbesserung der Herzleistung in der postischämischen Reperfusion erzielt werden (Massoudy *et al.*, 1995; Becker and Möbert, 1999). Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Senkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung und einer möglichen Calpain-Aktivierung lag deshalb nahe und sollte hiermit überprüft werden.

Die Frage nach einer möglichen Calpain-Aktivierung durch Ischämie/Reperfusion sollte mit der Methode der Zymographie beantwortet werden, da dieses Verfahren eine gleichzeitige Bestimmung der Aktivitäten von  $\mu$ - und m-Calpain aus den Gesamthomogenaten der Herzen erlaubt. Die Quantifizierung verschiedener, aus der Literatur bekannter Calpain-Substrate in Kontroll- und postischämischen Herzen sollte eine Aktivierung der Proteasen zusätzlich untermauern und einen Hinweis auf den Ort eines schädigenden Einflusses geben. Vorrangig wurden hier die molekularen Marker Troponin I,  $\alpha$ -Fodrin, Syk, RhoA und Rac untersucht. Zur Hemmung einer möglichen Calpain-Aktivierung nach Ischämie/Reperfusion standen der bekannte Calpain-Inhibitor I (CI) sowie das Konjugat aus Calpastatin-Peptid und Penetratin (CPP) zur Verfügung. Letzteres hat sich als zellgängiger, sehr spezifischer Inhibitor von Calpain erwiesen. Für das Studium Ischämie/Reperfu-sions-relevanter Zusammenhänge dienten isoliert perfundierte Meerschweinchenherzen, ein in unserem Labor gut etabliertes, experimentelles Modell. Zur Abklärung möglicher, die mikrovaskuläre Funktion betreffender Fragen standen uns Kulturen humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) zur Verfügung.

## B. Material und Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1. Substanzen und Bezugsquellen

##### Antikörper:

μ-Calpain	(MAb 9A4H8D3) Alexis; Grünberg; Dtl.
μ-Calpain	(MAb 3104, für Immunfluoreszenz) Chemicon; Hofheim; Dtl.
Calpastatin	(MAb 1F7E3D10) Alexis; Grünberg; Dtl. bzw. von Dr. D. Gabrijelcic-Geiger (Institut f. Klin. Biochemie, LMU München, Dtl.)
Troponin I	(MAb 1691) Chemicon; Hofheim; Dtl.
Fodrin	(MAb 1622) Chemicon; Hofheim; Dtl. bzw. von Dr. D. Gabrijelcic-Geiger (Institut f. Klin. Biochemie, LMU München, Dtl.)
Syk	(MAb 4D10, mouse) Santa Cruz Biotechn. Inc.; Heidelberg; Dtl.
Rac1	(rabbit polycl. C-11) Santa Cruz Biotechn. Inc.; Heidelberg; Dtl.
RhoA	(goat polycl. Sc-179-G; Immunfluoreszenz) SCBI; Heidelberg; Dtl.
Anti-rabbit	(goat, Peroxidasekonjugat) Calbiochem-Novab.; Schwalbach; Dtl.
Anti-mouse	(goat, Peroxidasekonjugat) Calbiochem-Novab.; Schwalbach; Dtl.
Anti-mouse	(goat/rabbit, Alexa Fluor 488, IgG, 2mg/ml, für Immunfluoreszenz) Molecular Probes Europe BV; Leiden; Niederlande
Anti-rabbit	(goat, Alexa Fluor 546, IgG, 2mg/ml, für Immunfluoreszenz) Molecular Probes Europe BV; Leiden; Niederlande
Anti-goat	(donkey, Alexa Fluor 546, IgG, 2mg/ml, für Immunfluoreszenz) Molecular Probes Europe BV; Leiden; Niederlande

##### Substanzen:

Casein	(Na-Salz) Sigma-Aldrich; Taufkirchen; Dtl.
Calpain-Inhibitor I	(=ALLN) Calbiochem-Novab.; Schwalbach; Dtl.
Calpastatin-Peptid	(27aa Peptid) Calbiochem-Novab.; Schwalbach; Dtl.
Calpastatin-Peptid-Penetratin	Prof. L. Moroder (MPI f. Biochemie; Martinsried; Dtl.)
μ-Calpain	(aus hum. Erythrozyten) Calbiochem-Novab.; Schwalbach; Dtl.

---

m-Calpain	(Ratte, rekomb. aus E. coli) Calbiochem-Novab.; Schwalbach; Dtl.
Acrylamid30%/Bisacryl.0,8%	(37,5:1) Roth; Karlsruhe; Dtl.
Phalloidin	MoBiTec; Göttingen; Dtl.
Collagen	Biochrom; Berlin; Dtl.
Medium 199	Sigma-Aldrich; Taufkirchen; Dtl.
Collagenase A	Roche Diagnostics; Mannheim; Dtl.
Endothelial cell growth medium	Promocell; Heidelberg; Dtl.
New Born Calf Serum	Biochrom; Berlin; Dtl.
Pferdeserum	Biochrom; Berlin; Dtl.
Penicillin-Streptomycin-Lsg.	(stabilisiert; 10Units Penicillin/ml; 10mg Streptomycin/ml) Sigma-Aldrich; Taufkirchen; Dtl.
Insulin	(28,1USP units/mg) Sigma-Aldrich; Taufkirchen; Dtl.
Pyruvat	(Na-Salz) ICN Biomedicals; Eschwege; Dtl.
DTT	Appllichem; Darmstadt; Dtl.
Complete®Mini	(Protease Inhibitor-Cocktail) Roche Diagnostics; Mannheim; Dtl.
BCA-Prot.-Assay Reagent A+B	(Pierce) KMF Laborchemie; St. Augustin; Dtl.
Super Signal® West Femto	(für Rho-WB; Pierce) KMF Laborchemie; St. Augustin; Dtl.
Hyperfilm MP (18x24cm)	Amersham; Freiburg; Dtl.
Hybond ECL (Nitrocellulose)	Amersham; Freiburg; Dtl.
Hybond-P (PVDF)	Amersham; Freiburg; Dtl.
Rho-Aktivitätsassay-Kit	(Upstate) Biomol; Hamburg; Dtl.
Mounting Medium	MoBiTec; Göttingen; Dtl.
TRAP	(H-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH <sub>2</sub> ) BACHEM Biochemica GmbH; Heidelberg; Dtl.

Alle anderen Chemikalien (Salze für Puffer, etc.) stammten von Merck (Darmstadt; Dtl.), Sigma (Taufkirchen; Dtl.) oder Appllichem (Darmstadt; Dtl.).

## 1.2. Lösungen

### **Tyrode-Lösung:**

NaCl (137mM), KCl (2,6mM), CaCl<sub>2</sub> (1,0mM), Tris (1,0mM), Glucose (0,1%).

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

### **modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (Perfusat):**

NaCl (116mM), NaHCO<sub>3</sub> (23mM), KCl (3,6mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,16mM), CaCl<sub>2</sub> (1,2mM), MgSO<sub>4</sub> (0,58mM), Glucose (5,4mM), Pyruvat (0,3mM), Insulin (2,8U/l).

Der pH-Wert betrug  $7,40 \pm 0,05$  bei 38°C und wurde durch Begasung mit einem Gemisch von 94,4% O<sub>2</sub> und 5,6% CO<sub>2</sub> eingestellt. Das Gasgemisch wurde mittels einer Gasmischpumpe (H. Wösthoff oHG, Bochum, Dtl.) konstant eingestellt.

### **HEPES-Puffer (Zellversuche):**

NaCl (125mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,25mM), KCl (3mM), CaCl<sub>2</sub> (2,5mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), Glucose (10mM), HEPES (10mM).

Der pH-Wert betrug 7,4.

### **PBS<sup>(-)</sup> (Zellkultur):**

NaCl (137mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8mM), KCl (2,7mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,47mM).

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

### **PBS<sup>(+)</sup> (Zellversuche):**

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

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

### **Puffer für Herzhomogenate:**

*Zymographie (1/2/3/4), Calpastatin WB (1/2), Fodrin WB (2/3/4/5), TroponinI WB (4)*

1. Tris (20mM), EDTA (5mM), EGTA (5mM), DTT (1mM), AEBSF (0,25mM), Pepstatin (14,6µM)
2. Tris (10mM), EGTA (1mM), DTT (1mM), Sucrose (0,32M), AEBSF (0,25mM), Pepstatin (0,15µM), Leupeptin (20µM)

3. Tris (10mM), EDTA (2,5mM), EGTA (2,5mM), DTT (1mM), Sucrose (0,32M), AEBSF (0,25mM), Pepstatin (0,15µM), Leupeptin (20µM)
4. Tris (20mM), EDTA (5mM), EGTA (5mM), DTT (1mM), Sucrose (0,32M), AEBSF (0,25mM), Pepstatin (4,4µM)
5. Tris (20mM), EDTA (5mM), EGTA (5mM), DTT (1mM), Sucrose (0,32M), AEBSF (0,25mM), Pepstatin (4,4µM), Leupeptin (20µM)

Für die Resuspension der Pellets wurden die gleichen Puffer verwendet, allerdings mit Triton-x-100 (1%) versetzt (2/3/5) bzw. ohne Sucrose, aber mit SDS (2%) eingesetzt (4).

Der pH-Wert der Lösungen wurde auf 7,4 bei 4°C eingestellt.

**Lysispuffer für Fodrin Western Blot (HUVEC):**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20mM), Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (40mM), EDTA (1mM), AEBSF (1mM), Leupeptin (2,1µM), Pepstatin (1,5µM), NaF (50mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1mM), Triton-x-100 (1%).

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

**Lysispuffer für Syk Western Blot (HUVEC):**

HEPES (20mM), KCl (10mM), NaCl (10mM), MgCl<sub>2</sub> (5mM), DTT (1mM), Complete®Mini Inhibitor-Cocktail (1 Tablette/10ml).

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

**Lysispuffer für Rho Aktivitäts-Assay (HUVEC):**

HEPES (25mM), NaCl (150mM), MgCl<sub>2</sub> (10mM), EDTA (1mM), Igepal (1%), Glycerol (10%), Aprotinin (10µg/ml), Leupeptin (10µg/ml).

Der pH-Wert der Lösung betrug 7,5.

**Laufpuffer (Zymographie):**

Tris (25mM), Glycin (192mM), EDTA (2mM), DTT (1mM); pH 8,3

**Auftragungspuffer 2x (Zymographie):**

Tris (150mM), Glycerol (20%), Mercaptoethanol (2mM), Bromphenolblau (0,004%); pH 6,8

**Aktivierungspuffer (Zymographie):**

Tris (20mM), DTT (10mM), CaCl<sub>2</sub> (6mM für 200ml; 8mM für 10ml)

Negativkontrolle:

Tris (20mM), DTT (10mM), EGTA (1mM)

Hemmung mit Calpastatin Peptid:

Tris (20mM), DTT (10mM), CaCl<sub>2</sub> (8mM), Calpastatin Peptid (2µM)

Der pH-Wert betrug jeweils 7,4.

**Polyacrylamidgel für die Zymographie:**

Trenngel: 10% PA mit 0,2% Casein-Na, ohne SDS, pH 8,8

Sammelgel: 4% PA ohne SDS, pH 6,8

**Fixierlösung (Zymographie):**

Ethanol (30% v/v), Essigsäure (10% v/v)

**Färbelösung (Zymographie):**

Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,5%), Ethanol (30% v/v), Essigsäure (10% v/v)

**Entfärbelösung (Zymographie):**

Essigsäure (10% v/v)

**Laufpuffer (WB):**

Tris (25mM), Glycin (192mM), SDS (0,1%); pH 8,3

**Auftragungspuffer 4x (WB):**

Tris (0,250M), SDS (8%), Glycerol (40%), Bromphenolblau (0,02%), Mercaptoethanol (400mM); pH 6,8

**Transferpuffer (WB; Nitrocellulose):**

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

**Transferpuffer (WB; PVDF):**

Tris (25mM), Glycin (192mM), SDS (0,1%), Methanol (20% v/v); pH 8,3

**Blockierlösungen (WB):**

Blocking-Puffer (Calpastatin, Troponin I)

Tris (50mM), NaCl (200mM), BSA (3%), Tween20 (0,05%), Pferdeserum (10%);  
pH 7,5

Trockenmilch

Trockenmilch 2% ( $\alpha$ -Fodrin/Syk) bzw. 3% (Rho) in PBS<sup>(+)</sup>; pH 7,4

**Waschpuffer mit und ohne Tween20 (WB):**

Tris (50mM), NaCl (150mM),  $\pm$  Tween20 (0,3%); pH 7,5

**Chemilumineszenzlösungen (WB):**

(Calpastatin, Troponin I, Fodrin, Syk)

I. Tris (100mM), Luminol (2,5mM), Cumarinsäure (0,4mM); pH 8,5

II. Tris (100mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,5%) ; pH 8,5

Vor Verwendung wurden die Lösungen 1:1 gemischt.

**Polyacrylamidgele für WB:**

Trenngel:  $\alpha$ -Fodrin (6,5% PA), Calpastatin (10% PA), Troponin I/Rho (12% PA)  
SDS (0,1%); pH 8,8

Sammelgel: PA (4%), SDS (0,1%); pH 6,8

**Amidoschwarzlösung:**

Amidoschwarz 10B (0,5%), Methanol (50% v/v), Eisessig (10% v/v)

**Entfärbelösung nach Amidoschwarz:**

Isopropanol (20% v/v), Eisessig (7% v/v), Glycerol (3% v/v)

**1.3. Tiere**

Die Herzen für die Versuche am isolierten Präparat wurden etwa 180-300g schweren männlichen Meerschweinchen entnommen. Alle Versuchstiere wurden von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen; Dtl.) bezogen. Sie waren nicht medikamentös vorbehandelt, erhielten eine Standard-Diät und hatten freien Zugang zu Wasser.

## **2. Methoden**

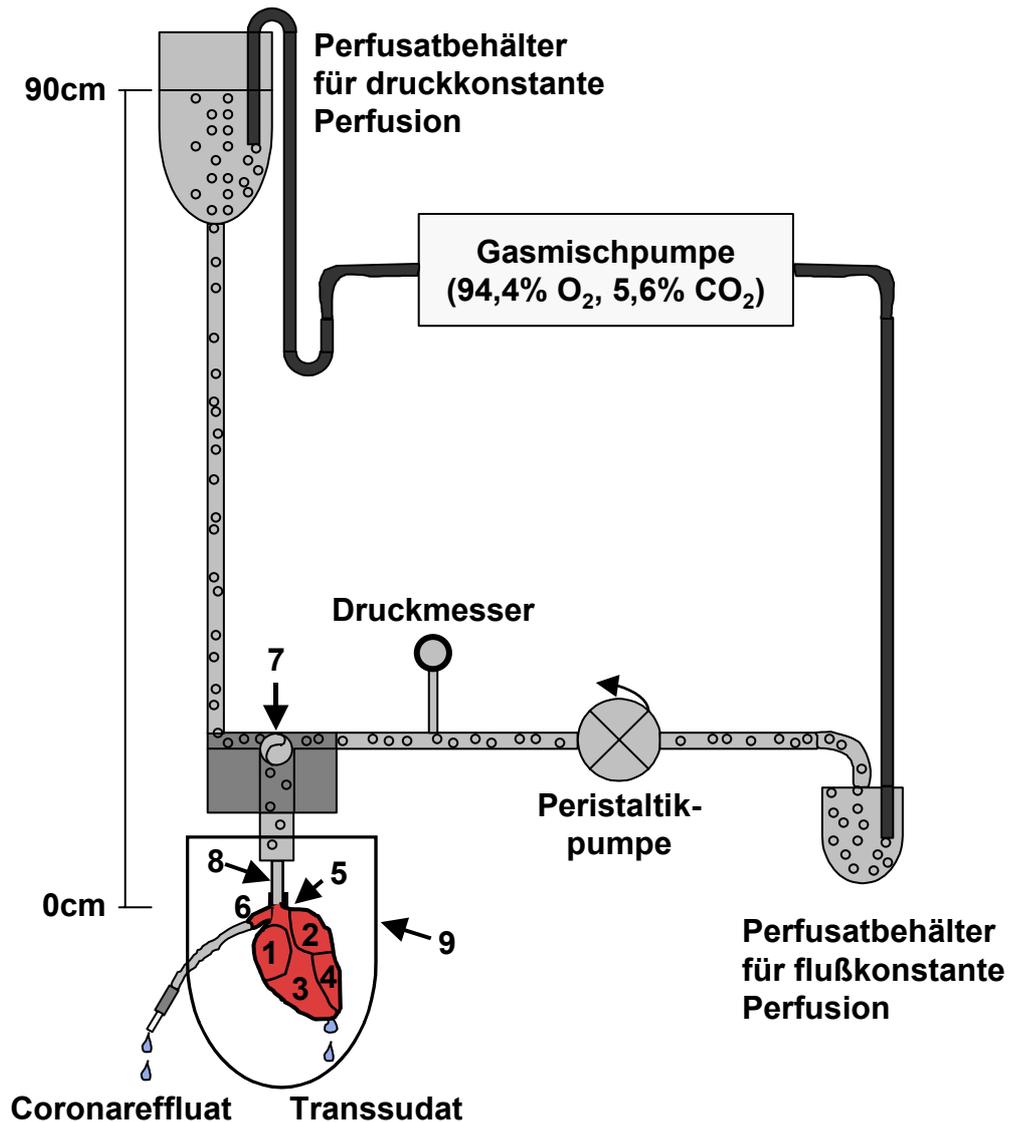
### **2.1. Untersuchungen am isolierten Langendorff-Herz**

#### **2.1.1. Isolierung von Meerschweinchenherzen**

Die Tiere wurden durch Genickschlag mit einem speziellen Instrument (Feder-Bolzen) getötet und sofort durch Anschneiden der Karotiden teilweise entblutet. Anschließend wurde der Thorax vom Sternum aus eröffnet, großräumig abgetrennt und das Herz durch Entfernung der Lungen und des Perikards - unter Kühlung mit eiskalter, isotoner NaCl-Lösung - freipräpariert. Die Aorta wurde angeschnitten und direkt oberhalb des Herzens mit einer Stahlkanüle, die über einen Schlauch mit der Perfusionsapparatur verbunden war kanüliert, wodurch das Herz mit sauerstoffreichem Perfusat versorgt wurde. Bei der „retrograden“ Perfusion des Herzens nach Langendorff fließt das Perfusat von der Aorta orthograd über die Koronararterien in die Koronarvenen und wird anschließend über den Sinus coronarius dem rechten Vorhof zugeführt.

Nach Durchtrennung von Pulmonalarterie, oberer und unterer Hohlvene sowie Abtrennung von der Verbindung zur Lunge, wurde das Herz unter ständiger Perfusion an der Langendorff-Apparatur befestigt (Abb. 5). Das Abbinden der Vena azygos, der oberen und unteren Hohlvenen sowie der Pulmonalvenen und die Kanülierung der Pulmonalarterie mit einer weiteren Stahlkanüle ermöglichten es, den Koronarfluß mittels eines Flußmessers (T206, Transonic Systems; Altron Medical Electronics; Fürstfeldbruck; Dtl.) zu bestimmen. Hiervon getrennt ließ sich die Transsudatmenge, d. h. Lymphe und interstitielle Flüssigkeit, die von der Herzspitze abtropfte erfassen. Um eine konstante Temperatur von 38°C zu gewährleisten, wurde das Herz von einem warmen Gefäß umschlossen, das während einer Ischämiephase zusätzlich mit 38°C warmer Tyrode-Lösung befüllt wurde. Die Perfusatemperatur wurde mit einem Pumpthermostaten (Colora Meßtechnik; Lorch; Württemberg; Dtl.) konstant bei 38°C gehalten. Die Perfusion des Herzens erfolgte druck- (90cmH<sub>2</sub>O) oder volumenkonstant (5ml/min), wobei die volumenkonstante Perfusion durch eine Peristaltikpumpe (MS-Reglo; Ismatec SA; Glattbrugg-Zürich; Schweiz) angetrieben wurde. Hierzu konnte der Perfusatzufluß mit einem Dreiwegehahn umgestellt werden. Bei volumenkonstanter Perfusion wurde zusätzlich

mit einem Druckmesser (MLT1050, ADInstruments Ltd, Grove House, Hastings, UK) der Perfusionsdruck bestimmt. Zur Infusion eines Calpain-Inhibitors wurde eine Infusionsnadel in den Schlauch der Aortenkanüle eingeführt und die Lösung über einen Perfusor (Precidor 5003; Infors AG; Basel; Schweiz) mit konstanter Geschwindigkeit appliziert.



**Abb. 5: Kardiale Perfusionsapparatur**

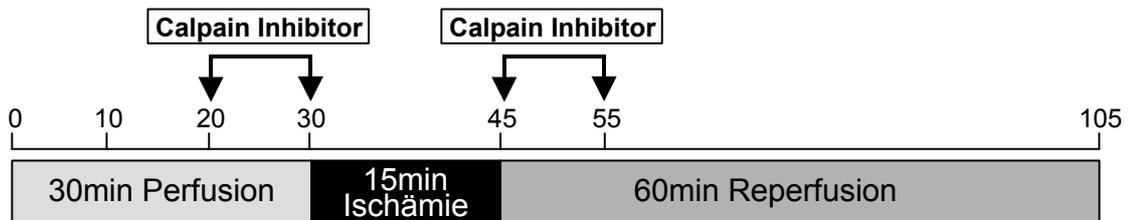
1 linkes Atrium, 2 rechtes Atrium, 3 linker Ventrikel, 4 rechter Ventrikel, 5 Aortenstumpf mit Kanüle, 6 Pulmonalarterie mit Kanüle und Flußmesser, 7 Dreiwegehahn zum Umschalten von druckkonstanter auf volumenkonstante Perfusion, 8 Einstichstelle für Infusionsnadel, 9 thermostatisiertes Gefäß

### 2.1.2. Perfusionsprotokoll für Herzhomogenate und Aufarbeitung der Herzen

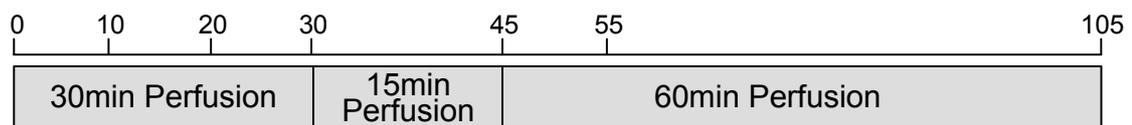
Für die spätere Untersuchung der Herzhomogenate mittels Zymographie bzw. Western Blot ( Calpastatin, Troponin I,  $\alpha$ -Fodrin) wurden die Herzen druckkonstant perfundiert. Zur Bestimmung des Einflusses von Calpain-Inhibitor I auf den Fodrin-Gehalt postischämischer Herzen wurde eine volumenkonstante Perfusion gewählt. Die Versuchsprotokolle sind in Abbildung 6 dargestellt. Nach 30 minütiger Perfusion der Herzen wurde durch Aufhebung der Perfusatzufuhr für 15 Minuten eine globale Ischämie erzeugt, währenddessen die Herzen in Puffer (Tyrode-Lösung) bei 38°C gebadet wurden. An die Ischämie schloß sich eine 60 minütige Reperfusion an. Kontrollherzen wurden dagegen für weitere 75 Minuten konstant perfundiert, jedoch ebenfalls für 15 Minuten in Tyrode-Lösung gebadet. Die Infusion von Calpain-Inhibitor I (12 $\mu$ M in 0,1% DMSO) erfolgte über je 10 Minuten vor und nach Ischämie. Im Anschluß an den Versuch wurde, nach Entfernung der Vorhöfe, das Feuchtgewicht der Ventrikel bestimmt und die Herzen entweder sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und aufbewahrt, bevor sie im Mörser und Glashomogenisator homogenisiert wurden oder gleich in 6ml Puffer (B.1.2.) mittels Ultra-Turrax (Janke&Kunkel KG, IKA-Werk; Staufen i. Breisgau; Dtl.) und Glashomogenisator homogenisiert. Anschließend wurde das Gewebehomogenat bei 600 bzw. 1.000xg 10 Minuten lang zentrifugiert (Labofuge 400R; Heraeus; Hanau; Dtl.), wobei sich Zellkerne und Myofibrillen absetzten. Durch darauffolgende Zentrifugation des Überstands bei 100.000xg für 1 Stunde (Optima LE-80K Ultrazentrifuge; Beckmann Coulter; München; Dtl.) erhielt man ein zweites Pellet – die Membranfraktion – und als Überstand die zytosolische Fraktion. Die Pellets wurden daraufhin in 0,5-2ml des entsprechenden Homogenisierungspuffers, der als Zusatz 1% Triton-x-100 bzw. 2% SDS enthielt (B.1.2.), mit einem Glashomogenisator und 30 Sekunden Ultraschall resuspendiert, 45 Minuten auf Eis gestellt und nach Abzentrifugieren des unlöslichen Anteils (4°C, 12.000xg, 15min; Zentrifuge: Typ A14; Societé Jouan; St. Herblain; Frankreich) aliquotiert und zusammen mit der zytosolischen Fraktion in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C. Bei Resuspension der Pellets in Puffer mit 2% SDS, wurden diese vor dem Abzentrifugieren des unlöslichen Anteils außerdem für ca. 10 Minuten bei 80°C erhitzt. Aus der zytosolischen Fraktion (100.000xg Überstand) wurde die Calpain-Aktivität mittels Zymographie sowie die Calpastatin-Menge mittels Western Blot bestimmt. Der

Fodrin-Gehalt des Myokards wurde im Western Blot aus der Membranfraktion (100.000xg Pellet), der Troponin I-Gehalt aus der Zellkern und Myofibrillen enthaltenden Fraktion (600/1.000xg Pellet) ermittelt.

