Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B
des Zentrums für Innere Medizin
(Leiter Univ. Prof. Dr. S. Felix)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Aktivitätsprofil von Calpain I und II im chronisch infarzierten Rattenmyokard – Einfluss des Calpaininhibitors CAL 9961

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Medizinischen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2003

vorgelegt von Freerk Prenzel
geb. am 26.12.1975
in Kiel

Dekan: Univ. Prof. Dr. H. K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Felix

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Unger

3. Gutachter: Prof. Dr. Fritz

Ort, Raum: Klinik für Innere Medizin B Greifswald, Seminarraum

Tag der Disputation: 25.6. 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **6**

1.1 Epidemiologie des akuten Myokardinfarkts 6

1.2 Definition, Ätiologie und Pathogenese des Myokardinfarkts 6

1.3 Diagnose und aktuelle Therapie des akuten Myokardinfarkts 12

1.4 Calpain 14

1.5 Ziele der Arbeit 19

2. Materialien und Methoden **20**

2.1 Studiendesign 20

2.2 Induktion von akutem Myokardinfarkt an Ratten 23

2.3 Chromatographische Trennung von Calpain I und II 24

2.4 Identifizierung von Calpain in den Fraktionen mittels Western blot 25

2.5 Enzymassay 28

2.6 Test von CAL 9961 in vitro 30

2.7 Statistische Analyse 30

3. Ergebnisse **31**

3.1 Etablierung von chromatographischer Trennung und Enzymassay 31

3.1.1 AMC-Substrat wird durch Calpain Ca^{2+}-abhängig umgesetzt 31

3.1.2 AMC-Konzentration und Fluoreszenz verhalten sich linear 32

3.1.3 Glycerin-Zusatz verhindert Proteinpräzipitation 32

3.1.4 Niedrige pH-Werte und hohe Salzkonzentrationen hemmen die Enzymaktivität 33

3.1.5 Enzymassay entspricht quantitativem Testverfahren 33

3.2 Aktivitätsprofil kardialer Calpaine nach Myokardinfarkt 35

3.2.1 Calpain I und II können chromatographisch getrennt werden - Identifizierung der Enzyme in den Fraktionen durch Western blot 35

3.2.2 Calpainaktivität nach Myokardinfarkt in Überständen von Septum und Ventrikelwand erhöht 35
3.2.3 Höhere Calpain I-Aktivität in IS-Fraktionen mit Maximum nach 14 Tagen und höhere Calpain II-Aktivität in LVFW-Fraktionen mit Maximum nach 3 Tagen 36
3.3 Effekte von CAL 9961 41
3.3.1 CAL 9961 hemmt beide Calpainformen in vitro 41
3.3.2 CAL 9961 hemmt die Calpain-Gesamtaktivität in vivo 41
3.3.3 CAL 9961 hemmt beide Calpainformen in vivo 42
3.3.4 CAL 9961-Behandlung reduziert kardiale Hypertrophie nach Myokardinfarkt 42

4. Diskussion 44
4.1 Detektion und chromatographische Trennung von Calpain I und II 44
4.2 Calpain I im nicht infarzierten Myokard nach Infarkt 46
4.3 Calpain II im infarzierten Myokard 47
4.4 Auswirkungen des Calpaininhibitors CAL 9961 auf kardiale Calpaine 49

5. Zusammenfassung 52

6. Literaturverzeichnis 54

7. Eidesstattliche Erklärung 79

8. Lebenslauf 80

9. Danksagung 82

Abkürzungen

al.	alii / aliae
AMC	7-Amino-4-Methyl-Coumarin
ATP	Adenosintriphosphat
BW	body weight
Calp.	Calpain
d	Tag
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
Ig	Immunglobulin
IS	interventrikuläres Septum
LVFW	linksventrikuläre, freie Wand
MI	Myokardinfarkt
OP	Operation
S.A.M.	Standardabweichung vom Mittelwert
THW	total heart weight
Tris	Hydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyethylen-glycol-sorbitan-monolaurat, Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
Suc-Leu-Tyr	Succinyl-Leucin-Tyrosin
vs.	versus

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des akuten Myokardinfarkts

Jährlich erleiden etwa 250 000 Patienten in der Bundesrepublik Deutschland einen Myokardinfarkt [1]. Die Hälfte aller betroffenen Patienten verstirbt an diesem Ereignis [2]. Damit ist der akute Myokardinfarkt eine der häufigsten Einzeltodesursachen in der Bundesrepublik überhaupt[2,3].

Auch weltweit ist die ischämische Herzkrankheit, zu der der akute Myokardinfarkt gehört, die führende Todesursache [4] und ihr Anteil wird sich laut Hochrechnungen in den nächsten Jahrzehnten weiter vergrößern [5].