#### Ischämie:



#### Kontrolle:

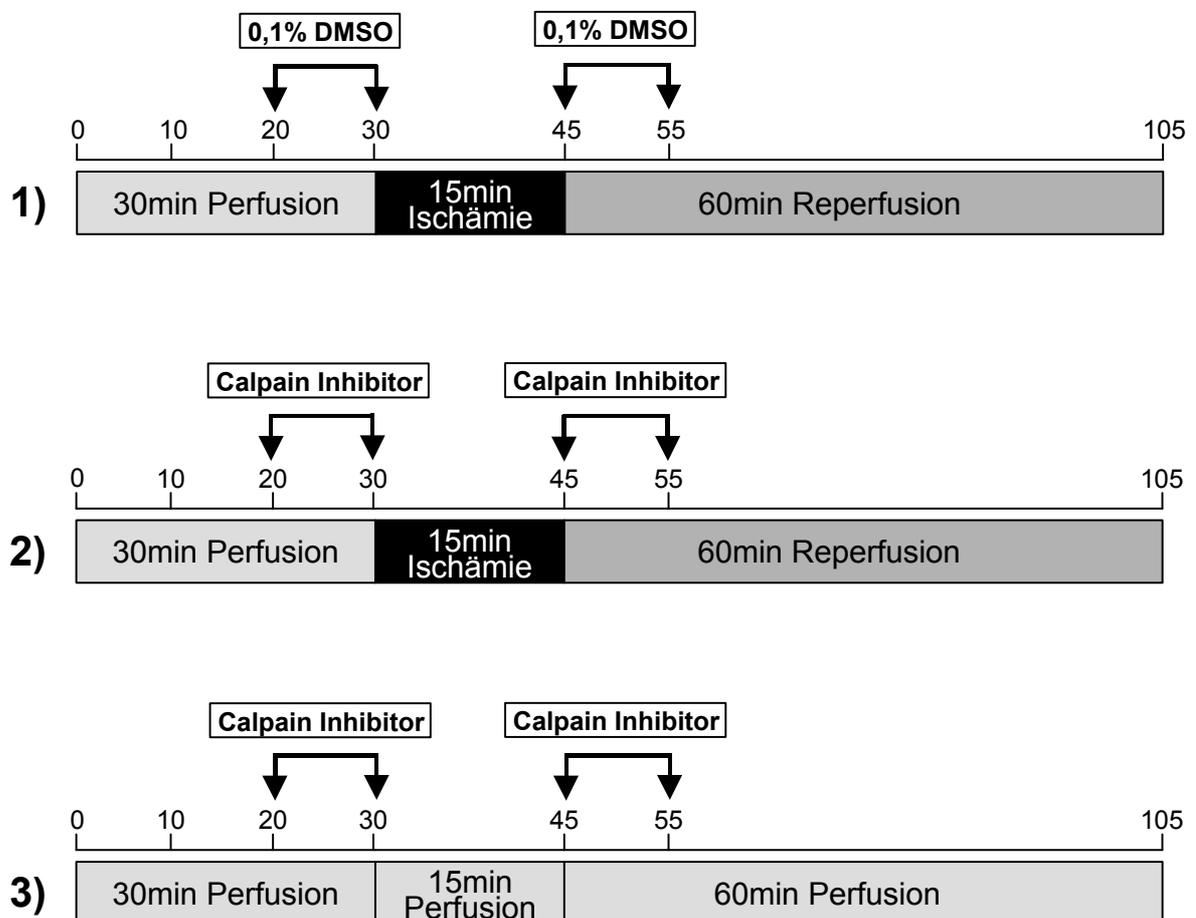


**Abb. 6: Perfusionsprotokolle für Gewebeextraktion**

#### 2.1.3. Perfusionsprotokoll für Transsudatmessungen

Um die Wirkungen einer Calpain-Hemmung auf die koronarvaskuläre Leckbildung zu untersuchen, wurden die Herzen volumenkonstant perfundiert. Nach 30 minütiger Perfusion folgte eine 15 minütige globale Ischämie, gefolgt von 60 Minuten Reperfusion. Kontrollherzen wurden für weitere 75 Minuten perfundiert und entsprechend 15 Minuten in Tyrode-Lösung gebadet. Als Calpain-Inhibitoren kamen Calpain-Inhibitor I (CI), Calpastatin-Peptid-Penetratin (CPP) und Calpastatin-Peptid (CP) zum Einsatz. Die Herzen wurden in drei Gruppen eingeteilt: 1) *Ischämie ohne Inhibitor* (Infusion von 0,1% DMSO als Lösungsmittelkontrolle für CI); 2) *Ischämie mit Inhibitor* (CI 12µM, CPP 0,5µM, CP 1,5-3µM); 3) *Kontrollen (ohne Ischämie) mit Inhibitor* (CI 12µM, CPP 0,5µM). Die Infusion des Lösungsmittels bzw. der Inhibitoren erfolgte 10 Minuten lang sowohl vor als auch nach Ischämie bzw. 15 minütiger

Zwischenperfusion (Abb. 7). Während des gesamten Versuchs wurde der Perfusionsdruck aufgezeichnet. Die Abnahme des Transsudats von der Herzspitze erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten des Protokolls (15., 25., 27., 45., 47., 50., 60., 70., 80., 90., 100. Minute) und zwar jeweils für eine Minute. Die gesammelte Menge wurde anschließend durch Wiegen bestimmt. Nach dem Versuch wurde das Feuchtgewicht und nach der Trocknung bis zur Gewichtskonstanz das Trockengewicht der Ventrikel ermittelt.



**Abb. 7: Perfusionsprotokolle für Transsudatbestimmung**

1) Ischämie ohne Inhibitor, aber mit Vehikel DMSO, 2) Ischämie mit Inhibitor, 3) Kontrollen (ohne Ischämie) mit Inhibitor

---

## 2.2. Untersuchungen an humanen Endothelzellen

### 2.2.1. Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen

Für die Zellversuche wurden humane Endothelzellen aus der Umbilicalvene (HUVEC) frischer Nabelschnüre gewonnen, kultiviert und von der 1. - 3. Passage verwendet. Zur Isolation der Zellen wurde die Nabelschnurvene kanüliert und mit PBS<sup>(+)</sup> (mit Penicillin/Streptomycin-Lösung 1:100) beidseitig durchspült. Collagenase A (0,1%) in PBS<sup>(-)</sup> löste während der 6 minütigen Inkubation der Nabelschnur in einem Bad aus isotoner Kochsalzlösung bei 37°C die Endothelzellen von der extrazellulären Matrix ab, so daß die Zellen anschließend mit Medium 199 aus der Vene herausgespült werden konnten. Nach Zentrifugation (280xg, 10min; Labofuge 400R; Heraeus; Hanau; Dtl.), Entfernung des Überstands und Zugabe von 5ml Endothelial Cell Growth Medium wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (Gewebekulturflaschen 50ml Falcon; Becton Dickinson Labware & Company; Franklin Lake; NJ; USA) bis zur Konfluenz kultiviert. Diese Primärkultur wurde dann nach Bedarf 1-3 mal geteilt (1:2 oder 1:3) und die Zellen in 10cm Gewebekulturschalen (Falcon; Becton Dickinson) in einer Mischung aus 50% Endothelial Cell Growth Medium und 50% Medium 199 (mit 20% NBCS und Penicillin/Streptomycin-Lösung 1:500) für die Versuche konfluent wachsen gelassen.

### 2.2.2. Zellversuche mit Calpain-Inhibitor I und Gewinnung von Zelllysaten

#### a) Untersuchung des Fodrin-Gehalts von Zelllysaten

Für die Bestimmung des Fodrin-Gehalts mittels Western Blot wurden HUVEC wie oben beschrieben in 10cm Gewebekulturschalen auf Plastik oder Collagen beschichteten Glasplatten kultiviert. Konfluente Zellen wurden mit Medium 199 (1% NBCS, Penicillin/Streptomycin-Lsg. 1:500) oder HEPES-Puffer gewaschen und nach Zugabe von Lösungsmittel (0,1%DMSO) oder Calpain-Inhibitor I (12µM) für 1-1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Citratpuffer (Na-Citrat 15mM, KCl 135mM) mit einem Gummischaber von ihrer Unterlage abgelöst und nach Abzentrifugieren und Entfernung des Puffers sofort in Lysispuffer (B.1.2.) durch wiederholtes Aufziehen in einer Spritze (29G) lysiert. Die Lysate wurden für 45

Minuten auf Eis stehen gelassen und anschließend für 2,5 Stunden bei 12.000xg unter Kühlung zentrifugiert (Typ A14; Societé Jouan; St. Herblain; Frankreich). Nach Zusatz von 0,5% SDS wurde der Überstand 5min bei 100°C gekocht und bei -20°C weggefroren. Der Proteingehalt der Proben wurde direkt vor der Gelelektrophorese bestimmt.

#### b) Untersuchung des Gehalts an Syk in der Membranfraktion von HUVEC

Die Zellen wurden wie oben beschrieben in 10cm Gewebekulturschalen auf Plastik bis zur Konfluenz kultiviert, für den Versuch zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen und nach Zusatz von Calpain-Inhibitor I (48µM) oder Lösungsmittel (DMSO 0,4%) für 1 Stunde inkubiert. Nach Entfernung des Puffers wurden die Zellen sofort in eiskaltem Lysispuffer (B.1.2.) mit einem Gummischaber abgelöst und durch wiederholtes Aufziehen in einer Spritze (29G) lysiert. Große Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugieren (4°C, 1.000xg, 10min; Typ A14; s.o.) entfernt. Aus dem Überstand wurde der Proteingehalt bestimmt und anschließend wurden gleiche Proteinmengen der zu vergleichenden Proben für die Isolation der Membranfraktion durch Zentrifugation bei 4°C, 100.000xg für 1,5 Stunden eingesetzt (Optima Max-E Ultrazentrifuge; Beckmann Coulter; München; Dtl.). Das Pellet (=Membranfraktion) wurde mit Auftragungspuffer versetzt, für 20 Minuten im Ultraschallbad solubilisiert und 10 Minuten lang bei 100°C gekocht. Im Anschluß daran wurden die Proben mittels Western Blot auf ihren Gehalt an Syk untersucht. Lysat aus humanen Thrombozyten diente hierbei als Positivkontrolle für Syk.

#### c) Bestimmung der Rho-Aktivität von HUVEC

Die Bestimmung der Rho-Aktivität von HUVEC, die mit Lösungsmittel oder Calpain-Inhibitor I behandelt wurden erfolgte mit einem „Pull-down-Assay“. Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, daß Rho-GTPasen *aktiv* (an GTP gekoppelt) oder *inaktiv* (an GDP gekoppelt) vorliegen können. Bei der Aktivierung dieser Proteine kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP und daraufhin zu einer Konformationsänderung des Proteins, durch die die Bindung an ein Substratprotein ermöglicht wird. Dies bedeutet, daß nur die aktive Form des Rho-Proteins an sein

Substrat bindet. Beim „Pull-down-Assay“ ist Substrat an Glutathion-S-Transferase (GST) gebunden, welche mit dem an Agarose-Beads gekoppelten Glutathion eine Enzym-Substrat-Bindung eingeht. Durch Abzentrifugieren der Beads und Entfernen des Überstands konnte so der aktive Anteil des gesuchten Rho-Proteins in einer Probe aufkonzentriert und anschließend im Western Blot quantifiziert werden. Auf einem zweiten Blot wurden gleiche Mengen Totallysat jeder Probe auf ihren „Gesamt-Rho-Gehalt“ (aktiv und inaktiv) untersucht. Die quantitative Auswertung der Banden erfolgte videodensitometrisch (Gel Doc 1000, Molecular Analyst Software, Bio-Rad, München, Dtl.). Hierbei wurde – für den Vergleich der Rho-Aktivität in den Proben - der aktive, an Rhotekin gebundene Anteil von Rho auf den Gesamtgehalt an Rho im Totallysat normalisiert.

Um die in HUVEC-Lysaten maximal mögliche Rho-Aktivität ermitteln zu können, wurde Rho in Kontrolllysaten (DMSO 0,4%) mit GDP (Negativkontrolle) bzw. dem durch die intrinsische Rho-GTPase nicht spaltbaren  $GTP\gamma S$  (Positivkontrolle) beladen. Hierzu wurden die Zelllysate mit einem Überschuß an EDTA versetzt und mit GDP oder  $GTP\gamma S$  inkubiert (30°C, 30min). Gestoppt wurde die Reaktion mit einem Überschuß an  $MgCl_2$ , welches die intrinsische GTPase-Aktivität des Rho-Proteins hemmt. Die so mit GDP-Rho und  $GTP\gamma S$ -Rho beladenen Zelllysate wurden anschließend mit den anderen Proben mit Rhotekin-GST inkubiert und im Western Blot analysiert.

Um Rho-Gesamt mengen und –Aktivitäten zu untersuchen, wurden HUVEC wie oben beschrieben auf Plastik bis zur Konfluenz kultiviert, zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen und nach Zugabe von Calpain-Inhibitor I (48µM) oder Lösungsmittel (DMSO 0,4%) für 2, 10, 30 und 60 Minuten inkubiert. Der Puffer wurde abgesaugt und die Zellen sofort in eiskaltem Lysispuffer (B.1.2.) mit einem Gummischaber abgelöst, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Nach dem Auftauen (auf Eis!) wurden die Zelllysate zur Entfernung von Zelltrümmern bei 4°C und ~10.000xg für 5 Minuten zentrifugiert (Typ A14; s.o.). Zur Quantifizierung der Gesamtmenge des Rho-Proteins in jeder Probe mittels Western Blot wurden 30µl Totallysat abgenommen. Zu gleichen Mengen Lysat wurden 30µl an Agarose gebundenes Substratprotein (Rhotekin-GST) hinzugefügt. Die Proben wurden daraufhin für 45 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert, kurz abzentrifugiert (4°C, ~10.000xg, 30sek; Typ A14; s.o.) und 3x mit 500µl Lysispuffer gewaschen. Nach

dem letzten Waschschrift wurden 40µl Lysispuffer, 20µl Auftragungspuffer und 2µl DTT (1M) zugegeben und die Proben, vor dem Auftragen auf das Gel, für 5 Minuten bei 100°C gekocht.

### **2.2.3. Retraktionsstudien an HUVEC mittels Phasenkontrast**

Die direkten Wirkungen eines Calpain-Inhibitors auf die Morphologie konfluenter Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene wurden im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben in 3,5cm Gewebekulturschalen (Falcon; Becton Dickinson) auf Plastik kultiviert. Konfluente Zellen wurden einmal mit HEPES-Puffer gewaschen, für 10 Minuten in diesem Puffer inkubiert und anschließend auf die geheizte Platte (37°C) eines Mikroskops (Axiovert 100, Zeiss, Dtl.) gestellt. Zu einigen Schalen wurde direkt vor Beginn der Messungen 1µM CPP gegeben. Dann wurde 15 Minuten lang alle 10 Sekunden ein Bild im Phasenkontrast aufgenommen, zur Auswertung in vier Quadranten aufgeteilt und der mittlere Helligkeitswert der vier Flächen pro Aufnahme berechnet (TILL Vision Software, TILL Photonics, Lochham, Dtl.). Bei Änderung der Zellmorphologie durch Zurückziehen und Abrundung der Zellen bildete sich im Phasenkontrast ein heller Ring entlang der Zellränder, so daß sich die mittlere Helligkeit des Bildes erhöhte. Ein Maß für die Differenz zwischen Kontrollzellen und Inhibitor-behandelten Zellen ergab sich durch Subtraktion der mittleren Bildhelligkeiten am Endpunkt der Meßreihe (900. Sekunde).

### **2.2.4. Immunfluoreszenz-Untersuchungen an HUVEC**

Für die Immunfluoreszenz wurden HUVEC in 24-well Schalen (Falcon; Becton Dickinson) auf 10mm Deckgläschen ausgesäht und für 2-3 Stunden anheften gelassen. Die Zellen wurden 1-2 mal mit HEPES-Puffer gewaschen und nach Zusatz von Calpain-Inhibitoren (CI 12µM; CPP 1µM) oder Lösungsmittel (DMSO 0,1% als Lösungsmittelkontrolle für CI) für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen mit 3,7% Formalin für 10 Minuten fixiert, mit 0,1% Triton-x-100 für 3 Minuten permeabilisiert und mit 1% BSA für 30 Minuten geblockt. Die Aktin-Färbung erfolgte mit Phalloidin (markiert mit Alexa Fluor 633; 165nM)/1% BSA für 20 Minuten

unter Lichtausschluß. Für die Zweit-Färbung auf  $\mu$ -Calpain, Syk, Rac1 und RhoA wurde der erste Antikörper (1:200 in 1% BSA) 45 Minuten, der an den jeweiligen Farbstoff (s. Material) gekoppelte zweite Antikörper (1:400 in 1% BSA) 30 Minuten im Dunkeln auf den Zellen belassen. Alle Substanzen wurden in PBS<sup>(+)</sup> gelöst bzw. verdünnt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde jeweils 3x mit PBS<sup>(+)</sup> gewaschen. Nach der Färbung wurden die Deckgläser mit der Oberseite auf einen Objektträger, auf dem sich ein Tropfen „Mounting Medium“ befand gelegt, antrocknen gelassen und anschließend im konfokalen Mikroskop (LSM 410 invert; Zeiss; Jena; Dtl.) ausgewertet.

### **2.3. Analytische Methoden zur Untersuchung von Herzhomogenaten und Zelllysaten**

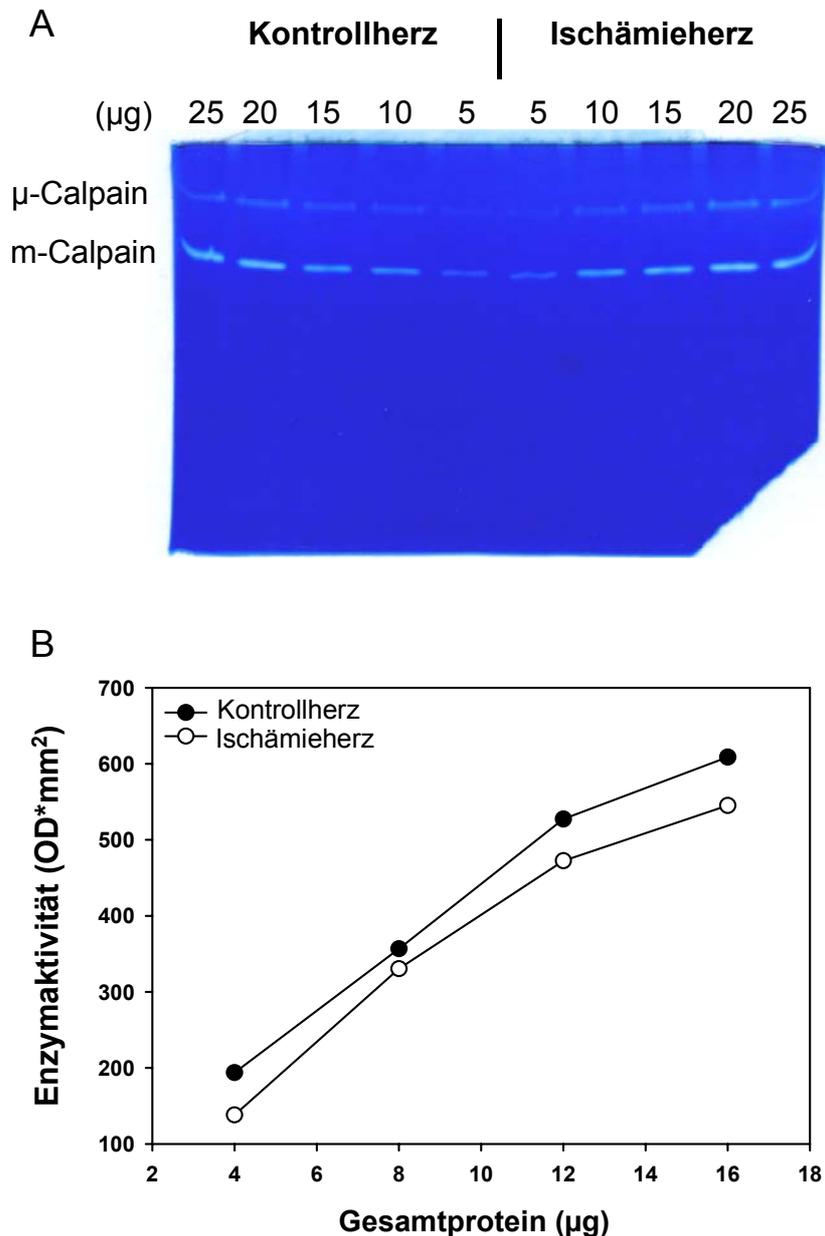
#### **2.3.1. Zymographie**

Die Zymographie ist ein Verfahren, das die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen einer Probe mit einem Enzymaktivitätsassay kombiniert. So ist es möglich die Aktivität eines speziellen Enzyms aus einem Zelllysate oder Gewebeextrakt spezifisch zu bestimmen. Hierzu wird die Probe zuerst elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel, in das ein Substratprotein mit hohem Molekulargewicht (z.B. Casein, Gelatine) eingegossen ist, unter denaturierenden bzw. nicht denaturierenden Bedingungen (d.h. mit bzw. ohne SDS) aufgetrennt. Nicht denaturierende Bedingungen erfordern genaue Kenntnis des Laufverhaltens des entsprechenden Proteins im elektrischen Feld unter den gewählten Laufbedingungen (pH des Laufpuffers, etc.). Nach der Proteintrennung wird eventuell vorhandenes SDS aus dem Gel gewaschen und dieses anschließend in dem für das jeweilige Enzym optimalen Aktivierungspuffer inkubiert. Nach Fixierung und Coomassiefärbung zeigen sich in dem ansonsten blauen Gel nach dem Entfärben an Stellen enzymatischer Aktivität durchsichtige Banden. Aktives Enzym hat hier das große Proteinsubstrat zu kleinen Stücken verdaut, die dann aus dem Gel gewaschen wurden. Im Gegensatz zum restlichen Gel findet hier also keine Blaufärbung von Protein statt.

Im Falle von Calpain kann mittels Zymographie nur noch nicht-autolytisch aktiviertes Enzym aus einer Probe bestimmt werden, d.h. nur die 80kD Form. Die bereits aktivierten 78kD und 76kD Formen sind zu instabil, um sie mit diesem Verfahren zu erfassen (Arthur and Mykles, 2000). Die Bestimmung der nach möglicher Aktivierung in einer Probe (Gewebeextrakt, Zellysat) verbleibenden - noch nicht-autolytisch aktivierten - Calpainmenge (80kD) wurde nach der Methode von Raser *et al.* (Raser *et al.*, 1995) in einem nicht denaturierenden Gel mit 0,2% Casein und unter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschluß (EDTA im Laufpuffer) durchgeführt. Im Anschluß an die Elektrophorese (unter Kühlung!) wurde das Gel für 3x15min und über Nacht in je 200ml Aktivierungspuffer, der DTT zum Schutz der SH-Gruppe und  $\text{Ca}^{2+}$  für die Enzymaktivierung enthielt, inkubiert. Kontrollversuche zur einwandfreien Identifizierung der  $\mu$ -/m-Calpain-Banden wurden mit  $\text{Ca}^{2+}$  freiem bzw. Calpastatin-Peptid enthaltendem Aktivierungspuffer (je 10ml/Inkubationsschritt) durchgeführt. Nach der Färbung wurde das Gel fotografiert und die Banden videodensitometrisch (Gel Doc 1000, Molecular Analyst Software, Bio-Rad, München, Dtl.) quantifiziert (s.u.). Um einen optimal auswertbaren Bereich an proteolytischer Aktivität, d.h. eine optimale Aufhellung der Banden zu erhalten wurden aufsteigende Mengen an Gesamtprotein aufgetragen (Abb. 8A), so daß sich im Diagramm aus Gesamtprotein und enzymatischer Aktivität eine Gerade ergab (Abb. 8B). Zur Erfassung einer unterschiedlichen Calpain-Aktivität in Kontroll- und postischämischen Herzen, wurden jeweils ein Kontrollherz und ein postischämisches Herz gepaart und auf ein und demselben Gel verglichen. Aus den nach der Auswertung erhaltenen Geraden, wurde die Differenz der Enzymaktivität berechnet.

Bei der videodensitometrischen Auswertung einer Bande wurde diese „volumetrisch“ vermessen, d.h. die Bandenfläche (mm x mm) und ihre Intensität - gesehen als „Peakhöhe“ - (mm) ergaben den „Raum“ der enzymatischen Aktivität ( $\text{OD} = \text{optische Dichte} \times \text{mm}^2$ ). Zur Berechnung der Calpain-Aktivität jedes Herzens wurden drei videodensitometrische Auswertungen jeder Bande gemittelt und auf die Enzymaktivität ( $= \text{OD} \times \text{mm}^2$ ) von 1mg Gesamtprotein umgerechnet. Hieraus ergaben sich 3-4 Werte im linearen Bereich für die eingesetzten Mengen an Gesamtprotein, aus denen anschließend der Mittelwert gebildet und als Enzymaktivität/mg Gesamtprotein des entsprechenden Herzens angegeben wurde. Um den Vergleich aller Herzen, die auf unterschiedlichen Gelen untersucht wurden

zu ermöglichen, erfolgte eine Normierung der einzelnen Enzymaktivitäten ischämischer Herzen: Die Enzymaktivität des jeweiligen Kontrollherzens wurde auf 100% gesetzt und die des dazugehörigen postischämischen Herzens hierauf bezogen.



**Abb. 8: Beispiel für ein Zymogramm und die quantitative Auswertung**

**A** Repräsentatives Zymogramm, das mit unterschiedlichen Mengen Gesamtprotein eines Kontroll- und eines Ischämieherzens beladen wurde. **B** Beispiel für die quantitative Auswertung eines Gels. Die Differenz der Calpain-Aktivität zwischen Kontroll- und postischämischem Herz kann aus dem linearen Anteil der Geraden berechnet werden (Daten nicht von Abb. A).

### 2.3.2. Gelelektrophorese und Western Blot

Die Bestimmung des Gehalts an *Calpastatin*, *Troponin I*,  $\alpha$ -*Fodrin*, *Syk* und *aktivem Rho* in Herzhomogenaten bzw. Zelllysaten wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analog den Methoden von Laemmli und Towbin *et al.* durchgeführt (Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979). Hierzu wurden die in Auftraguspuffer gekochten (5 Minuten) Zelllysate bzw. Herzhomogenate auf das Gel aufgetragen, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose- (*Troponin I*,  $\alpha$ -*Fodrin*, *Calpastatin*, *Syk*) oder PVDF-Membran (*Rho*) transferiert. Für den Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde ein „semi-dry“ Blot-System eingesetzt, der Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte mit einer Tank-Blot-Apparatur. Im Anschluß daran wurden die Membranen zur Absättigung mit Protein für 1-2 Stunden mit Blocking-Puffer oder Trockenmilch geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen (4x15 Minuten) mit Waschpuffer (1x ohne Tween20 / 3x mit Tween20) wurden die Membranen für 1-2 Stunden mit dem 2. Antikörper, der an das Enzym „Meerrettichperoxidase“ gekoppelt ist behandelt. Im Anschluß an vier weitere Waschschritte (s.o.) erfolgte die Detektion der Proteine mit dem Verfahren der Chemilumineszenz. Hierfür wurde das cyclische Diacylhydrazid Luminol eingesetzt, das von der Peroxidase in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt wird, wobei nach weiteren Reaktionsschritten Licht emittiert wird, welches einen Röntgenfilm schwärzt. Nach der fotografischen Entwicklung des Films können die grauen bis schwarzen Banden (= Stellen mit dem gesuchten Protein) fotografiert und videodensitometrisch ausgewertet werden (Gel Doc 1000, Molecular Analyst Software, Bio-Rad, München, Dtl.). Zur Überprüfung auf gleichmäßige Beladung mit Protein wurden die Membranen abschließend mit Amidoschwarzlösung gefärbt.

### 2.3.3. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteins in Zelllysaten und den einzelnen Fraktionen der Herzhomogenate erfolgte mit der Bicinchoninsäure-Methode (BCA-Methode). Als Standardprotein diente hierbei Rinder-Serum-Albumin (BSA).

## **2.4. Statistik**

Der Stichprobenumfang jeder Versuchsgruppe ist im Ergebnisteil angegeben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Bei statistischem Vergleich von nur 2 Versuchsgruppen (Kontroll- mit Interventionsgruppe) wurde der t-Test nach Student oder, falls keine Normalverteilung vorlag, der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde zunächst eine Varianzanalyse durchgeführt. Wenn sich damit ein signifikanter Effekt zeigte, wurde anschließend ein multipler Vergleichstest nach Student-Newman-Keuls oder, falls keine Normalverteilung vorlag, nach Dunn durchgeführt. Unterschiede zwischen Gruppen wurden als signifikant erachtet, wenn eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% unterschritten wurde ( $p < 0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied einer Gruppe zu der jeweiligen Kontrollgruppe wurde in Abbildungen mit einem (\*) gekennzeichnet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm Sigma Stat 1.0, Jandel durchgeführt.

---

## C. Ergebnisse

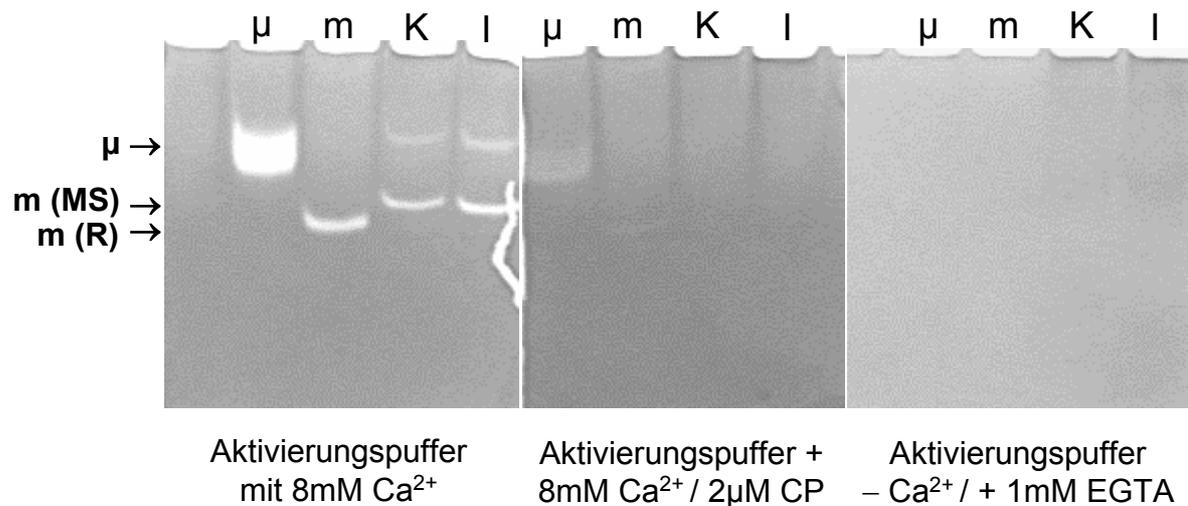
### 1. Bestimmung der Calpain-Aktivität in Kontroll- und postischämischen Herzen

#### 1.1. Direkte Beurteilung der Calpain-Aktivität mittels Zymographie

##### 1.1.1. Etablierung der Methode

Die Methode für die zymographische Bestimmung der in Herzhomogenaten vorhandenen, noch nicht-autolytisch aktivierten  $\mu$ - und m-Calpain-Menge (80kD) mußte zuerst in unserem Labor etabliert werden. Hierfür wurden die reinen Enzyme, d.h.  $\mu$ -Calpain ( $\mu$ ) aus humanen Erythrozyten und rekombinant in *E. coli* hergestelltes m-Calpain (m) der Ratte verwendet. So konnte die Laufhöhe im Gel, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung und proteolytische Aktivität der beiden Enzyme und ihre Hemmbarkeit mit dem spezifischen Inhibitor Calpastatin untersucht werden. Anstelle des vollständigen Inhibitors (~110kD) wurde das 27 Aminosäuren lange B-Peptid, welches in der katalytischen Domäne der Calpaine bindet eingesetzt (s. Abb. 3). Abbildung 9 zeigt, daß sowohl die reinen Enzyme als auch  $\mu$ - und m-Calpain aus den Herzhomogenaten vom Meerschweinchen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig aktiviert werden und daß die proteolytische Aktivität durch Calpastatin-Peptid hemmbar ist. Die hellen Banden der Gewebekomponenten von Kontroll- und postischämischen Herzen (K bzw. I) im Gel sind also eindeutig den Proteasen  $\mu$ - und m-Calpain zuzuordnen.

Im Gegensatz zu  $\mu$ -Calpain, dessen Bande sehr weit oben im Gel zu finden ist, zeigt m-Calpain eine größere Mobilität im nicht denaturierenden Gel und erscheint in der Mitte des Gels. Eine geringfügig unterschiedliche Laufhöhe zeigt sich auch bei Vergleich von rekombinantem m-Calpain der Ratte mit m-Calpain aus Herzhomogenaten des Meerschweinchens. Die langgestreckte Bande von reinem  $\mu$ -Calpain setzt sich aus drei Einzelbanden (in Abb.9 nicht sichtbar) zusammen, die jeweils aus der großen Untereinheit (80kD) in Verbindung mit unterschiedlich großen Autolyse-Produkten der kleinen Untereinheit (28-20kD) bestehen. Anders als bei der großen Untereinheit führt hier die autolytische Abspaltung am N-Terminus nicht zum sofortigen weiteren Abbau des Enzyms und zum darauffolgenden Verlust der Aktivität (Arthur and Mykles, 2000).



**Abb. 9: Zymogramme der µ- und m-Calpain-Aktivität nach Inkubation in verschiedenen Aktivierungspuffern**

MS = Meerschweinchen; R = Ratte, rekombinant; K = Homogenat von Kontrollherzen; I = Homogenat von postischämischen Herzen; CP = Calpastatin-Peptid

### 1.1.2. Calpain-Aktivität in Kontroll- und postischämischen Herzen

Um den Einfluß von Ischämie/Reperfusion auf die myokardiale Aktivität der ubiquitären Calpaine abzuschätzen, wurden Gewebehomogenate von Kontroll- und postischämischen Herzen mittels Zymographie untersucht. Da bereits aktiviertes Calpain im Verlauf der Gewebeaufarbeitung und der Elektrophorese autolytisch inaktiviert wird, kann eine Calpain-Aktivierung nur durch Bestimmung der Menge an noch nicht-aktiviertem Calpain ermittelt werden. Wie in Abbildung 10A dargestellt, zeigte sich keine signifikante Abnahme der zymographisch erfaßbaren Restaktivität, d.h. keine Aktivierung beider Enzyme in der zytosolischen Fraktion von postischämischen Herzen im Vergleich zu Kontrollen (µ-Calpain:  $91 \pm 18\%$  von Kontrollen; m-Calpain:  $91 \pm 14\%$  von Kontrollen; jeweils  $n = 16$ ).

Auch das in Abbildung 10B dargestellte Verhältnis der residualen, zymographisch detektierbaren Aktivitäten von µ:m Calpain läßt keine Unterschiede zwischen Kontroll- und reperfundierten Herzen erkennen (Kontrollen:  $0,62 \pm 0,16$ ; Ischämie:  $0,62 \pm 0,14$ ; jeweils  $n = 16$ ).

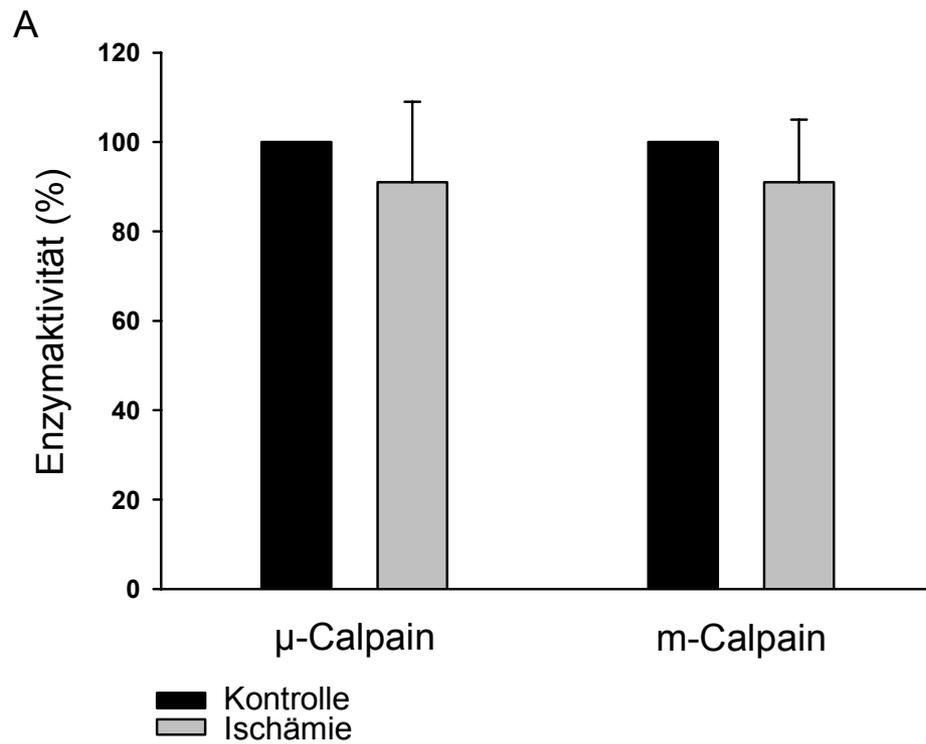


Abb. 10A: Vergleich der  $\mu$ - und m-Calpain-Aktivität in Kontroll- und Ischämieherzen

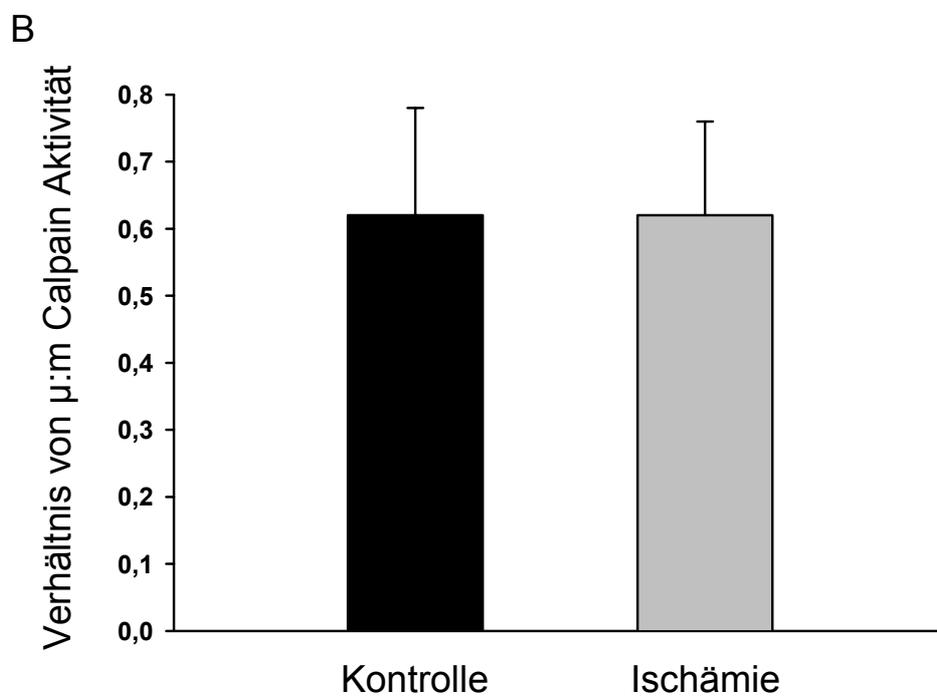


Abb. 10B: Verhältnis von  $\mu$ :m Calpain-Aktivität in Kontroll- und Ischämieherzen

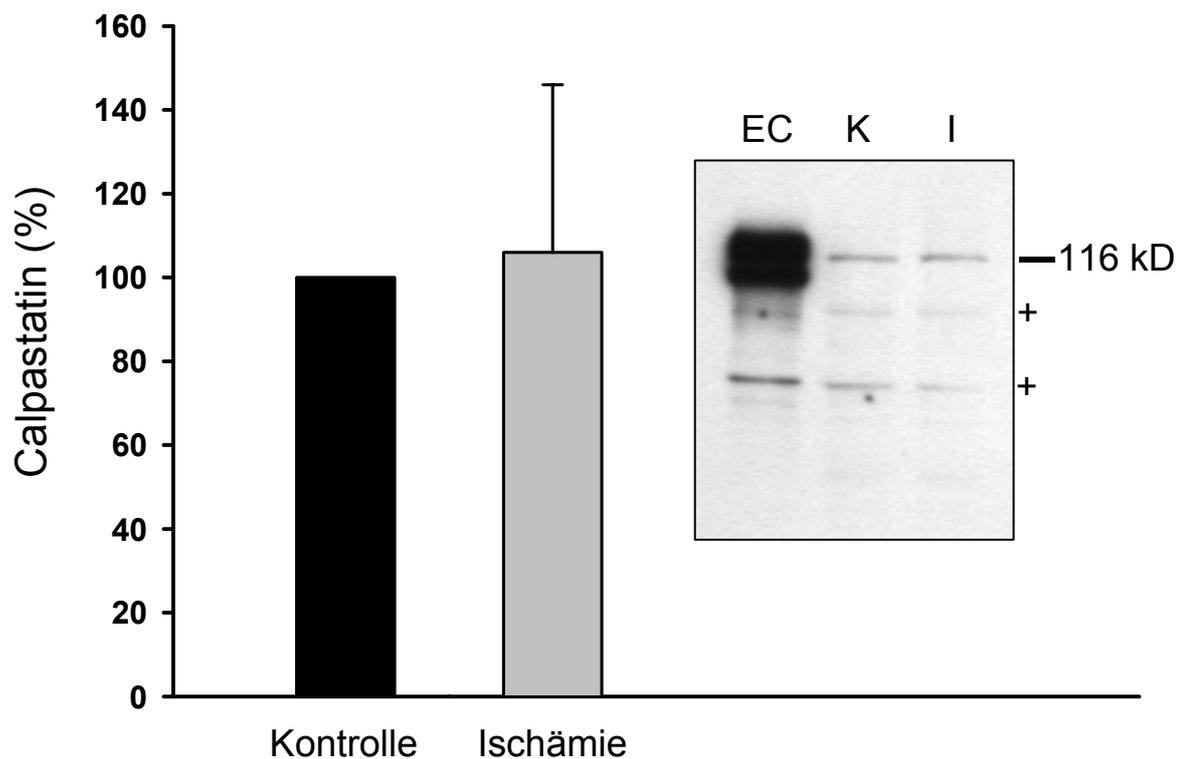
---

## **1.2. Indirekte Beurteilung der Calpain-Aktivität durch Quantifizierung von Calpain-Substraten mittels Western Blot**

Da die zymographische Untersuchung keine Aktivierung von  $\mu$ - und m-Calpain im Zuge einer Ischämie und darauffolgender Reperfusion erkennen ließ, sollte eine – bei der direkten Bestimmung möglicherweise nicht erfaßte – lokale (intra- oder interzelluläre) Aktivierung der Enzyme durch die Quantifizierung potentieller Calpain-Substrate in Kontroll- und postischämischen Herzhomogenaten mittels Western Blot vorgenommen werden.

### **1.2.1. Calpastatin-Gehalt von Kontroll- und postischämischen Herzen**

Der zellulär lokalisierte, wichtigste endogene Inhibitor der Calpaine – Calpastatin – gilt als „Suizid-Substrat“ beider Enzyme und sollte bei deren Aktivierung im Rahmen einer Ischämie/Reperfusion degradiert werden. Wie in Abbildung 11 dargestellt, zeigte sich in der zytosolischen Fraktion kein Unterschied in der immunologisch erfaßbaren Calpastatin-Menge (Bande bei 116kD) zwischen Kontroll- und reperfundierten Herzen ( $106 \pm 40\%$  von Kontrollen;  $n = 5$ ). Aus dem exemplarischen, eingefügten Blot ist ersichtlich, daß weder die Bande von Calpastatin bei  $\sim 116$ kD, noch die beiden potentiellen Abbaubanden (+) des Inhibitors bei Kontrollherzen (K) und postischämischen Herzen (I) in ihrer Intensität differieren. Gleiche Mengen an Gesamtprotein von Kontroll- und postischämischen Herzhomogenaten wurden eingesetzt. Lysat aus bovinen, koronaren Endothelzellen (EC) diente als Positivkontrolle für Calpastatin (Abb. 11).