Zwar ist die Mortalität der Infarktpatienten seit 1960 kontinuierlich gesunken, jedoch hat sich dieser Trend verlangsamt [6], und bei der Zunahme der Lebenserwartung und der Umkehr der Alterspyramide in vielen Industrienationen ist eine Zunahme von Inzidenz und Prävalenz zu erwarten [3,7].

1.2 Definition, Ätiologie und Pathogenese

Ein Myokardinfarkt ist eine ischämische Myokardnekrose, der meist eine vorbestehende koronare Herzkrankheit zugrunde liegt [8]. Das Aufbrechen eines arteriosklerotischen Atheroms führt zur lokalen Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie zur Freisetzung vasokonstriktiver und mitogener Substanzen wie Thromboxan A_2, Serotonin, Thrombin oder platelet-derived growth factor (PDGF). Bei gleichzeitigem relativen Mangel an Prostacyclin (PGI_2), tissue plasminogen activator (t-PA), and endothelium-derived relaxing factor (EDRF, NO) entsteht dadurch ein persistierender Gefäßverschluss als Ursache für die Ischämie im von diesem Gefäß versorgten Gewebe [9-11]. Nur in etwa einem Zehntel der Fälle ist ein Myokardinfarkt nicht mit einer arteriosklerotischen Plaque assoziiert und auf zahlreiche andere Erkrankungen zurückzuführen [12].

Man unterscheidet nach dem Auftreten von typischen Q-Wellen im EKG zwischen so genannten Q-wave-Infarkten und non-Q-wave-Infarkten. Erstere sind dabei häufiger

transmurale, alle Wandschichten durchsetzende Infarkte [11]. Hierbei treten die Q-Wellen als Folge der Nekrose von elektromotorischem Gewebe auf [13]. Non-Q-wave-Infarkte sind eher nicht transmurale Infarkte [11], in deren subendokardialen Bereich die Koronarreserve am frühesten ausgeschöpft ist. Dieser Bereich ist daher bei Ischämie besonders nekrosegefährdet und bildet auch bei transmuralen Infarkten den Ausgangspunkt einer von subendokardial nach epikardial fortschreitenden Nekrose [14,15].
Ferner unterscheidet man zwischen Infarkten, die mit einer deutlichen ST-Hebung im EKG einhergehen (ST-elevation-Infarkte, STEMI) und solchen, bei der dieses Charakteristikum fehlt (NSTEMI). Letztere werden von einer instabilen Angina pectoris durch das Auftreten von biochemischen Infarktmarkern im Blut unterschieden. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff des akuten Koronarsyndroms geprägt [16], dessen Konzept einen Rahmen für die Unterscheidung zwischen instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt und die entsprechende Therapie bietet [17,18].
Die Ischämietoleranz ist variabel, beginnend nach fünfzehn Minuten und fortschreitend über drei bis sechs Stunden bildet sich aber bei komplettem Gefäßverschluss eine transmurale Nekrose aus (Abb. 1) [15], in deren Bereich sich im Verlauf von zwei Wochen bis drei Monaten eine gräuliche, schrumpfende Narbe entwickelt [19].
Ein kompletter Gefäßverschluss betrifft die Koronargefäße in unterschiedlicher Häufigkeit : Ramus interventricularis anterior in 40-50%, Arteria coronaria dextra in 30-40% und Ramus circumflexus sinister in 15-20% [20]. Bei drei Vierteln der Patienten, die an einem akuten Myokardinfarkt verstarben, finden sich in der Obduktion jedoch mehr als ein Koronargefäß mit einer kritischen Stenose [21].

Die Symptome eines akuten Myokardinfarktes sind retrosternaler Schmerz [22] (bis zu 25% der Infarkte verlaufen jedoch stumm [23]), Schwächegefühl, Angst sowie vegetative Reaktionen wie Schwitzen, Übelkeit und Erbrechen [24]. Hinzu können die Symptome von Herzrhythmusstörungen [25] und einer akuten Linksherzinsuffizienz [26] bis hin zum kardiogenen Schock treten [27].