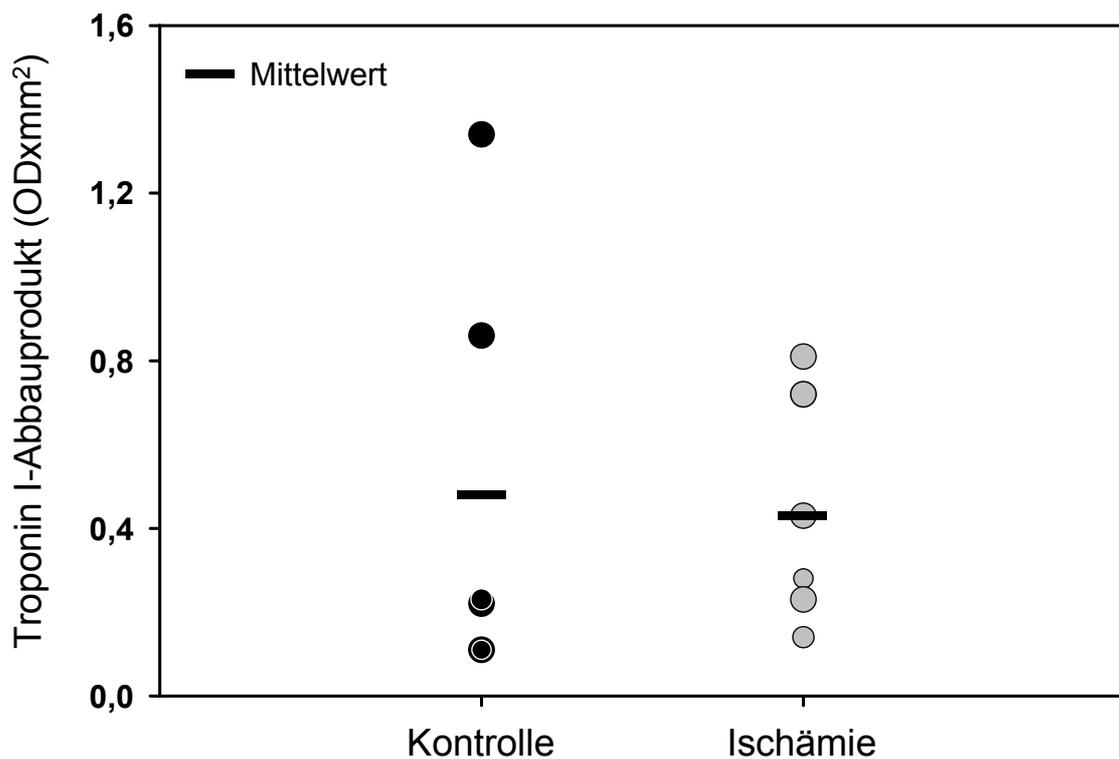


**Abb. 11: Immunoreaktive Menge an Calpastatin in Kontroll- und Ischämieherzen**

Es wurde jeweils ein postischämisches Herz mit einem Kontrollherz gepaart (n = 5). Der eingefügte Western Blot zeigt Calpastatin in der zytosolischen Fraktion von Kontroll- (K) und Ischämieherzen (I). EC = Lysat aus bovinen Endothelzellen; + = potentielle Calpastatin-Abbauprodukte

### 1.2.2. Troponin I-Gehalt von Kontroll- und postischämischen Herzen

Troponin I - ein Protein des kontraktile Apparats – wurde als weiteres, mögliches Substrat von  $\mu$ - und m-Calpain im Rahmen einer Beteiligung der Enzyme am Reperfusionsschaden untersucht. Im Western Blot konnte sowohl die Troponin I-Bande bei  $\sim 31$ kD, als auch eine Abbaubande bei  $\sim 27$ kD in der Zellkern- und Myofibrillen - enthaltenden Fraktion (= 600/1.000xg Pellet) detektiert werden. Die Abbaubande zeigte eine große Streuung in ihrer Intensität bei den einzelnen Herzen (Abb. 12), jedoch keinen Anstieg bei postischämischen Herzen im Vergleich zu Kontrollen ( $0,48 \pm 0,51$  (ODx $\text{mm}^2$ ) bei Kontrollen gegenüber  $0,43 \pm 0,27$  (ODx $\text{mm}^2$ ) bei Ischämie/Reperfusion; je n = 6).

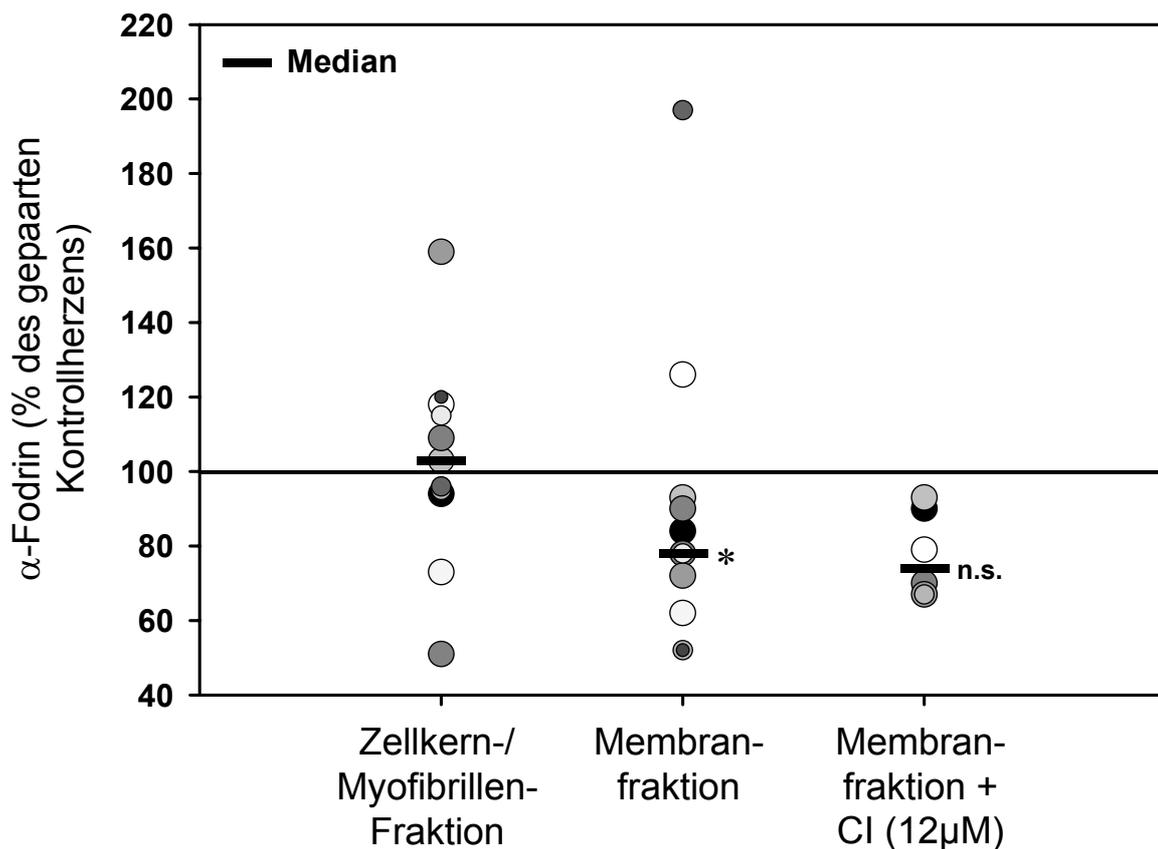


**Abb. 12: Quantifizierung des Troponin I-Abbauproduktes in Kontroll- und reperfundierten Herzen**

Jedes Herz ist durch einen Punkt  $\circ$ , teils unterschiedlicher Größe, dargestellt.

### 1.2.3. Fodrin-Gehalt von Kontroll- und postischämischen Herzen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Gehalt von  $\alpha$ -Fodrin - einem „Linkerprotein“ des submembranären Zytoskeletts - in der Membranfraktion (= 100.000xg Pellet) und der Zellkern und Myofibrillen enthaltenden Fraktion (= 600/1.000xg Pellet) von Kontroll- und reperfundierten Herzen ermittelt. Western Blots zeigten in der Membranfraktion von postischämischen Herzen im Vergleich zu Kontrollen einen signifikanten Abbau von  $\alpha$ -Fodrin (Abb. 13; Mann-Whitney Rank Sum Test; n = 11). Die Degradation dieses „Linkerproteins“ ließ sich jedoch durch Infusion von Calpain-Inhibitor I (12 $\mu$ M) nicht hemmen (Abb. 13; n.s. gegenüber Ischämie alleine; n = 6).



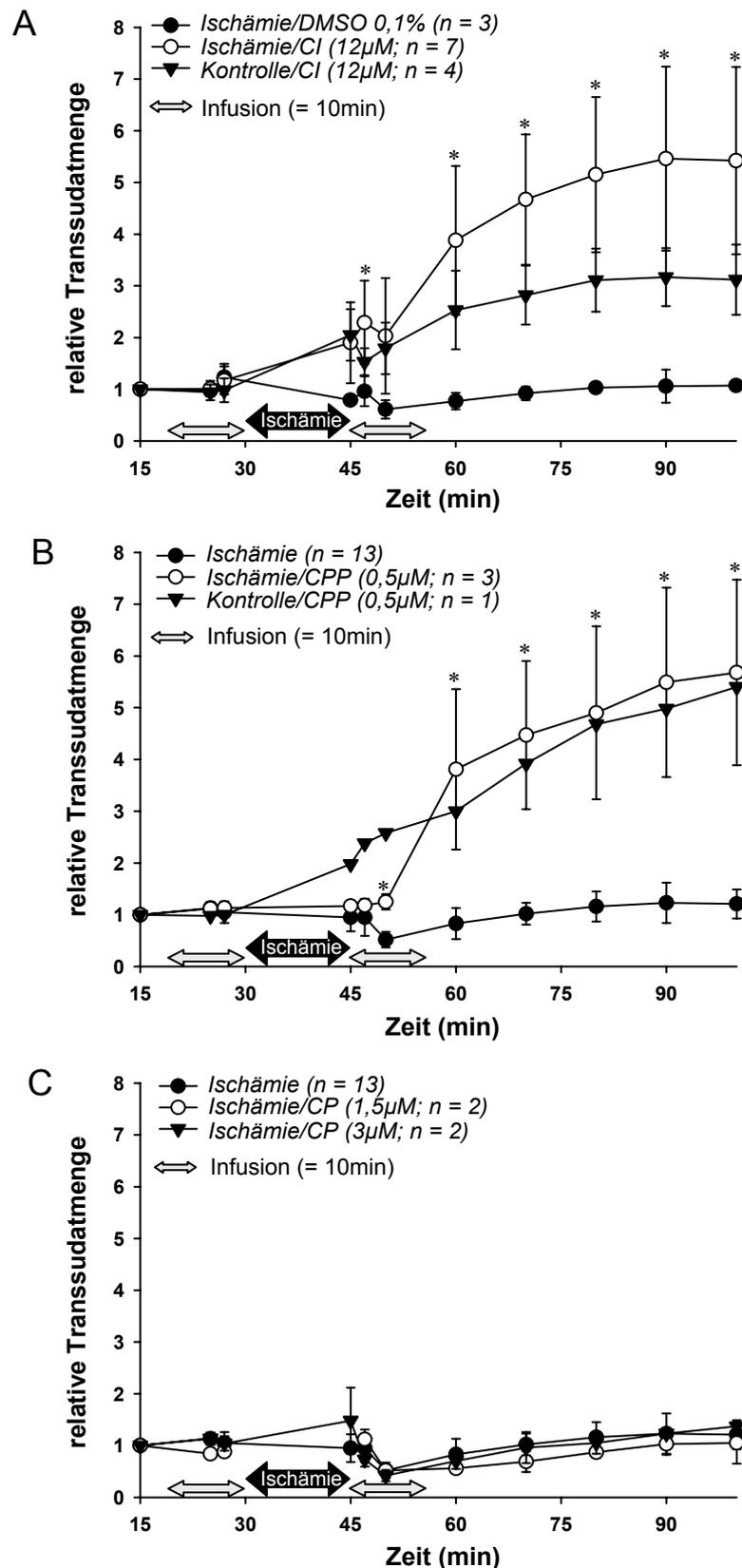
**Abb. 13:  $\alpha$ -Fodrin-Gehalt von postischämischen Herzen mit und ohne Calpain-Inhibitor**  
Der Wert von simultan bestimmten („gepaarten“) Kontrollen wurde als 100% gesetzt. \*  $p < 0,05$ ; n.s. = nicht signifikant gegenüber Ischämie alleine; jedes Herz ist durch einen Punkt  $\circ$ , teils unterschiedlicher Größe, dargestellt.

## **2. Untersuchung des Einflusses von Calpain-Inhibitoren auf die koronarvaskuläre Permeabilität**

Die Bildung eines koronarvaskulären Lecks mit Anstieg der Transsudatmenge und Ausbildung eines Ödems gilt als ein Zeichen für einen Reperfusionsschaden. Durch Messung der interstitiellen Flüssigkeitsabsonderung bei Ischämie/Reperfusion mit und ohne Infusion verschiedener Calpain-Inhibitoren sollte eine Beteiligung der Calpaine an der Verminderung der koronarvaskulären Integrität untersucht werden.

### **2.1. Bestimmung der Transsudatmenge isolierter Herzen**

Die Transsudatwerte zu Beginn eines Versuchs (15. Minute nach Präparation) bewegten sich stets um ca. 0,09ml/min in jeder Gruppe. Unter volumenkonstanter Perfusion und nur kurzzeitiger Ischämie (15min) entwickelten die reperfundierten Herzen kein signifikantes koronares Leck. Es kam sogar zu einem Rückgang der postischämischen Nettofiltration infolge der reaktiven Koronardilatation (Abb. 14). Anders als erwartet, zeigte sich jedoch bei Perfusion der isolierten Herzen mit den zellgängigen Calpain-Inhibitoren CI (12 $\mu$ M; Abb. 14A) oder CPP (0,5 $\mu$ M; Abb. 14B) ein signifikanter Anstieg der Transsudatmenge während der Reperfusion. Diese Steigerung der Transsudatbildung ließ sich auch bei Kontrollherzen, die mit dem einen oder anderen Calpain-Inhibitor perfundiert wurden verzeichnen, allerdings war die Erhöhung hier nicht so ausgeprägt (Abb. 14). Auffällig war die sehr viel höhere Potenz des Penetratin-konjugierten Calpastatin-Peptids gegenüber Calpain-Inhibitor I. Dagegen führte die Infusion des unkonjugierten 27 Aminosäuren langen Calpastatin-Peptids (1,5-3 $\mu$ M) nicht zu einem meßbaren Ansteigen der koronarvaskulären Permeabilität (Abb. 14C).

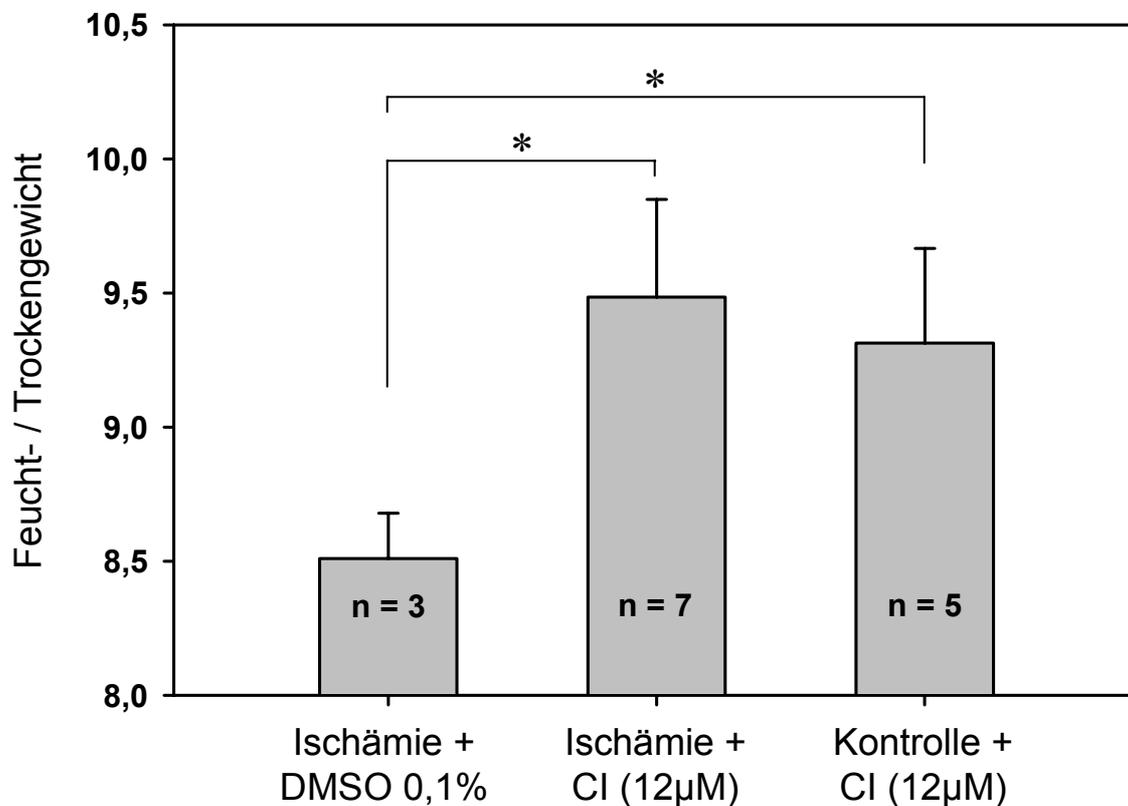


**Abb. 14: Bestimmung der Transsudatmenge von Kontroll- und Ischämieherzen bei Perfusion mit / ohne Calpain-Inhibitoren**

\*  $p < 0,05$  Ischämie + CI/ CPP vs Ischämie/ Ischämie + DMSO

## 2.2. Bestimmung des Verhältnisses von Feucht- zu Trockengewicht der Herzen

Die erhöhte Transsudatmenge der mit Inhibitor behandelten Herzen war von einer deutlichen Ödembildung begleitet. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Verhältnisses von Feucht- zu Trockengewicht bei Behandlung mit CI (12 $\mu$ M) von  $8,51 \pm 0,17$  bei Ischämie/DMSO auf  $9,48 \pm 0,36$  bei Ischämie/CI oder  $9,31 \pm 0,35$  bei Kontrolle/CI (Abb. 15).



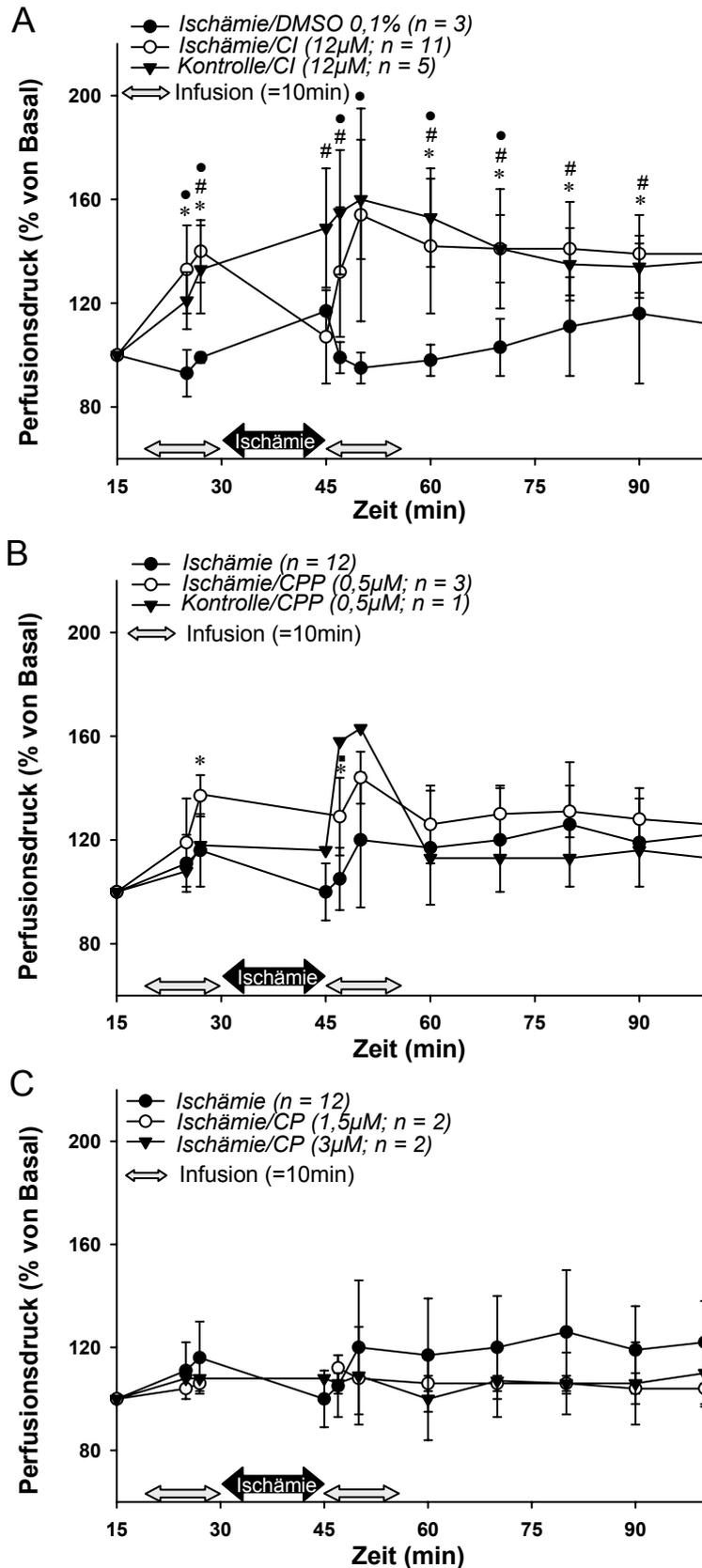
**Abb. 15: Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht der Herzen**

Perfusion mit Calpain-Inhibitor I führte zu einer signifikanten Ödembildung in Kontroll- und postischämischen Herzen gegenüber Perfusion mit Lösungsmittel (\*  $p < 0,05$ ).

---

### 2.3. Messung des koronaren Perfusionsdrucks der Herzen

Bei jeder Messung der Transsudatmenge wurde auch der koronare Perfusionsdruck der Herzen bestimmt. Die Druckwerte zu Beginn der Versuche (15. Minute) lagen in allen Gruppen im Durchschnitt bei 34cmH<sub>2</sub>O. Postischämisch kam es in den Herzen ohne Calpain-Hemmung zu der erwarteten reaktiven Koronardilatation, erkennbar an einer Abnahme des Perfusionsdrucks. Es zeigte sich, daß der Druck während der Perfusion mit CI signifikant gegenüber dem Ausgangswert anstieg (12µM; Abb. 16A). Dieser Anstieg hielt während der gesamten Reperfusion an und war zu den meisten Zeitpunkten auch gegenüber Perfusion mit Lösungsmittel (DMSO 0,1%) signifikant. Dagegen rief der spezifische Inhibitor CPP (0,5µM; Abb. 16B) nur während der Infusion selbst, also in der 27. und 47. Minute, einen signifikanten Druckanstieg gegenüber dem Ausgangswert hervor. Die Perfusion von Calpastatin-Peptid alleine hatte keinen Einfluß auf den Perfusionsdruck (Abb. 16C).



**Abb. 16: Koronarer Perfusionsdruck der Herzen mit / ohne Inhibitor-Infusion**

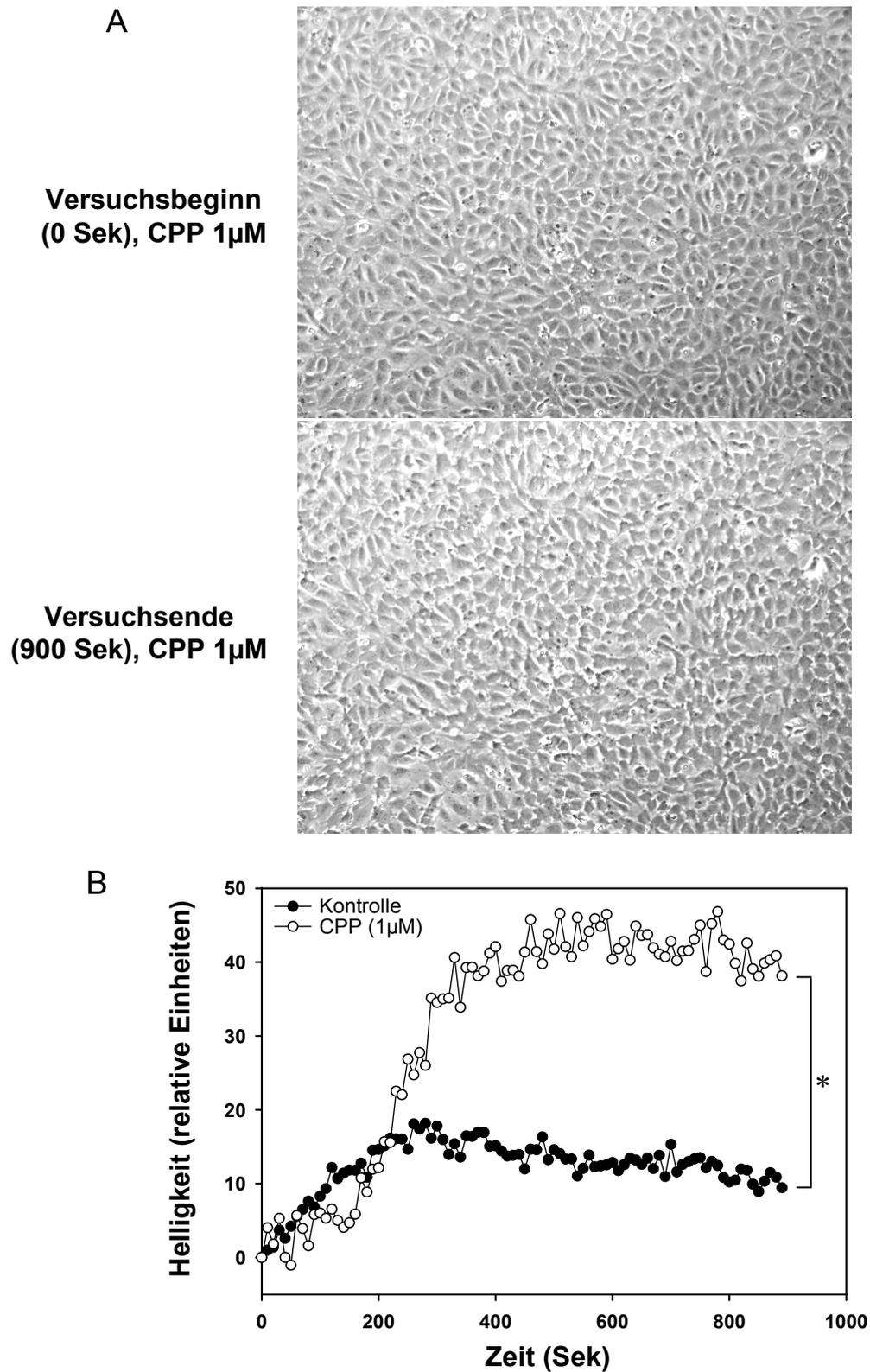
Signifikanzen: # = Kontrolle + CI vs Ausgangswert; \* = Ischämie + CI/CP vs Ausgangswert; • = Kontrolle/Ischämie + CI vs Ischämie + DMSO; ■ = Ischämie + CPP vs Ischämie

### **3. Untersuchung des Einflusses von Calpain-Inhibitoren auf HUVEC**

Um die Abläufe, die zu der gesteigerten koronarvaskulären Leckbildung als Folge einer Calpain-Hemmung führen, genauer zu untersuchen, wurden Versuche an kultivierten Umbilicalvenen-Endothelzellen des Menschen (HUVEC) durchgeführt. Hiermit sollten eventuelle morphologische Veränderungen der Zellen erfaßt und daran beteiligte Mechanismen aufgeklärt werden.

#### **3.1. Beurteilung der Wirkung von CPP auf die Morphologie von HUVEC**

Die Behandlung von konfluenten HUVEC mit CPP (1 $\mu$ M) führte zur Retraktion und Abrundung der Zellen, so daß sich im Phasenkontrast eine signifikante Erhöhung der mittleren Bildhelligkeit am Ende einer Messung (900. Sekunde) gegenüber unbehandelten Zellen ergab. Abbildung 17A zeigt konfluente, mit CPP (1 $\mu$ M) behandelte HUVEC zu Beginn (oben) und am Ende (unten) eines Versuchs. In Abbildung 17B ist der Verlauf des Helligkeitsanstiegs in Kulturen bei wiederholter Messung alle 10 Sekunden dargestellt.

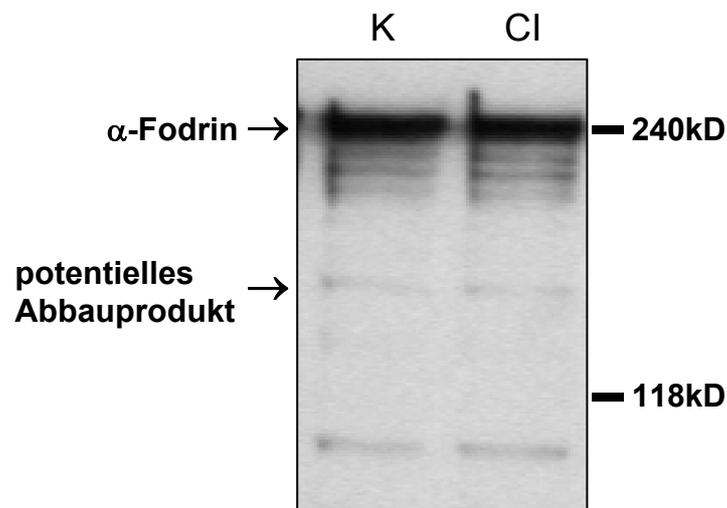


**Abb. 17: Retraktion von HUVEC nach Inkubation mit CPP**

**A** Repräsentative Phasenkontrastbilder von HUVEC zu Beginn und am Ende der Behandlung mit CPP. **B** Behandlung von HUVEC mit CPP führt zum signifikanten Anstieg der Bildhelligkeit gegenüber Kontrollzellen (mittlere Helligkeitsdifferenz:  $21,1 \pm 6,4$ ; Mann-Whitney Rank Sum Test; \*  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

### 3.2. Quantifizierung des Fodrin-Gehalts in HUVEC-Lysaten

HUVEC-Lysate, die mit 1% Triton-x-100 extrahiert wurden zeigten im Western Blot eine deutliche  $\alpha$ -Fodrin Bande bei 240kD (Abb. 18). Behandlung der Zellen mit CI (12 $\mu$ M) für 1-1,5 Stunden führte jedoch zu keinem Anstieg dieses „Linkerproteins“ verglichen mit Lösungsmittelkontrollen (DMSO 0,1%). Auch die Intensität der Bande bei ca. 150kD, die Zeichen eines möglichen Abbauproduktes von  $\alpha$ -Fodrin durch Calpain sein könnte, blieb unverändert (Abb. 18).



#### Abb. 18: $\alpha$ -Fodrin-Gehalt in HUVEC-Lysaten

Der repräsentative Western Blot zeigt, daß es in der tritonlöslichen Fraktion von HUVEC nach Behandlung mit CI (12 $\mu$ M) nicht zu einem Anstieg des  $\alpha$ -Fodrin-Gehalts gegenüber Kontrollzellen (DMSO 0,1%) kam ( $110 \pm 26\%$ ;  $n = 7$ ; nicht signifikant).

---

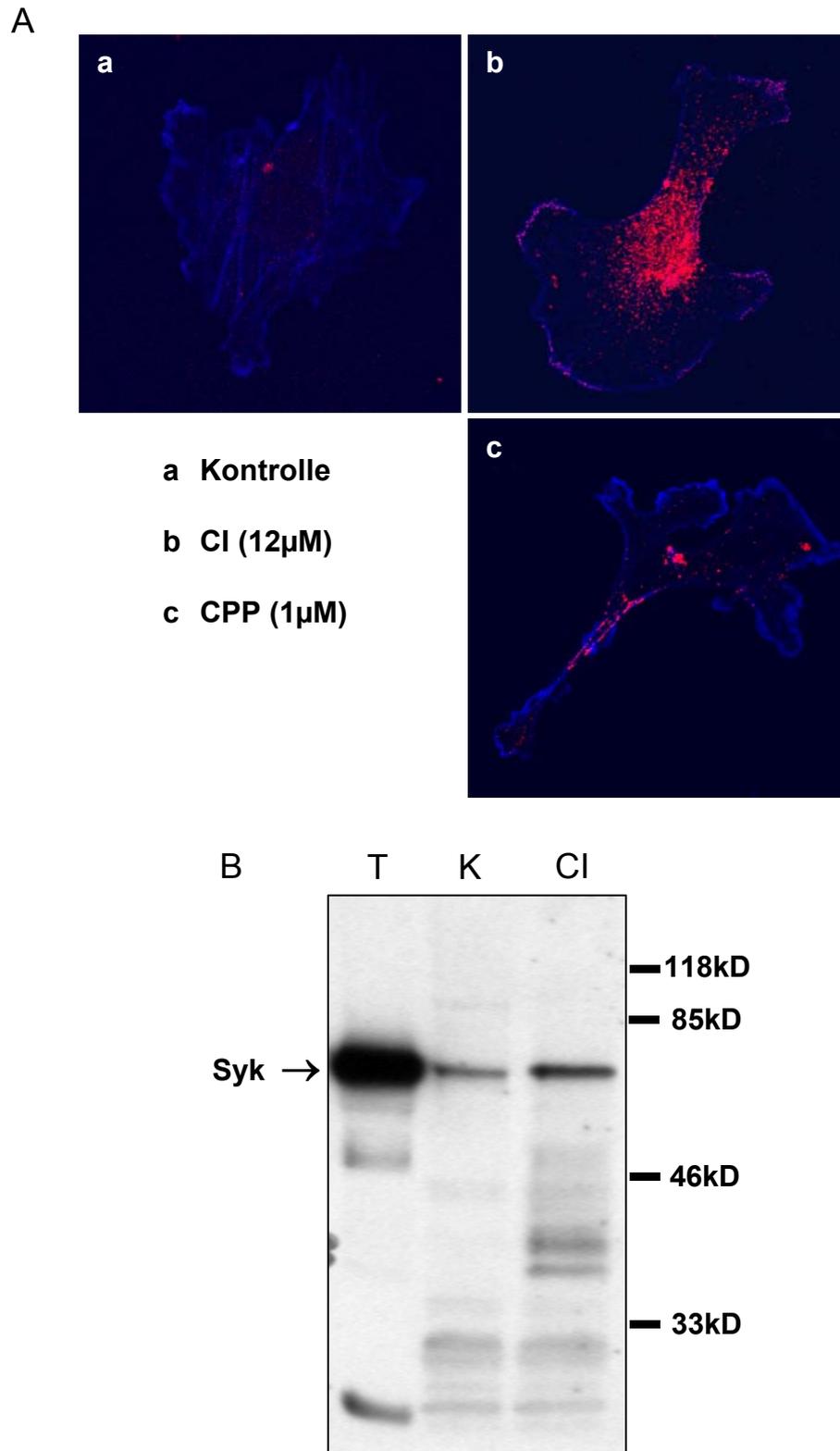
### **3.3. Lokalisation von Syk in HUVEC**

#### **3.3.1. Immunfluoreszenzmikroskopie**

Doppelfärbungen von HUVEC auf Aktin (blau) und die nicht-rezeptorgekoppelte Tyrosinkinase Syk (rot) zeigten im Mikroskop nach 30 minütiger Behandlung der Zellen mit verschiedenen Calpain-Inhibitoren (CI 12 $\mu$ M; CPP 1 $\mu$ M) eine Zunahme der Tyrosinkinase und eine Translokation an die Membran (Abb. 19A).

#### **3.3.2. Bestimmung des Gehalts von Syk in HUVEC mittels Western Blot**

Nach Behandlung von HUVEC mit CI (48 $\mu$ M) für 1 Stunde zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Syk (72kD) in der Membranfraktion der Zellen (Mann-Whitney Rank Sum Test; n = 5) im Vergleich zu reinen Lösungsmittelkontrollen (DMSO 0,4%). Abbildung 19B zeigt einen repräsentativen Western Blot. Auch der Gehalt an Syk in der zytosolischen Fraktion war etwas erhöht (nicht gezeigt; nicht signifikant). Lysat von humanen Thrombozyten diente als Positivkontrolle für Syk (Abb. 19B).



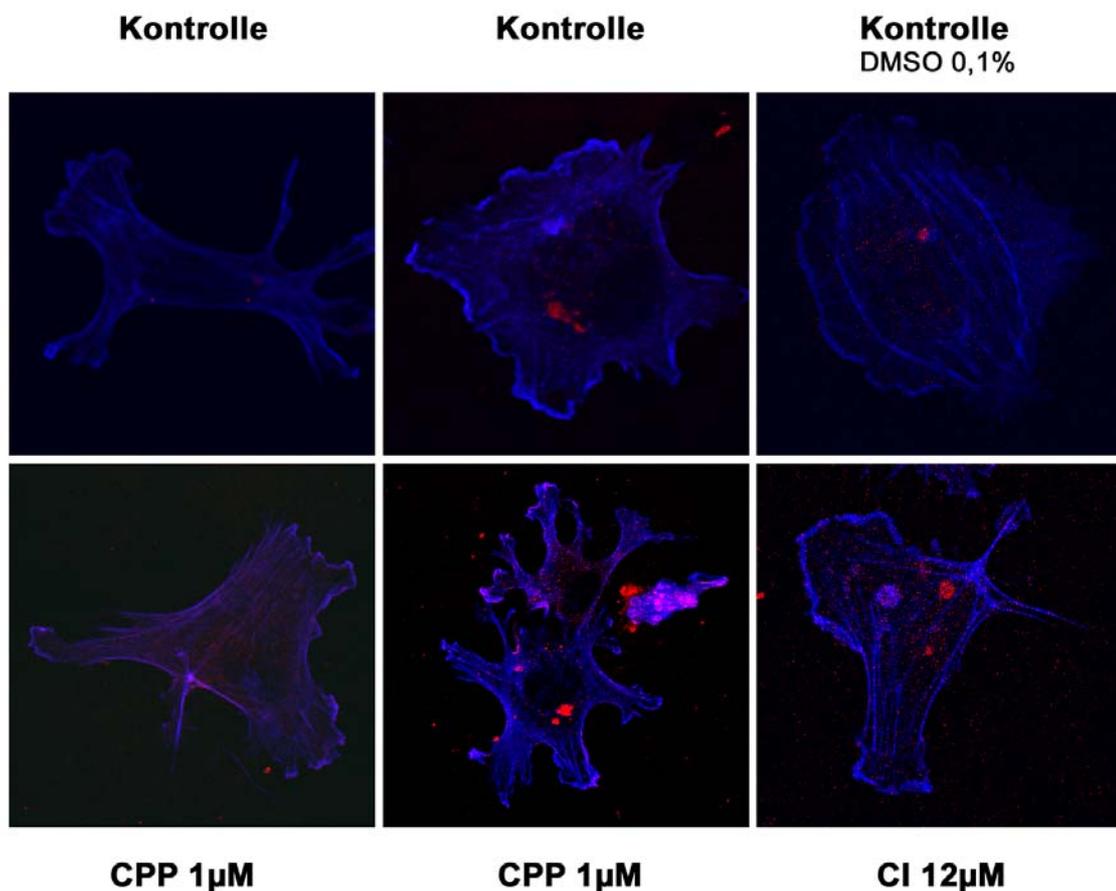
**Abb. 19: Translokation von Syk an die Zellmembran nach Inkubation von HUVEC mit Calpain-Inhibitoren**

**A** Immunfluoreszenzmikroskopie von auf Aktin (blau) und Syk (rot) gefärbten HUVEC nach Behandlung mit Calpain-Inhibitoren. **B** Der repräsentative Western Blot zeigt die Akkumulation von Syk in der Membranfraktion nach Behandlung von HUVEC mit CI (48 $\mu$ M) gegenüber Lösungsmittelkontrollen (K; DMSO 0,4%). T = Lysat humaner Thrombozyten

### 3.4. Lokalisation und Aktivität von Rho in HUVEC

#### 3.4.1. Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Lokalisation des G-Proteins Rho in HUVEC nach 30 minütiger Behandlung mit verschiedenen Calpain-Inhibitoren (CI 12 $\mu$ M; CPP 1 $\mu$ M), wurden die Zellen auf Aktin (blau) und RhoA (rot) gefärbt. Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, führte die Calpain-Hemmung zu einer Steigerung des Gehalts an RhoA, begleitet von einer Translokation des G-Proteins an die Zellmembran. Beide Vorgänge waren jedoch nicht in allen Inhibitor behandelten Zellen gleichermaßen zu sehen.



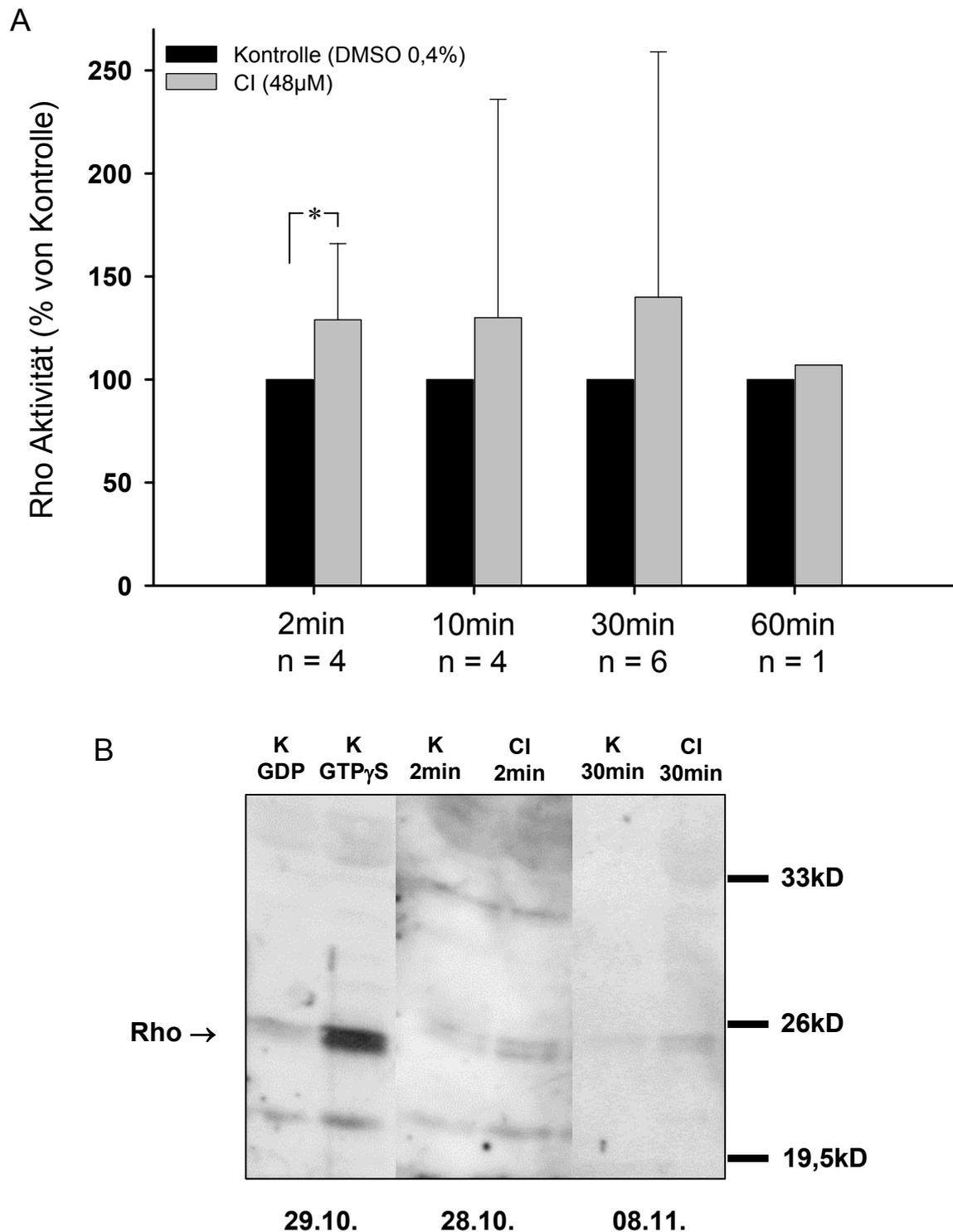
**Abb. 20: Lokalisation von Rho in HUVEC nach Inkubation mit Calpain-Inhibitoren**

Immunfluoreszenzbilder von auf Aktin (blau) und RhoA (rot) gefärbten HUVEC nach Inkubation mit verschiedenen Calpain-Inhibitoren. Gezeigt sind Zellen aus 3 verschiedenen Kulturen.

### 3.4.2. Rho-Aktivität in HUVEC

Die Behandlung von HUVEC mit CI (48 $\mu$ M) führte zu einem ca. 20%igen Anstieg der Rho-Aktivität gegenüber Kontrollen. Dieser war jedoch nur nach 2 minütiger Behandlung signifikant (Mann-Whitney Rank Sum Test; n = 4; Abb. 21A). Obwohl auch zu späteren Zeitpunkten die Tendenz zu einer erhöhten Aktivität des G-Proteins nach Inkubation der Zellen mit dem Calpain-Inhibitor bestand, streuten die Werte in den einzelnen Kulturen sehr stark (Abb. 21A).

Der in Abbildung 21B dargestellte Western Blot zeigt die in einem Kontrollzelllysat (DMSO 0,4%) maximal mögliche Steigerung der Rho-Aktivität von mit GDP vorbehandeltem Lysat (Negativkontrolle) zu mit GTP $\gamma$ S vorinkubiertem Lysat (Positivkontrolle). Die Steigerung war hier ~21fach. Aus der Abbildung wird auch deutlich, daß es sich bei der durch CI hervorgerufenen Erhöhung der Rho-Aktivität höchstens um einen Anstieg um das 1,3-1,4 fache gegenüber Kontrollen handelt.

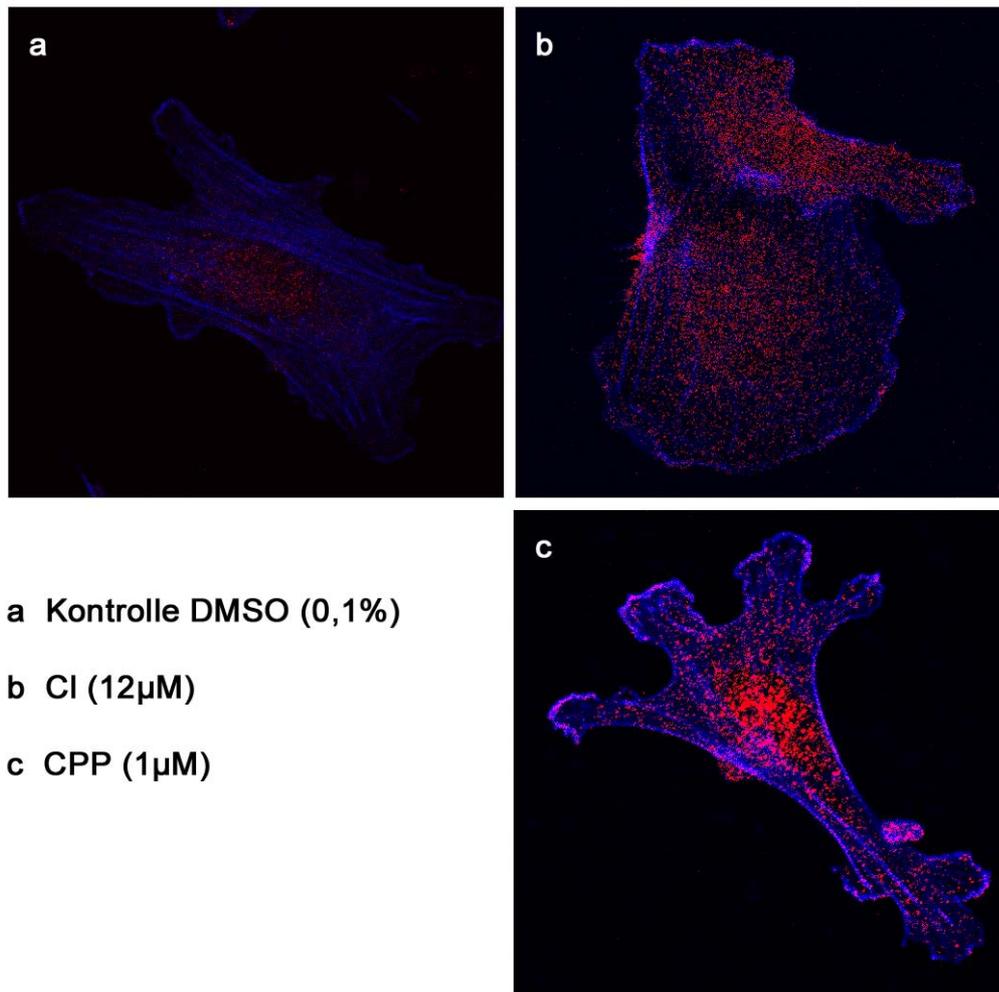


**Abb. 21: Rho-Aktivität in HUVEC nach Inkubation mit Calpain-Inhibitor I**

**A** Verwendung eines Pull-down-Assays mit anschließendem Western Blot zeigt eine Steigerung der Rho-Aktivität nach Inkubation der Zellen mit Calpain-Inhibitor I gegenüber Kontrollen (\*  $p < 0,05$ ). **B** Der repräsentative Western Blot zeigt aktives Rho in Lysaten aus HUVEC nach Inkubation mit Lösungsmittel (K) oder Calpain-Inhibitor I (CI). Mit GDP oder GTP $\gamma$ S vorinkubierte HUVEC-Kontrolllysate dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle für aktives Rho.

### 3.5. Lokalisation von Rac1 in HUVEC mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Nach Behandlung von HUVEC mit CI (12 $\mu$ M) oder CPP (1 $\mu$ M) und anschließender Doppelfärbung auf Aktin (blau) und Rac1 (rot) zeigte sich eine Translokation auch dieses G-Proteins. Es kam dabei zu einer Verlagerung vom Zellinneren an kortikale Streifasern und an die Plasmamembran der Zellen (Abb. 22).



**Abb. 22: Lokalisation von Rac in HUVEC nach Inkubation mit Calpain-Inhibitoren**  
Immunfluoreszenzbilder von auf Aktin (blau) und Rac1 (rot) gefärbten HUVEC nach Behandlung mit Calpain-Inhibitor I oder CPP.

---

## D. Diskussion

Aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen war bekannt, daß es bereits nach einer 15 minütigen Ischämie und darauffolgender Reperfusion zu einer signifikanten Verminderung der Herzfunktion kommt (Zahler *et al.*, 1999; Massoudy *et al.*, 1995; Massoudy *et al.*, 1997; Massoudy *et al.*, 1999). Außerdem führen die während der Ischämie und der anschließenden Reperfusion ablaufenden Vorgänge zu einer dramatischen Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels (Carrozza, Jr. *et al.*, 1992; Bolli and Marban, 1999). Verminderung dieses Anstiegs, beispielsweise durch Gabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten, verbessert die postischämische kardiale Kontraktilität, womit ein kausaler Zusammenhang bewiesen ist (Massoudy *et al.*, 1995). Eine Aktivierung der Proteasen  $\mu$ - und m-Calpain durch hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, wie sie im Rahmen einer Reperfusion auftreten können, erscheint denkbar und legt die Vermutung nahe, daß die beobachtete Einschränkung der Herzfunktion nach Ischämie/Reperfusion möglicherweise zum Teil auf die proteolytische Aktivität dieser Enzyme zurückzuführen ist. Gegenstand dieser Studie war es, diese Hypothese zu überprüfen und gegebenenfalls Verbesserungen in der postischämischen Herzfunktion durch den Einsatz von Calpain-Inhibitoren zu bewerten. Hierfür mußte zunächst eine Methode etabliert werden, mit der sich die Aktivierung und proteolytische Aktivität von  $\mu$ - und m-Calpain im Gewebeextrakt der isoliert perfundierten Herzen nach Ischämie/Reperfusion nachweisen ließ.

### 1. Die Calpain-Aktivität nach Ischämie/Reperfusion am isoliert perfundierten Herzen

#### 1.1. Die Zymographie als Methode zur quantitativen Bestimmung der Calpain-Aktivität

Wie unter B.2.3.1. dargestellt, eröffnet die Zymographie die Möglichkeit, die Aktivität von  $\mu$ - bzw. m-Calpain in physiologischen Proben wie Zelllysaten oder Gewebehomogenaten direkt, d.h. ohne vorherige Isolierung der Enzyme zu bestimmen. Grund hierfür ist, neben Trennung der beiden Enzyme voneinander, ihre elektrophoretische Abtrennung von endogenen sowie nicht-kovalent bindenden

---

Inhibitoren des Lysispuffers (z.B. Cl, Leupeptin). Der endogene, ubiquitär lokalisierte Inhibitor, Calpastatin, ist zudem in den meisten Zellen im Überschuß gegenüber Calpainen vorhanden, so daß sich aus Zelllysaten und Gewebehomogenaten mit den üblichen, in Lösung durchgeführten Methoden (Casein-Assay/Assay mit fluorogenem Substrat) die Calpain-Aktivität, ohne vorherige Isolierung der Proteasen, nicht direkt bestimmen läßt. Im nicht denaturierenden,  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Milieu der Elektrophorese können Calpastatin und die anderen Inhibitoren jedoch nicht an Calpaine binden und werden so, bedingt durch ihr unterschiedliches Laufverhalten, von den Enzymen abgetrennt (Raser *et al.*, 1995). Die anschließende Aktivierung von  $\mu$ - und m-Calpain und die enzymatische Spaltung von Casein im Gel können so ungehindert ablaufen und nach Fixierung der Banden quantifiziert werden.

In Anlehnung an frühere Arbeiten (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1994) wurden für die quantitative Auswertung der Enzymaktivität aufsteigende Mengen an Gesamtprotein einer Probe aufgetragen, um im Gel unterschiedliche „Blauabstufungen“ der einzelnen Banden zu erhalten. Durch die sich daraus ergebenden Bereiche mit linearer Beziehung von Gesamtprotein zu Bandenintensität war es möglich, die Calpain-Aktivitäten (Substrat-Umsatz/mg Protein) von Kontroll- und postischämischen Herzen zu vergleichen. Der Einfluß unterschiedlicher Inkubationszeiten im Aktivierungspuffer und verschiedener „Gelchargen“ wurde durch den direkten Vergleich eines Kontroll- und eines postischämischen Herzens auf demselben Gel ausgeschlossen.

Da sich, wie unter B.2.3.1. erwähnt, mit dem Verfahren der Zymographie nur die noch nicht-autolytisch aktivierte Calpain-Menge (80kD) in einer Probe erfassen läßt, sollte sich eine Aktivierung dieser Enzyme im Zuge einer Ischämie mit darauffolgender Reperfusion als eine Abnahme der residualen, zymographisch detektierbaren Calpain-Menge (80kD) in postischämischen Herzen darstellen. Eine derartige Abnahme konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden: Obwohl die Enzymaktivitäten von  $\mu$ - und m-Calpain in postischämischen Herzen etwas vermindert waren, ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Bei einer Untersuchung der gesamten Herzhomogenate, wie hier geschehen, werden jedoch Phänomene der Kompartimentierung außer Acht gelassen. So ist eine lokale Aktivierung von Calpainen in einzelnen kardialen Zelltypen (z.B. Endothelzellen) oder Zellkompartimenten denkbar. Auch eine mit der Aktivierung verbundene Translokation der Enzyme an die Zellmembran ist dokumentiert (Suzuki *et al.*, 1992 ;

Hayashi *et al.*, 1999). Die zusätzliche Untersuchung der Herzhomogenate auf eine Degradation verschiedener potentieller Calpain-Substrate als Nachweis einer Aktivierung der Enzyme mittels Western Blot war deshalb erforderlich.

### **1.2. Quantifizierung potentieller Calpain-Substrate in Kontroll- und postischämischen Herzen mittels Western Blot**

Der endogene Inhibitor, Calpastatin gilt als „Suizid-Substrat“ der Calpaine (Nakamura *et al.*, 1989) und sein Abbau, zum Nachweis einer durch 20 minütige Ischämie und anschließende Reperfusion bedingten Calpain-Aktivierung, wurde bereits beschrieben (Sorimachi Y *et al.*, 1997). Mit unserem Versuchsprotokoll einer 15 minütigen globalen Ischämie und anschließender 60 minütiger Reperfusion zeigte sich jedoch keine Verminderung von immunreaktivem Protein in der zytosolischen Fraktion postischämischer Herzextrakte im Vergleich zu Kontrollen. Die Ursache für dieses konträre Ergebnis könnte in einer nicht zu vernachlässigenden Kompartimentierung von Calpastatin liegen. Außerdem läßt sich anhand der Menge immunreaktiven Proteins nichts über die inhibitorische Aktivität von Calpastatin ableiten. Es galt also, ein endogenes Calpain-Substrat zu finden, das eine proteolytische Aktivität der Enzyme im gesamten Organ zuverlässig erkennen lassen würde.

Troponin I ist als Bestandteil des kontraktiven Apparats ein Protein, dessen Abbau in direktem Zusammenhang mit der beim Reperfusionsschaden beobachteten kontraktiven Dysfunktion – dem sogenannten myokardialen „stunning“ – stehen könnte. In der Klinik wird der Nachweis von Troponin I - trotz der durch proteolytischen Abbau erschwerten Analytik - im Blut von Patienten routinemäßig als Marker zur Erkennung eines Herzinfarktes verwendet (Katrukha *et al.*, 1999). Jedoch wird die Degradation dieses Proteins durch Calpaine nach Ischämie/Reperfusion in der Literatur kontrovers diskutiert (Di Lisa *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1999). Obwohl sich in der Zellkern- und Myofibrillen-enthaltenden Fraktion unserer Herzpräparate ein Troponin I-Abbauprodukt im Western Blot detektieren ließ, war keine Intensitätssteigerung dieser Bande nach 15 minütiger Ischämie und 60 minütiger Reperfusion zu erkennen. Dieses Ergebnis spricht nicht für eine auf Troponin I-Abbau beruhende Beteiligung der Calpaine an der nach Ischämie/Reperfusion beobachteten Veränderung und Verminderung der Herzfunktion (Urthaler *et al.*, 1997; Iwamoto *et al.*, 1999).

---

Andere Calpain-Substrate, z.B. Proteine des Zytoskeletts wie Fodrin, Ankyrin, Actinin, Paxilin oder Talin könnten möglicherweise eine viel größere Rolle bei einem durch Calpain verursachten Reperfusionsschaden spielen (Yoshida *et al.*, 1995; Sato and Kawashima, 2001). Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Herzextrakte ebenfalls auf ihren Gehalt an  $\alpha$ -Fodrin untersucht. Dieses Protein bildet einen Teil des submembranären Zytoskeletts und verbindet so eine Reihe von Membranproteinen mit Aktinfilamenten (Wu *et al.*, 2001; Bennett, 1990). Ein Abbau dieses „Linkers“ im Zuge einer Ischämie mit darauffolgender Reperfusion könnte also durchaus zu einer Veränderung der kontraktiven Herzfunktion beitragen. In unseren Versuchen zeigte sich, daß Ischämie/Reperfusion eine signifikante Abnahme von  $\alpha$ -Fodrin in der Membranfraktion der postischämischen Herzen gegenüber Kontrollen verursachte. Diese Reduktion von  $\alpha$ -Fodrin wurde jedoch durch die Infusion von Calpain-Inhibitor I (12 $\mu$ M) nicht unterbunden, so daß auch hier an einer generellen Calpain-Aktivierung im Herzen gezweifelt werden muß. Offensichtlich müssen also andere Proteasen, die im Rahmen von Ischämie und Reperfusion aktiviert werden, für den  $\alpha$ -Fodrin-Abbau verantwortlich sein.

Unerwarteterweise zeigte der Calpain-Inhibitor einen Einfluß auf die koronarvaskuläre Permeabilität der Herzen. Eine lokal auf Endothelzellen begrenzte Calpain-Aktivität, deren Effekt im Gesamtextrakt der Herzen eventuell untergeht und somit auch bei einer Hemmung der Proteasen nicht zu Tage tritt, kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

## **2. Einfluß von Calpain-Inhibitoren auf die koronarvaskuläre Permeabilität**

Ein weiterer Parameter, der als Zeichen für eine Schädigung des Herzens nach Ischämie/Reperfusion gilt, ist die Zunahme der koronarvaskulären Permeabilität, die sich am isoliert perfundierten Herzen in einer Steigerung des Transsudatflusses und Ausbildung eines Ödems manifestiert (Mehlhorn *et al.*, 2001; Heindl *et al.*, 1998). Im Zuge der Versuche zur Hemmbarkeit des Abbaus von  $\alpha$ -Fodrin durch Gabe eines Calpain-Inhibitors, wurde deshalb gleichzeitig ein möglicher Effekt des Inhibitors auf die Entwicklung des koronaren Lecks nach Ischämie/Reperfusion untersucht.

Das isoliert perfundierte Herz ist ein gut etabliertes und standardisiertes Modell, um Veränderungen der koronarvaskulären Permeabilität in situ zu erfassen (Heindl *et al.*,

1998). Normalerweise wird die Filtration von Flüssigkeit und Proteinen durch das Endothel von vielen verschiedenen Parametern beeinflusst, die in der „Starling-Gleichung“ ihren Ausdruck finden. In unserem Modell wird die Transsudat- und Ödembildung jedoch lediglich vom Perfusionsdruck und der koronarvaskulären Integrität bestimmt.

Entgegen der aus der Literatur bekannten Entstehung eines koronaren Lecks nach Ischämie/Reperfusion, führte die volumenkonstante Perfusion der Herzen hier nur zu einem moderaten Anstieg der koronaren Nettofiltration während der Reperfusion. Dies könnte einerseits durch den beobachteten leichten Abfall des Perfusionsdrucks (als Zeichen einer postischämischen, reaktiven Hyperämie) bedingt sein, der Veränderungen in der postischämischen Permeabilität verdeckt hat. Andererseits führte die Infusion von zwei molekular grundverschiedenen Calpain-Inhibitoren (CI 12µM, CPP 0,5µM), entgegen jeglicher Erwartung und im Gegensatz zu den in der Literatur postulierten kardioprotektiven Effekten einer Calpain-Hemmung (Yoshida *et al.*, 1995; Urthaler *et al.*, 1997), zu einem dramatischen Anstieg des postischämischen Transsudatflusses. Überraschenderweise trat diese Steigerung der Transsudatbildung, wenn auch nicht so ausgeprägt, bei beiden Inhibitoren ebenfalls nach Perfusion von Kontrollherzen ohne Ischämie/Reperfusion auf. Nach Gabe von Inhibitor kam es außerdem sowohl in den reperfundierten Herzen als auch in Kontrollherzen zur Ausbildung eines Ödems. Diese Beobachtungen legen das Vorhandensein einer physiologischen, konstitutiven Calpain-Aktivität nahe, die zu einer physiologischen Abdichtung der endothelialen Barriere beiträgt und – angesichts des nur moderaten Anstiegs der Transsudatbildung in unserem Modell nach Ischämie alleine - im Rahmen einer Reperfusion sogar noch an Bedeutung zu gewinnen scheint.

Während der Perfusion der Herzen mit beiden Calpain-Inhibitoren kam es außerdem zum Anstieg des Perfusionsdrucks. Im verwendeten Perfusionsmodus bedeutet dies, daß der Tonus der Gefäßmuskelzellen zugenommen haben muß. Dieser Effekt könnte u.a. durch eine  $Ca^{2+}$ -Sensitivierung glatter Gefäßmuskelzellen in Folge gesteigerter Rho-Kinase-Aktivität hervorgerufen worden sein (Somlyo, 2002). Einen Hinweis hierauf bietet die schnell einsetzende Steigerung der Rho-Aktivität in HUVEC nach Behandlung mit CI (Abb. 21A). Der Anstieg des Perfusionsdrucks verschwand nach Beendigung der Infusion von CPP, hielt jedoch bei Gabe von CI

---

über den gesamten Zeitraum der Reperfusion, also auch nach Ende der Inhibitor-Infusion an. Dieser länger andauernde Effekt von Calpain-Inhibitor I ist eventuell in der chemischen Struktur der Substanz begründet: Eine kovalente Reaktion dieses Aldehyds mit der SH-Gruppe des aktiven Zentrums der Calpaine erscheint denkbar und würde so eine Verlängerung der Inhibitor-Wirkung ermöglichen. Die unterschiedliche Persistenz der Tonussteigerung nach Auswaschen von CI bzw. CPP erlaubt eine wichtige Schlußfolgerung: Da der calpain-spezifische Peptid-Inhibitor CPP keine bleibende Erhöhung des Perfusionsdrucks auslöste, kann die anhaltende Steigerung der Transsudatbildung nicht auf dieses Phänomen alleine zurückgeführt werden und ist vielmehr in einer Beeinträchtigung der normalen Endothelzellfunktion zu suchen (Permeabilitätszunahme).

Die Störung der endothelialen Barrierefunktion bei Hemmung der Calpaine deutet darauf hin, daß eine konstitutive Aktivität dieser Proteasen für die normale Endothelzellfunktion unabdingbar ist. Die Tatsache, daß die komplette Ausschaltung der  $\mu$ - und m-Calpain-Aktivität durch „knock-out“ der kleinen (für beide Enzyme gemeinsamen) Untereinheit bei Mäusen letale Defekte in der Gefäßentstehung verursachte und zu einer charakteristischen Abrundung der Endothelzellen führte, unterstützt diese Vermutung (Arthur, Elce *et al.*, 2000). Es wurde außerdem über eine reduzierte Bildung von fokalen Adhäsionspunkten und Aktinfilamentnetzwerken in Endothelzellen nach Calpain-Hemmung berichtet (Bialkowska *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 1999). Durch die begrenzte Proteolyse von Zytoskelettproteinen (z.B. zytoplasmatische Domäne der  $\beta$ -Integrine, Talin, Filamin, Fodrin) (Fujitani *et al.*, 1997; Sato and Kawashima, 2001) und Signalmolekülen (z.B. PTP-1B, PKC, FAK, Src, Syk) (Baldock *et al.*, 2000; Sato and Kawashima, 2001) sollen Calpaine zudem indirekt mit Prozessen des Zytoskelett-Remodelling wie „Spreading“, Migration oder „Integrin-Signalling“ in Zellen verknüpft sein (Bialkowska *et al.*, 2000). Die konstitutiv hohen Calpain-Spiegel in Endothelzellen (Fujitani *et al.*, 1997) legen daher eine wichtige basale Funktion für diese Proteasen nahe.

Es galt also im weiteren die Abläufe, die zu der gesteigerten koronarvaskulären Permeabilität nach Calpain-Hemmung in den Herzen führten, an Endothelzellen genauer zu untersuchen. Hierbei sollten insbesondere morphologische Veränderungen der Zellen und daran beteiligte Mechanismen erfaßt werden.

### 3. Einfluß von Calpain-Inhibitoren auf HUVEC

Das Endothel übt als Grenzschicht zwischen dem strömenden Blut und der Gefäßwand eine Vielzahl von Funktionen aus, die für die Hämostase, den Stoffaustausch zwischen intra- und extravasalem Raum und für immunologische Prozesse eine zentrale Rolle spielen. Insbesondere stellt es im Gefäßsystem die physiologische Barriere zum umgebenden Gewebe für Flüssigkeit, gelöste Teilchen, Makromoleküle und Zellen dar und verhindert so deren unkontrollierten Austritt und die Bildung von Ödemen. Untersuchungen physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge an diesem wichtigen „Organ“ lassen sich besonders gut an den leicht isolierbaren und frisch kultivierbaren Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene durchführen.

#### 3.1. Morphologische Veränderungen an HUVEC nach Calpain-Hemmung

Konfluent gewachsene HUVEC bilden einen dichten, einschichtigen „Zellrasen“ und werden häufig als *in-vitro* Modell für Permeabilitätsstudien verwendet. Einen neuen Ansatz in der Verwendung dieses Modells bietet die Messung des Bildhelligkeitsanstiegs, der auftritt, wenn die Zellen des „Monolayers“ sich zurückziehen und abrunden. Mittels Phasenkontrastmikroskopie war es möglich, Bildsequenzen zu generieren, in denen die Änderung der Morphologie der Zellen *in situ* beobachtet und die Ergebnisse anschließend quantifiziert werden konnten. So führte beispielsweise der Zusatz des calpain-spezifischen Inhibitors CPP (1µM) innerhalb von 6 Minuten zu einer Zunahme der Lichttransmission, die bis zum Ende des Versuchs andauerte. Gleichartige Ergebnisse wurden in unserer Arbeitsgruppe erhalten, wenn die elektrische Impedanz von konfluenten, auf Halbleiterchips gewachsenen HUVEC gemessen wurde (Daten von Dr. S. Zahler). Es kam zu einem raschen Absinken der Impedanz in Gegenwart von Calpain-Inhibitor.

Die Hemmung von Calpainen scheint also das Abrunden von konfluent gewachsenen HUVEC zu induzieren – ein Phänomen, das ebenfalls für Endothelzellen der Vorhofwände von Capn4 *-/-* Embryos an Tag E10,5 beschrieben wurde (Arthur, Elce *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse bekräftigen das Vorhandensein einer basalen Calpain-Aktivität in Endothelzellen.

### 3.2. Auswirkungen der Calpain-Hemmung auf Cytoskelett- und Signalmoleküle

Die Steigerung der koronarvaskulären Permeabilität in Gegenwart von Calpain-Inhibitor legte die Vermutung nahe, daß ein basaler Abbau des „Linker-Proteins“  $\alpha$ -Fodrin in Endothelzellen schon unter Kontrollbedingungen auftritt, unter Ischämie/Reperfusion verstärkt wird und insgesamt nötig ist um eine flexible Anpassung einer Endothelzelle an die benachbarten Zellen zu ermöglichen. Eine Verhinderung dieser „Flexibilisierung“ der Endothelzellmembran bei Calpain-Hemmung und die daraus resultierende Übertragung der von Aktinfilamenten ausgeübten Kraft über  $\alpha$ -Fodrin auf integrale Membranproteine könnte demnach ein Zurückziehen und Abrunden der Zellen, und somit das koronare Leck, verursacht haben. Da Endothelzellen jedoch nur einen kleinen Teil des Gesamtextrakts der Herzen ausmachen, ist dieser Effekt möglicherweise verdeckt worden. Es war also nötig, reine Endothelzellkulturen auf einen basalen  $\alpha$ -Fodrin Abbau hin zu untersuchen. Mit CI behandelte HUVEC-Lysate zeigten allerdings keinen Unterschied des  $\alpha$ -Fodrin Gehalts im Vergleich zu Kontrollen (tritonlösliche Fraktion). Die Einschränkung der endothelialen Barrierefunktion nach Calpain-Hemmung mußte also durch andere Prozesse ausgelöst worden sein.

Die parazelluläre Permeabilität über das Endothel wird von verschiedenen integralen Membranproteinen, wie Occludin, VE-Cadherin, PECAM oder Integrinen entscheidend mitbestimmt (Abb. 23). Eine Modifikation dieser Proteine als Folge einer Aktivitätsänderung verschiedener Signalkaskadenmoleküle wie PKC, Rho, Rac oder Syk könnte in einer gesteigerten Permeabilität münden (Schnittler, 1998; Lum and Malik, 1994).

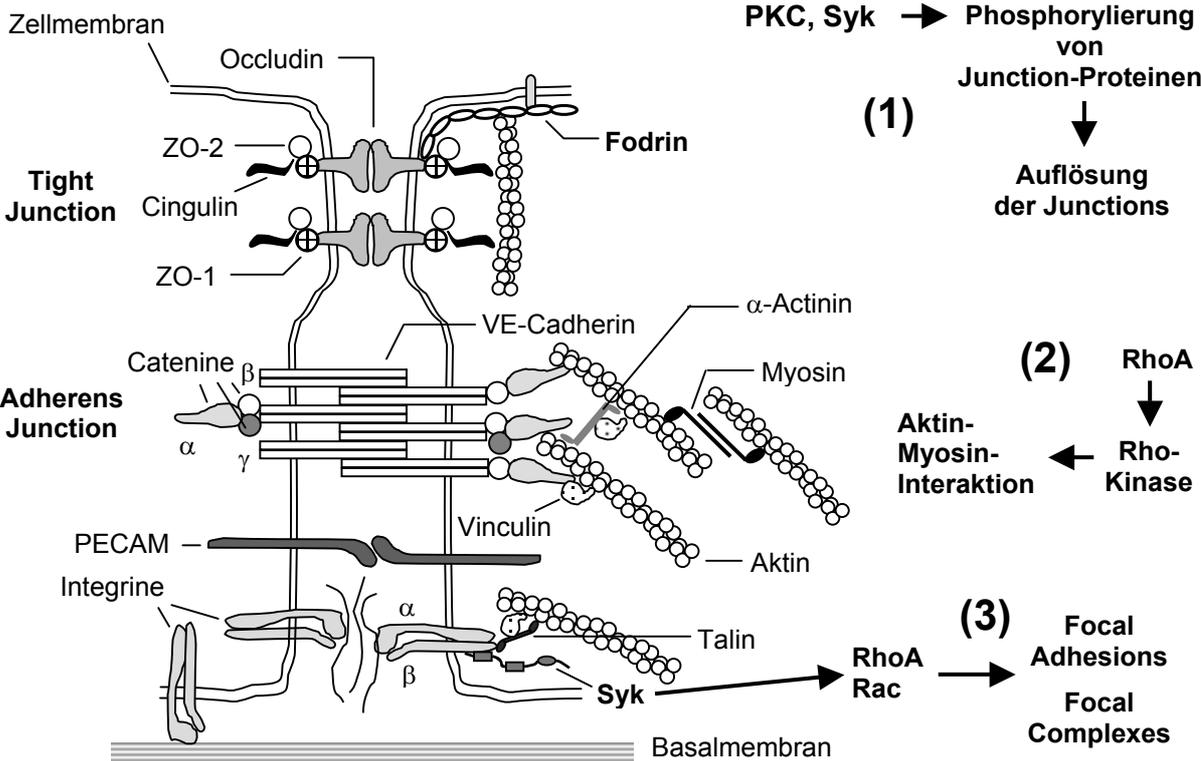


Abb 23: Schematische Darstellung der Verbindung zwischen Endothelzellen und mögliche Angriffspunkte die zur Leckbildung führen könnten [(1), (2), (3)].

In diesem Zusammenhang wurden weitere Untersuchungen an HUVEC durchgeführt, mit dem Ziel, zunächst die Lokalisation von Syk, Rho und Rac, sowie die Aktivität von Rho nach Calpain-Hemmung zu bestimmen.

Die nicht-rezeptorgekoppelte Tyrosinkinase Syk phosphoryliert eine Reihe von Zytoskelettproteinen (z. B. Paxilin,  $\alpha$ -Tubulin, Cortactin) sowie den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav1, der die Ausbildung von Lamellipodien auslösen soll (Fernandez and Suchard, 1998; Miranti *et al.*, 1998). Die Kinase ist außerdem mit Signalkaskaden von B- und T-Zell Rezeptoren sowie Integrinen gekoppelt (Gao *et al.*, 1997). In Plättchen kommt es nach Besetzung von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Integrinen mit Liganden oder durch Cluster-Bildung der Integrine über die Anlagerung von Syk an den zytoplasmatischen Teil des  $\beta$ -Integrins zu einer raschen Aktivierung der Tyrosinkinase (Gao *et al.*, 1997). Des weiteren sind  $\beta_2$ -Integrin abhängige

---

morphologische Veränderungen und der „respiratory burst“ von Neutrophilen essentiell mit Syk verknüpft (Fernandez and Suchard, 1998).

Immunfluoreszenzversuche zeigten nach Inkubation von HUVEC mit CI oder CPP eine Translokation dieser Kinase an die Zellmembran und in den mit CI behandelten Zellen auch eine Zunahme von Syk im Zytosol. Diese Beobachtungen konnten im Western Blot von Zelllysaten bestätigt werden. Behandlung der Zellen mit CI führte zu einem signifikanten Anstieg der Kinase in der Membranfraktion der Zellen, während sich in der zytosolischen Fraktion nur eine marginale, nicht signifikante Steigerung verzeichnen ließ. Diese Resultate lassen sich unschwer mit einem verminderten Abbau von Syk und somit einer Akkumulation des Proteins an der Zellmembran und zum Teil auch im Zytosol der Zellen erklären. Die Degradation von Syk ist für Calpain *in vitro* und für das Proteasom auch an Zellen beschrieben worden (Baldock *et al.*, 2000; Youssef *et al.*, 2002). Da Calpain-Inhibitor I Calpaine jedoch wesentlich effektiver hemmt als das Proteasom, dieses zudem im Zytosol lokalisiert ist und der calpain-spezifische Inhibitor CPP ebenfalls eine Translokation von Syk an die Membran auslöste, kann die Akkumulation der Tyrosinkinase an der Zellmembran nur durch die Hemmung von Calpain verursacht worden sein. Die nicht signifikante Zunahme von Syk im Zytosol der Zellen könnte auf eine teilweise Hemmung des dort lokalisierten Proteasoms durch CI zurückzuführen sein.

Die Akkumulation von Syk an der Zellmembran kann aber auch dadurch bedingt sein, daß Calpain-Hemmung die Loslösung der Tyrosinkinase von ihrem Wirkort verhindert und so eine Verlängerung der Kinase-Aktivität an der Membran hervorruft. So ist bekannt, daß Calpain - nach Interaktion von  $\beta_3$ -Integrinen mit der extrazellulären Matrix - aktiviert wird und daraufhin den zytoplasmatischen Teil der  $\beta_3$ -Integrine, an für die Bindung von Syk wichtigen Stellen spaltet (Du *et al.*, 1995; Bialkowska *et al.*, 2000; Woodside *et al.*, 2001).

Beide Alternativen weisen auf eine mögliche Regulation von Syk durch Calpaine, z.B. in Form einer räumlichen und zeitlichen Begrenzung der Kinase-Aktivität hin. Eine Hemmung der Calpaine würde demnach eine Verlängerung der Signaltransduktion über Syk bedeuten, die in den beobachteten morphologischen Veränderungen von HUVEC und somit in der Aufhebung der physiologischen, endothelialen Barrierefunktion, wie sie im intakten Koronarsystem zu sehen war, münden könnte.

---

Immunfluoreszenzfärbungen von mit CI oder CPP behandelten HUVEC zeigten auch für RhoA in einigen Zellen eine Translokation an die Zellmembran. Da dies normalerweise mit einer Aktivierung des G-Proteins gleichzusetzen ist (Sauzeau *et al.*, 2000; Takai *et al.*, 2001), wurde zusätzlich die Bestimmung der Rho-Aktivität mit einem „Pull-down-Assay“ durchgeführt. Hierbei ergab sich, daß die für den Rho-Aktivator Thrombin bekannte, drastische Erhöhung der Rho-Aktivität in HUVEC (~14fach nach 2min, Vouret-Craviari *et al.*, 2002) bei Calpain-Hemmung nicht zu erzielen war, sondern sich zu allen untersuchten Zeitpunkten und bei großer Streuung der Einzelwerte nur im Rahmen des 1,3-1,4 fachen von Kontrollen bewegte. Signifikanz erlangte der Aktivitätsanstieg nur unmittelbar nach Inkubation mit CI (2 Minuten). Kontrollversuche zur Überprüfung des Assays mit 20µM TRAP, einem am Thrombin-Rezeptor (Par-1) angreifenden Peptid, zeigten an HUVEC eine ausgeprägte Rho-Aktivierung nach 2 Minuten (~10fach, nicht gezeigt). Der Gesamtgehalt an Rho in den Zellen änderte sich im Western Blot nach Calpain-Inhibitor Behandlung nicht. Die schnell einsetzende Rho-Aktivierung steht jedoch im Einklang mit der durch CPP verursachten und schon nach 6 Minuten in HUVEC nahezu abgeschlossenen morphologischen Veränderung der Zellen (Abb. 17B). Eine über Rho-Kinase vermittelte Steigerung der Aktin-Myosin Interaktion und ein damit verbundener Anstieg der Krafteinwirkung auf die Zellen ist daher möglich und könnte zu der beobachteten Abrundung geführt haben. Ob es sich bei der Aktivitätssteigerung allerdings um die Hemmung der Rho-Spaltung durch Calpain (Kulkarni *et al.*, 2002) oder um eine durch andere Signalmoleküle (z.B. Syk) ausgelöste Aktivierung von Rho handelt, wird in weiteren Untersuchungen zu klären sein. Auch die Überprüfung der physiologischen Relevanz dieser sehr milden Aktivitätserhöhung durch Retraktionsstudien an Calpain-Inhibitor behandelten HUVEC mit Rho-Kinase Inhibitoren steht noch aus. Insgesamt muß jedoch festgestellt werden, daß die Calpain-Hemmung nur eine sehr kleine Aktivitätssteigerung von Rho auslöst, deren Ausmaß in keinem Fall der von Thrombin gleichkommt und möglicherweise auch nur einen Teil der Vorgänge, die zur Aufhebung der endothelialen Integrität nach Calpain-Hemmung führen beschreibt.

Die mikroskopische Auswertung der Färbung von Rac1 in HUVEC wies ebenfalls auf eine Translokation dieses G-Proteins an die Plasmamembran nach Inkubation der Zellen mit CI oder CPP hin. Auch für Rac wird nach der Aktivierung eine Verlagerung

---

an die Zellmembran postuliert (Takai *et al.*, 2001; del Pozo *et al.*, 2000), wo es die Bildung von Aktinfilamentnetzwerken und fokalen Komplexen in Lamellipodien induziert (Nobes and Hall, 1995; Machesky and Hall, 1997). Die Aktivierung dieses G-Proteins soll unter anderem durch die Kooperation von Syk und dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav1 ausgelöst werden und anschließend zur Ausbildung der Lamellipodien führen (Miranti *et al.*, 1998). Ein Zusammenhang zwischen der nach Calpain-Hemmung beobachteten Akkumulation von Syk in der Membranfraktion von HUVEC und der im Mikroskop sichtbaren Translokation von Rac an die Zellmembran erscheint denkbar und verleitet zu der Spekulation, daß eventuell auch eine erhöhte Rac-Aktivität für die Verminderung der endothelialen Barrierefunktion nach Calpain-Hemmung von Bedeutung sein könnte. Weitere Versuche, die eine erhöhte Aktivität von Rac und nachgeschalteter Signalwege nach Inkubation der Zellen mit Calpain-Inhibitoren belegen stehen allerdings noch aus.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß, ebenso wie die Versuche an den isolierten Herzen, auch die Untersuchungen an HUVEC für eine basale Calpain-Aktivität zur Aufrechterhaltung der Morphologie und der physiologischen Barrierefunktion der Endothelzellen sprechen.

#### **4. Spezifität und Permeabilität von Calpastatin-Peptid-Penetratin**

Die Effizienz des im jeweiligen Experiment eingesetzten Calpain-Inhibitors hängt entscheidend von seiner Spezifität und seiner Fähigkeit ab, die Zellmembran zu passieren. Die gängig eingesetzten Calpain-Inhibitoren, wie z.B. Calpain-Inhibitor I penetrieren zwar leicht in die Zelle, lassen aber die volle Calpain-Spezifität vermissen. In dieser Studie war es möglich, ein Kombinationsmolekül des spezifisch gegen Calpain gerichteten Calpastatin-Peptids (27aa, B-Peptid, s. A.1.3.), das Teil des endogenen Inhibitors ist und nahe des katalytischen Zentrums der Calpaine bindet (Maki *et al.*, 1989; Kawasaki *et al.*, 1989), und Penetratin (16aa Fragment aus der Homeodomäne des Drosophila-Transkriptionsfaktors Antennapedia) einzusetzen. Viele Untersuchungen haben bereits gezeigt, daß Penetratin Peptide von weniger als 100 Aminosäuren sehr effektiv in Zellen einschleusen kann (Prochiantz, 1996).

---

Studien, die die Spezifität und Zellgängigkeit des Calpastatin-Peptid-Penetratin Konjugats zeigen wurden bereits durchgeführt (S.Gil-Parrado, I. Assfalg-Machleidt und W.Machleidt; Lehrstuhl für physiologische Chemie; LMU München). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß das Calpastatin-Peptid-Penetratin Konjugat am isolierten Herzen bereits in einer Konzentration von 0,5µM eine deutliche inhibitorische Aktivität entfaltetete, während das unkonjugierte B-Peptid selbst in einer Konzentration von 3µM keinerlei Wirkung zeigte. Obwohl ein hemmender Effekt des unkonjugierten Calpastatin-Peptids auf isoliertes µ- und m-Calpain in vitro bereits in nanomolaren Konzentrationen beschrieben wurde, lagen die Mengen die für eine Calpain-Hemmung an intakten Zellen benötigt wurden um 50µM (Maki *et al.*, 1989; Eto *et al.*, 1995). Im Gegensatz hierzu benötigten wir für die Versuche an HUVEC nur 1µM des konjugierten Inhibitors, um Effekte hervorzurufen.

Die Kombination aus Calpastatin-Peptid und Penetratin ist somit ein gutes Beispiel wie absolute Calpain-Spezifität mit einer exzellenten Zellpermeabilität kombiniert werden kann. Einen zusätzlichen Vorteil für Untersuchungen an Zellen und isolierten Organen bietet CPP außerdem durch seine leichte Löslichkeit in Wasser. Die Verwendung dieses Inhibitors ermöglichte es, die mit CI gefundenen Ergebnisse zu bestätigen und einen tieferen Einblick in die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der Calpaine zu erhalten.

## **5. Einordnung der Ergebnisse in physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge**

Die mit den hier verwendeten Versuchsprotokollen gewonnenen Ergebnisse sprechen nicht für eine Aktivierung und Beteiligung der Calpaine am Reperfusionsschaden, weder in Form einer Beeinträchtigung der kontraktile Funktion noch durch die Ausbildung des koronaren Lecks. Vielmehr scheint eine konstitutive Aktivität dieser Proteasen eine bedeutende Rolle in der normalen und auch besonders in der postischämischen Endothelzellfunktion zu spielen: Erhaltene oder gar verstärkte Calpain-Aktivität dürfte der durch reaktive Sauerstoffverbindungen und inflammatorische Mediatoren hervorgerufenen Permeabilitätsstörung entgegenwirken. Allerdings konnte kürzlich in Rattenherzen durch Calpain-Hemmung eine verminderte Adhäsion von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) - vermutlich über endotheliales P-Selektin - an das Endothel nach

---

Ischämie/Reperfusion gezeigt werden, was zu einer Reduzierung des Reperfusionsschadens an den Herzen führte (Ikeda *et al.*, 2002). Versuche an einer Vielzahl von Zellen zeigen zudem, daß sowohl die Aktivierung und Aktivität von  $\mu$ - und m-Calpain als auch die jeweils gespaltenen Substrate von unterschiedlichen Faktoren abhängen: 1) dem Zelltyp, 2) dem Substrat, auf dem die Zellen wachsen, 3) ob es sich um suspendierte oder adhärenzte Zellen handelt, und 4) die zeitliche Einordnung der Calpain-Aktivität in die zellulären Prozesse. So können Calpaine in Zellen unter bestimmten Bedingungen die Bildung von Streßfasern hemmen, sie unter anderen Bedingungen jedoch auch fördern (Kulkarni *et al.*, 2002; Bialkowska *et al.*, 2000). Der in der Literatur postulierte Nutzen einer Calpain-Hemmung (Urthaler *et al.*, 1997; Iwamoto *et al.*, 1999) während einer Ischämie und darauffolgender Reperfusion scheint also von den jeweiligen experimentellen Bedingungen und den gemessenen Parametern abzuhängen. Ob die Hemmung dieser Enzyme einen guten therapeutischen Ansatz zur Reduktion des Reperfusionsschadens darstellt, wird in weiterführenden Studien zu klären sein.

Zusammengenommen sprechen alle bisher veröffentlichten Erkenntnisse über  $\mu$ - und m-Calpain - das ubiquitäre Vorkommen, der in fast allen Zelltypen mengenmäßig überwiegende, endogene Inhibitor Calpastatin, die große Anzahl von Substraten, die geringe Substratspezifität und die Aktivierung durch hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, Phospholipide oder möglicherweise den Phosphorylierungsgrad (Carafoli and Molinari, 1998; Khorchid and Ikura, 2002; Perrin and Huttenlocher, 2002; Glading *et al.*, 2002) sowie die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse - für eine unter physiologischen Bedingungen essentielle und lokal begrenzte Aktivität dieser Enzyme.

Selbst wenn eine pathologisch hohe Aktivität der Calpaine als verantwortlich für bestimmte Krankheitsbilder beschrieben ist (Huang and Wang, 2001), läßt sich dennoch abschließend feststellen, daß das Nicht-Vorhandensein („knock-out“, genetische Defekte) verschiedener Isozyme dieser Enzymfamilie zu massiven gesundheitlichen oder sogar letalen Folgen führt (Richard *et al.*, 1995; Horikawa *et al.*, 2000; Arthur, Elce *et al.*, 2000), und daß deshalb im Ganzen gesehen die physiologische Funktion dieser Proteasen im Vordergrund stehen dürfte.

## E. Zusammenfassung

Aus früheren Untersuchungen an isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen war bekannt, daß es bereits nach 15 minütiger Ischämie und darauffolgender Reperfusion zu einer Verminderung der Herzfunktion kommt, die sich durch die Gabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten signifikant verbessern läßt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der während Ischämie/Reperfusion ausgelösten dramatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zellen und der Funktionseinschränkung der Herzen war somit bestätigt. Des weiteren war bekannt, daß die neutralen Cysteinproteasen  $\mu$ - und m-Calpain für ihre Aktivierung und proteolytische Aktivität eine hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wie sie im Rahmen einer Ischämie und der anschließenden Reperfusion auftreten kann, benötigen. Zu den Substraten der Calpaine gehören u.a. verschiedene Proteine des Zytoskeletts und möglicherweise auch des kontraktile Apparates. Es erschien daher denkbar, daß die beobachtete Einschränkung der Herzfunktion nach Ischämie/Reperfusion zum Teil auf die proteolytische Aktivität dieser Enzyme zurückzuführen ist. Im Rahmen dieser Studie sollten deshalb die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

- (1) Kommt es im Rahmen einer 15 minütigen Ischämie und folgender Reperfusion zur Aktivierung der Proteasen  $\mu$ - und m-Calpain und welche Substrate wären von einer solchen, pathologischen Calpain-Aktivität betroffen?
- (2) Läßt sich eine mögliche durch Ischämie/Reperfusion ausgelöste Calpain-Aktivierung durch Gabe von Calpain-Inhibitoren verhindern und wäre dies für die Herzen mit ähnlich benefiziellen Effekten wie die Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten verbunden?

Zur Bearbeitung dieser Fragen stand das Modell des isoliert perfundierten Langendorff-Herzens zur Verfügung. Hiermit lassen sich sowohl Untersuchungen auf Proteinebene – durch Gewebeaufarbeitung der Herzen - als auch Studien zur koronarvaskulären Permeabilität durchführen. Die Untersuchung der Gewebeextrakte auf eine Aktivierung von  $\mu$ - und m-Calpain wurde mittels Zymographie und die Quantifizierung potentieller Calpain-Substrate (Calpastatin, Troponin I, Fodrin) wurde mittels Western Blot durchgeführt. Zur Bestimmung der

koronarvaskulären Permeabilität wurde die Transsudatbildung (Lymphe und interstitielle Flüssigkeit, die epikardial austritt und von der Herzspitze abtropft) quantifiziert. Fragen, die die mikrovaskuläre Funktion betrafen wurden zusätzlich an Kulturen humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) bearbeitet. Die Zellen wurden zum einen mikroskopisch mittels Phasenkontrast bzw. Immunfluoreszenz (Antikörper gegen Syk, RhoA, Rac1) untersucht, zum anderen wurden Zelllysate hergestellt und mittels Western Blot auf den Gehalt an  $\alpha$ -Fodrin und Syk sowie auf die Aktivität von Rho analysiert. Als Calpain-Inhibitoren kamen Calpain-Inhibitor I (CI) und das spezifische, zellgängige Konjugat aus Calpastatin-Peptid und Penetratin (CPP), zum Einsatz.

Aus den Untersuchungen ergaben sich die folgenden Befunde:

- (1) Im Zuge einer 15 minütigen Ischämie mit anschließender Reperfusion kommt es weder zu einer zymographisch detektierbaren Calpain-Aktivierung in den Herzen, noch zum Abbau des endogenen Calpain-Inhibitors Calpastatin oder des im kontraktilen Apparat lokalisierten kardialen Troponin I.
- (2) Es zeigte sich mit diesem Perfusionsprotokoll eine signifikante Abnahme des Zytoskelettproteins  $\alpha$ -Fodrin in der Membranfraktion der postischämischen Herzen im Vergleich zu Kontrollen. Diese Abnahme ließ sich jedoch durch Infusion von Calpain-Inhibitor I (12 $\mu$ M) nicht verhindern.
- (3) Bestimmung der Transsudatbildung volumenkonstant perfundierter, postischämischer Herzen deutete nicht auf die nach längerer Ischämie/Reperfusion bekannte Erhöhung der koronarvaskulären Permeabilität hin. Jedoch führte die Infusion von zwei verschiedenen Calpain-Inhibitoren (CI 12 $\mu$ M; CPP 0,5 $\mu$ M) jeweils zu einer signifikanten Steigerung des Transsudatflusses in den reperfundierten Herzen. Dieser Anstieg des Transsudats war ebenso bei Kontrollherzen (ohne Ischämie/Reperfusion) nach Perfusion mit dem einen oder anderen Inhibitor zu sehen. Auch die Ausbildung eines Ödems war nach Inhibitor-Infusion zu beobachten. Ein nach Perfusion mit Calpain-Inhibitor I beobachteter, längerdauernder Anstieg des Perfusionsdrucks der Herzen war bei CPP nur während der Infusion selbst zu erkennen.

- (4) Konfluente HUVEC-Kulturen, die mit CPP (1 $\mu$ M) behandelt wurden zeigten, verglichen mit Kontrollen, im Phasenkontrastmikroskop innerhalb weniger Minuten eine signifikante Erhöhung der Bildhelligkeit, bedingt durch ein Zurückziehen und Abrunden der Zellen.
- (5) Quantifizierung von  $\alpha$ -Fodrin in HUVEC, die mit bzw. ohne Calpain-Inhibitor I (12 $\mu$ M) inkubiert wurden, deutete nicht auf einen limitierten, steten Abbau dieses Proteins durch Calpain als Notwendigkeit für die Erhaltung einer normalen Endothelzellularfunktion hin.
- (6) Bei Behandlung von HUVEC mit CPP (1 $\mu$ M) oder Calpain-Inhibitor I (12 $\mu$ M) zeigte sich histologisch eine Translokation der Tyrosinkinase Syk und der G-Proteine RhoA und Rac1 an die Zellmembran.
- (7) Nach Inkubation von HUVEC mit Calpain-Inhibitor I (48 $\mu$ M) war im Western Blot ebenfalls eine Akkumulation von Syk in der Membranfraktion der Zellen und für Rho eine geringfügige Steigerung der Aktivität nach 2 minütiger Inkubation mit dem Inhibitor zu erkennen.

Zusammengenommen deuten sowohl die Daten aus den Herzversuchen als auch die Ergebnisse aus der Zellkultur nicht auf eine Beteiligung der Calpaine am Reperfusionsschaden hin, sondern legen vielmehr eine konstitutive Aktivität der Proteasen zur Erhaltung der endothelialen Barrierefunktion nahe. Diese Erkenntnis, daß Calpaine eine elementare Rolle bei der Aufrechterhaltung der koronarvaskulären Integrität – und hier besonderes nach Ischämie/Reperfusion - zu spielen scheinen, dient zum besseren Verständnis der physiologischen Regulation der vaskulären Permeabilität und eröffnet völlig neue Ausblicke für die Minderung postischämischer Ödembildung.

---

**F. Abkürzungen**

aa	Aminosäuren
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinder-Serum-Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CI	Calpain-Inhibitor I (=ALLN = N-acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO; MW = 383,5)
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CP	Calpastatin-Peptid (= 27 aa Peptid aus der B-Region von Calpastatin; MW = 3177,7; Ac-Asp-Pro-Met-Ser-Ser-Thr-Tyr-Ile-Glu-Glu-Leu-Gly-Lys-Arg-Glu-Val-Thr-Ile-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-Leu-Leu-Ala-NH <sub>2</sub> )
CPP	Calpastatin-Peptid-Penetratin (=Konjugat aus Calpastatin-Peptid und Penetratin; MW = 5668,78; Ac-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys S Lys-NH <sub>2</sub> S Ac-Cys-Asp-Pro-Met-Ser-Ser-Thr-Tyr-Ile-Glu-Glu-Leu-Gly-Lys-Arg -Glu-Val-Thr-Ile-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-Leu-Leu-Ala-NH <sub>2</sub> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithio-DL-threit(ol)
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FAK	focal adhesion kinase
H <sup>+</sup>	Proton
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (= <u>h</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium

---

kD	kilo Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
Na <sup>+</sup>	Natrium
NBCS	Neugeborenen Kälberserum (new born calf serum)
PA	Polyacrylamid
PBS <sup>+/-</sup>	Phosphatgepufferte Salzlösung
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PKC	Proteinkinase C
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> el- <u>E</u> lektrophorese
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
UE	Untereinheit
vs	versus (= gegenüber)
WB	Western Blot

---

## G. Literatur

Arthur JS, Crawford C. Investigation of the interaction of m-Calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1293: 201-206

Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C, Williams K, Greer PA. Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4474-4481

Arthur JS, Mykles DL. Calpain zymography with casein or fluorescein isothiocyanate casein. *Methods Mol Biol* 2000; 144: 109-116

Baki A, Tompa P, Alexa A, Molnar O, Friedrich P. Autolysis parallels activation of  $\mu$ -Calpain. *Biochem J* 1996; 318: 897-901

Baldock D, Graham B, Akhlaq M, Graff P, Jones CE, Menear K. Purification and characterization of human Syk produced using a baculovirus expression system. *Protein Expr Purif* 2000; 18: 86-94

Becker BF, Kupatt C, Massoudy P, Zahler S. Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion. *Z Kardiol* 2000; 89; Suppl. 9: IX/88-IX/91

Becker BF, Massoudy P, Permanetter B, Raschke P, Zahler S. Mögliche Bedeutung von Sauerstoffradikalen für den Reperfusionsschaden. *Z Kardiol* 1993; 82; Suppl 5: 49-58

Becker BF, Möbert J. Low-dose calcium antagonists reduce energy demand and cellular damage of isolated hearts during both ischemia and reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360: 287-294

Benetti R, Del Sal G, Monte M, Paroni G, Brancolini C, Schneider C. The death substrate *Gas2* binds m-Calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *Embo J* 2001; 20: 2702-2714

Bennett V. Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol Rev* 1990; 70: 1029-1065

Bialkowska K, Kulkarni S, Du X, Goll DE, Saido TC, Fox JE. Evidence that  $\beta_3$  integrin-induced Rac activation involves the Calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active. *J Cell Biol* 2000; 151: 685-696

Bolli R. Postischemic myocardial stunning: Pathogenesis, pathophysiology and clinical relevance. In: Yellon DM, Jennings RB (Hrsg.): *Myocardial Protection*. Raven Press Ltd., New York 1992; S. 105-149

Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* 1989; 65: 607-622

Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 609-634

Bolli R, Triana JF, Jeroudi MO. Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible ischemia: evidence for microvascular stunning. *Circ Res* 1990; 67: 332-343

Carafoli E, Molinari M. Breakthroughs and views: Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 193-203

Carragher NO, Frame MC. Calpain: a role in cell transformation and migration. *Internat J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1539-1543

Carrozza JP, Jr., Bentivegna LA, Williams CP, Kuntz RE, Grossman W, Morgan JP. Decreased myofilament responsiveness in myocardial stunning follows transient calcium overload during ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1992; 71: 1334-1340

Colman RW. Inhibitory and antiadhesive properties of human kininogens. *Immunopharmacol* 1996; 32: 9-18

Dauber IM, VanBenthuyzen KM, McMurtry IF, Wheeler GS, Lesnefsky EJ, Horwitz LD, Weil JV. Functional coronary microvascular injury evident as increased permeability due to brief ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990; 66: 986-998

Di Lisa F, De Tullio R, Salamino F, Barbato R, Melloni E, Siliprandi N, Schiaffino S, Pontremolli S. Specific degradation of troponin T and I by  $\mu$ -Calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochem J* 1995; 308: 57-61

Du X, Saido TC, Tsubuki S, Indig FE, Williams MJ, Ginsberg MH. Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin  $\beta_3$  subunit. *J Biol Chem* 1995; 270: 26146-26151

Eto A, Akita Y, Saido TC, Suzuki K, Kawashima S. The role of the calpain-calpastatin system in thyrotropin-releasing hormone-induced selective down-regulation of a protein kinase C isozyme, nPKC $\epsilon$ , in rat pituitary GH4C1 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 25115-25120

Fernandez R, Suchard SJ. Syk activation is required for spreading and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release in adherent human neutrophils. *J Immunol* 1998; 160: 5154-5162

Formigli L, Lombardo LD, Adembri C, Brunelleschi S, Ferrari E, Novelli GP. Neutrophils as mediators of human skeletal muscle ischemia-reperfusion syndrome. *Hum Pathol* 1992; 23: 627-634

Fox KAA. Reperfusion injury: laboratory phenomenon or clinical reality? *Cardiovasc Res* 1992; 26: 656-659

Fujitani K, Kambayashi J, Sakon M, Ohmi SI, Kawashima S, Yukawa M, Yano Y, Miyoshi H, Ikeda M, Shinoki N, Monden M. Identification of  $\mu$ -, m-Calpains and calpastatin and capture of  $\mu$ -Calpain activation in endothelial cells. *J Cell Biochem* 1997; 66: 197-209

Gao J, Zoller KE, Ginsberg MH, Brugge JS, Shattil SJ. Regulation of the pp72<sup>syk</sup> protein tyrosine kinase by platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *Embo J* 1997; 16: 6414-6425

Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. Cutting to the chase: Calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 46-54

Guroff G. A neutral, calcium-activated Proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem* 1964; 239: 149-155

Hayashi M, Suzuki H, Kawashima S, Saido TC, Inomata M. The behavior of Calpain-generated N- and C-terminal fragments of talin in integrin-mediated signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* 1999; 371: 133-141

Hearse DJ. Myocardial injury during ischemia and reperfusion: concepts and controversies. In: Yellon DM, Jennings RB. (Hrsg.): *Myocardial Protection*. Raven Press Ltd., New York 1992; S. 13-35

Heindl B, Zahler S, Welsch U, Becker BF. Disparate effects of adhesion and degranulation of platelets on myocardial and coronary function in postischemic hearts. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 383-394

Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, ..., Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000 ; 26: 163-175

Huang Y, Wang KKW. The Calpain family and human disease. *Trends Mol Med* 2001; 7: 355-362

Ikeda Y, Young LH, Lefler AM. Attenuation of neutrophil-mediated myocardial ischemia-reperfusion injury by a calpain inhibitor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1421-H1426

Iwamoto H, Miura T, Okamura T, Shirakawa K, Iwatate M, Kawamura S, Tatsuno H, Ikeda Y, Matsuzaki M. Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemic/reperfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33: 580-586

Jackson CV, Mickelson JK, Pope TK, Rao PS, Lucchesi BR. O<sub>2</sub> free radical-mediated myocardial and vascular dysfunction. *Am J Physiol* 1986; 251: H1225-H1231

Johnson GV, Guttman RP. Calpains: intact and active? *BioEssays* 1997; 19: 1011-1018

- Katrukha A, Bereznikova A, Filatov V, Esakova T. Biochemical factors influencing measurement of cardiac Troponin I in Serum. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 1091-1095
- Kawasaki H, Emori Y, Imajoh-Ohmi S, Minami Y, Suzuki K. Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease. *J Biochem* 1989; 106: 274-281
- Khorchid A, Ikura M. How Calpain is activated by calcium. *Nature Struct Biol* 2002; 9: 239-241
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; 218: 325-329
- Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; 54: 1496-1508
- Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 641-655
- Kulkarni S, Goll DE, Fox JE. Calpain cleaves RhoA generating a dominant negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. *J Biol Chem* 2002; 277: 24435-24441
- Kulkarni S, Saido TC, Suzuki K, Fox JE. Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members. *J Biol Chem* 1999; 274: 21265-21275
- Kupatt C, Zahler S, Seligmann C, Massoudy P, Becker BF, Gerlach E. Nitric oxide mitigates leukocyte adhesion and vascular leak after myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 643-654
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685
- Leipert B, Becker BF, Gerlach E. Different endothelial mechanisms involved in coronary responses to known vasodilators. *Am J Physiol* 1992; 262: H1676-H1683
- Lum H, Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 1994; 267: L223-L241
- Ma H, Yang HQ, Takano E, Hatanaka M, Maki M. Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 24430-24436
- Machesky LM, Hall A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol* 1997; 138: 913-926

---

Maki M, Bagci H, Hamaguchi K, Ueda M, Murachi T, Hatanaka M. Inhibition of Calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene. *J Biol Chem* 1989; 264: 18866-18869

Maki M, Takano E, Osawa T, Ooi T, Murachi T, Hatanaka M. Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1988; 263: 10254-10261

Massoudy P, Becker BF, Seligmann C, Gerlach E. Preischemic as well as postischemic application of a calcium antagonist affords cardioprotection in the isolated guinea pig heart. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 577-582

Massoudy P, Mempel T, Raschke P, Becker BF. Reduction of oxygen delivery during post-ischemic reperfusion protects the isolated guinea pig heart. *Basic Res Cardiol* 1999; 94: 231-237

Massoudy P, Zahler S, Kupatt C, Reder E, Becker BF, Gerlach E. Cardioprotection by cyclosporine A in experimental ischemia and reperfusion – evidence for a nitric oxide-dependent mechanism mediated by endothelin. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 535-544

Mehlhorn U, Geissler HJ, Laine GA, Allen SJ. Myocardial fluid balance. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 20: 1220-1230

Melloni E, Averna M, Salamino F, Sparatore B, Minafra R, Pontremoli S. Acyl-CoA-binding protein is a potent m-Calpain activator. *J Biol Chem* 2000; 275: 82-86

Melloni E, Michetti M, Salamino F, Pontremoli S. Molecular and functional properties of a Calpain activator protein specific for  $\mu$ - isoforms. *J Biol Chem* 1998; 273: 12827-12831

Miranti CK, Leng L, Maschberger P, Brugge JS, Shattil SJ. Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol* 1998; 8: 1289-1299

Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL. A  $\text{Ca}^{2+}$  switch aligns the active site of Calpain. *Cell* 2002; 108: 649-660

Nakagawa K, Masumoto H, Sorimachi H, Suzuki K. Dissociation of m-Calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. *J Biochem* 2001; 130: 605-611

Nakamura M, Inomata M, Imajoh S, Suzuki K, Kawashima S. Fragmentation of an endogenous inhibitor upon complex formation with high- and low- $\text{Ca}^{2+}$ -requiring forms of calcium-activated neutral proteases. *Biochem* 1989; 28: 449-455

Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol* 1992; 263: H1356-H1362

---

Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995; 81: 53-62

Perrin BJ, Huttenlocher A. Molecules in focus: Calpain. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 1262: 1-4

Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 1975; 56: 740-750

Piper HM, Siegmund B, Ladilov YV, Schlüter KD. Myocardial protection during reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 44: 15-19

del Pozo MA, Price LS, Alderson NB, Ren XD, Schwartz MA. Adhesion of the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J* 2000; 19: 2008-2014

Prochiantz A. Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 629-634

Raser KJ, Posner A, Wang KKW. Casein zymography: a method to study  $\mu$ -Calpain, m-Calpain, and their inhibitory agents. *Arch Biochem Biophys* 1995; 1: 211-216

Reverter D, Sorimachi H, Bode W. The structure of calcium-free human m-Calpain. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 222-229

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995; 81: 27-40

Saido TC, Yokota M, Nagao S, Yamaura I, Tani E, Tsuchiya T, Suzuki K, Kawashima S. Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. *J Biol Chem* 1993; 268: 25239-25243

Sato K, Kawashima S. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol Chem* 2001; 382: 743-751

Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced  $Ca^{2+}$  sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2000; 275: 21722-21729

Schneeberger H, Illner WD, Abendroth D, Bulkley G, Rutili F, Williams M, Thiel M, Land W. First clinical experiences with superoxide dismutase in kidney transplantation – results of a double-blind randomized study. *Transplant Proc* 1989; 21: 1245-1246

- Schnittler HJ. Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol* 1998; 93; Suppl 3: 30-39
- Schoenwaelder SM, Yuan Y, Jackson SP. Calpain regulation of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  signalling in human platelets. *Platelets* 2000; 11: 189-198
- Shiraha H, Glading A, Chou J, Jia Z, Wells A. Activation of m-Calpain (Calpain II) by epidermal growth factor is limited by Protein Kinase A phosphorylation of m-Calpain. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2716-2727
- Somlyo AV. New roads leading to  $Ca^{2+}$  sensitization . *Circ Res* 2002; 91: 83-84
- Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of Calpains. *Biochem J* 1997; 328: 721-732
- Sorimachi Y, Harada K, Saïdo TC, Ono T, Kawashima S, Yoshida K. Downregulation of Calpastatin in rat heart after brief ischemia and reperfusion. *J Biochem* 1997; 122: 743-748
- Stewart DJ, Pohl U, Bassenge E. Free radicals inhibit endothelium-dependent dilation in the coronary resistance bed. *Am J Physiol* 1988; 255: H765-H769
- Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, Irie A, Sorimachi H, Bourenkow G, Bartunik H, Suzuki K, Bode W. The crystal structure of calcium-free human m-Calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 588-592
- Suzuki K, Saïdo TC, Hirai S. Modulation of cellular signals by Calpain. *Annu Proc New York Acad Sci* 1992; 674: 218-227
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153-208
- Takano E, Maki M, Mori H, Htanaka M, Marti T, Titani K, Kannagi R, Ooi T, Murachi T. Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem* 1988; 27: 1964-1972
- Tennant R, Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* 1935; 112: 351-361
- Thomas SA, Fallavollita JA, Lee T, Feng J, Canty JM, Jr. Absence of troponin I degradation or altered sarcoplasmic reticulum uptake protein expression after reversible ischemia in swine. *Circ Res* 1999; 85: 446-456
- Tompa P, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K, Friedrich P. Domain III of Calpain is a  $Ca^{2+}$ -regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 1333-1339

- 
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354
- Urthaler F, Wolkowicz PE, Digerness SB, Harris KD, Walker AA. MDL-28170, a membrane-permeant Calpain inhibitor, attenuates stunning and PKC $\epsilon$  proteolysis in reperfused ferret hearts. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 60-67
- Vouret-Craviari V, Bourcier C, Boulter E, Van Obberghen-Schilling E. Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci* 2002; 115: 2475-2484
- White HD. Reperfusion injury – a reply to Keith Fox. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 660-661
- Woodside DG, Oberfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS, Shattil SJ, Ginsberg MH. Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin  $\beta$  cytoplasmic domains. *Curr Biol* 2001; 11: 1799-1804
- Wu S, Sangermann J, Li M, Brough GH, Goodman SR, Stevens T. Essential control of an endothelial cell I<sub>soc</sub> by the spectrin membrane skeleton. *J Cell Biol* 2001; 154: 1225-1233
- Yoshida K, Harada K. Proteolysis of erythrocyte-type and brain-type ankyrins in rat heart after postischemic reperfusion. *J Biochem* 1997; 122: 279-285
- Yoshida K, Inui M, Harada K, Saido TC, Sorimachi Y, Ishihara T, Kawashima S, Sobue K. Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by Calpain. *Circ Res* 1995; 77: 603-610
- Youssef LA, Wilson BS, Oliver JM. Proteasome-dependent regulation of Syk tyrosine kinase levels in human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 366-373
- Zahler S, Kupatt C, Becker BF. ACE-inhibition attenuates cardiac cell damage and preserves release of NO in the postischemic heart. *Immunopharmacol* 1999; 44: 27-33
- Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1404-1407

## H. Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Physiologie am Lehrstuhl für Vegetative Physiologie der Ludwig-Maximilians-Universität erstellt. In diesem Rahmen möchte ich Herrn Prof. Dr. U. Pohl für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut danken.

Mein Dank gilt ebenso der Deutschen Forschungsgesellschaft, die mir durch Förderung des SFB 469 die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Betreuern – Herrn Prof. Dr. B.F. Becker und Herrn PD Dr. S. Zahler – für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung bedanken. Die ausgewogene Mischung aus kritischer Anleitung und Gelegenheit zum selbständigen Experimentieren, die mir in dieser Arbeitsgruppe zuteil wurde, hat wesentlich zum Gelingen dieses Ausbildungsabschnitts beigetragen.

Ebenso möchte ich mich bei Frau V. Frei und Frau D. Gössel für die hervorragende technische Assistenz bedanken.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. T. Gloe, Herrn Dr. M. Keller und Herrn Dr. S. Bolz für die vielen anregenden Gespräche sowie ihre experimentelle und materielle Hilfe.

Bei Frau Dr. D. Gabrijelcic-Geiger vom Institut für Klinische Biochemie der LMU München möchte ich mich für die experimentelle Anleitung, die sie mir in meiner Anfangszeit gab, und die großzügige Überlassung diverser Antikörper ganz herzlich bedanken.

Für die Herstellung des spezifischen Calpain-Inhibitors (CPP) möchte ich Herrn Prof. Dr. L. Moroder und seiner Arbeitsgruppe vom MPI für Biochemie herzlich danken.

Zuletzt geht mein Dank an meine Kollegin Frau S. Gilles sowie alle anderen Mitarbeiter des Instituts für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung, die entscheidend zum guten Arbeitsklima beigetragen haben.

Meinem Freund Fritz Scheuermann danke ich für die gute Verpflegung, sein geduldiges Zuhören und die aufbauenden Worte.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern für die Unterstützung meiner Ausbildung und die Anteilnahme an meiner Arbeit.

## **I. Aus der Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen**

### **1. Originalarbeiten:**

Becker BF, Gilles S, Gonscherowski V, Gabrijelcic-Geiger D, Sommerhoff CP, Welsch U, Zahler S. Assessing experimental models in myocardial injury: Lack of activation of the proteases TACE and calpain in brief ischemia and reperfusion. Heart, Lung and Circulation (angenommen Mai 2002)

Gonscherowski V, Becker BF, Moroder L, Gloe T, Keller M, Zahler S. Calpains – a physiological regulator of the endothelial barrier. (eingereicht)

### **2. Kongressbeiträge und Abstracts:**

Gonscherowski V, Zahler S, Becker BF (2001) Activity of calpain in postischemic reperfused guinea pig hearts. Pflügers Arch – Europ J Physiol 441 (Suppl): R246

Gonscherowski V, Zahler S, Becker BF (2001) Activation of myocardial calpains may lead to degradation of troponin I in postischemic reperfused guinea pig hearts. Basic Res Cardiol 96 (Suppl. 1): 1/10

Gonscherowski V, Zahler S, Becker BF (2001) Actions of Calpains during ischemia/reperfusion of isolated guinea pig hearts. Abstract band of the 2<sup>nd</sup> General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS) and the International Conference on Protease Inhibitors (ICPI) Oct. 31<sup>st</sup> – Nov. 4<sup>th</sup>, Freising, Germany.

Gonscherowski V, Zahler S, Moroder L, Becker BF (2002) Role of calpains in reperfusion injury and vascular permeability of isolated guinea pig hearts. Pflügers Arch – Europ J Physiol 443: S296

## **J. Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name: Vera Gonscherowski  
Geburtsdatum: 03.07.1972  
Geburtsort: München  
Familienstand: Ledig  
Eltern: Kurt Erich Gonscherowski, Dipl. Ing. Maschinenbau  
Elisabeth Gonscherowski, Fotografin

### Schulbildung

1979 – 1983 Grundschole Haar  
1983 – 1992 Ernst-Mach-Gymnasium Haar  
Abschluß: allgemeine Hochschulreife

### Studium

1993 – 1998 Studium der Pharmazie; Ludwig-Maximilians-Universität München  
12/08/ – 10/09/1993 Famulatur, Anker-Apotheke, Haar  
04/04 – 29/04/1994 Famulatur, Krankenhausapotheke, BKH Haar  
11/1995 – 03/1996 Studentische Hilfskraft an der LMU München, Institut für pharmazeutische Biologie, Zellkultur, Prof. Dr. M. Zenk  
11/1997 – 04/1998 Pharmaziepraktikantin, Anker-Apotheke, Haar  
05/1998 – 10/1998 Pharmaziepraktikantin, Klinge Pharma GmbH, München  
12/1998 Abschluß des Studiums als approbierte Apothekerin

### Berufliche Tätigkeit

01/1999 – 02/1999 Salvator-Apotheke, München  
03/1999 – 03/2000 Marien-Apotheke, München  
seit 07/2000 Teilzeitbeschäftigung, 9 Stunden monatlich, Anker-Apotheke, Haar  
seit 04/2000 Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für vegetative Physiologie, Promotion in der Humanbiologie bei Prof. Dr. B.F. Becker