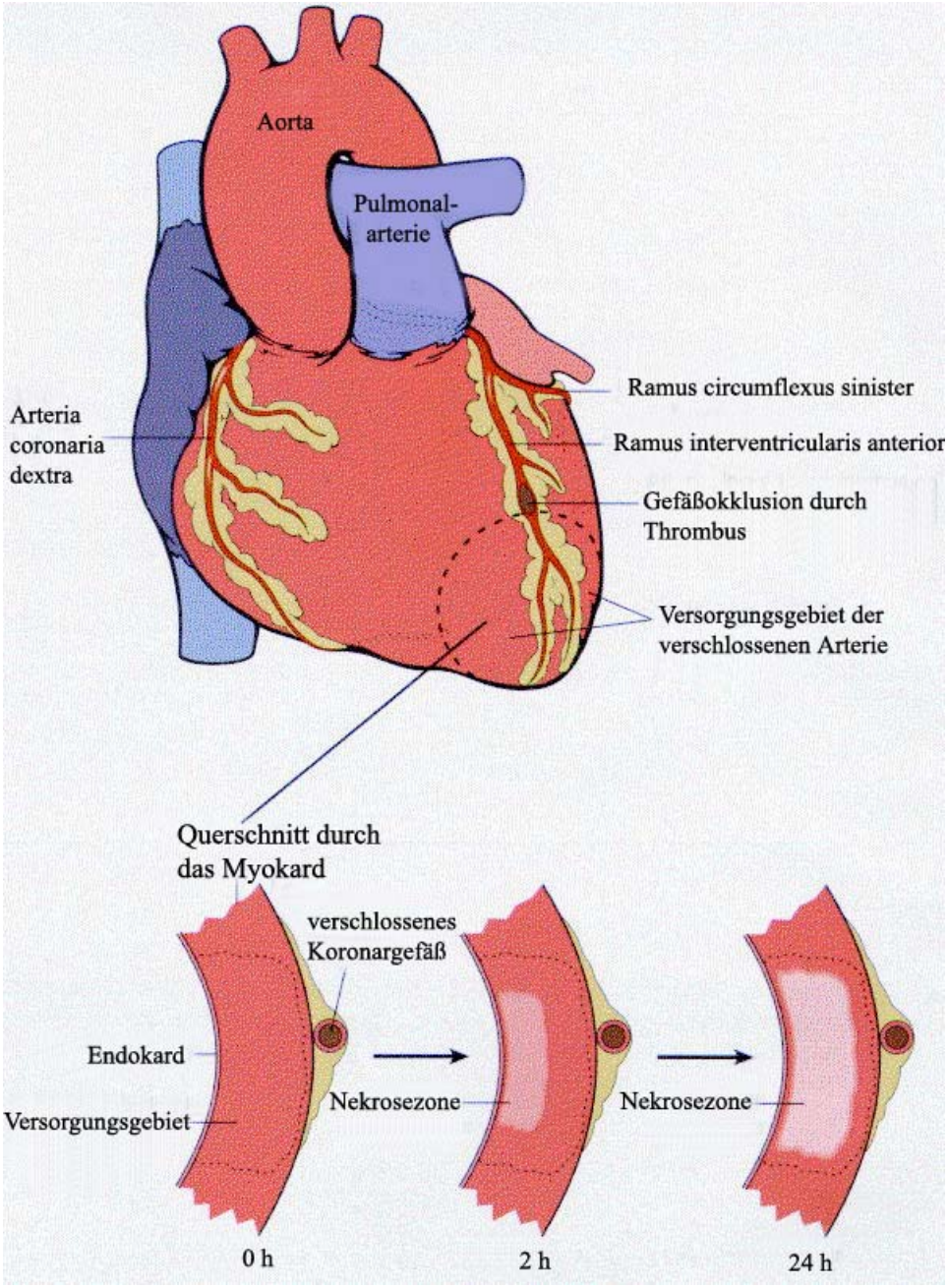


Abb. 1: Schematische Darstellung des Fortschreitens der myokardialen Nekrose nach koronararteriellem Verschluss. Die Nekrose beginnt in einer Zone unterhalb des Endokards im Zentrum des ischämischen Areals. Die Größe dieses Areals (gestrichelte Linie) hängt vom jeweils versorgenden Gefäß ab. Eine schmale Zone direkt unter dem Endokard ist von der Nekrose ausgespart, da diese per Diffusion vom Ventrikel aus versorgt wird [20].

Auf zellulärer Ebene kommt es nach Unterbrechung der Koronardurchblutung im Rahmen eines Myokardinfarktes zur Erschöpfung der Bestände an energiereichen Phosphaten, da der Energiestoffwechsel von Glukose- und Fettsäureoxidation auf die anaerobe Glykolyse umgestellt wird [28]. Es folgt ein Anstieg der lokalen Kohlenstoffdioxidkonzentration, eine Anreicherung von Lipiden, Laktat- und Phosphationen und eine zunehmende intrazelluläre Azidose [29,30]. Das Gleichgewicht der zytosolischen Ionen ist gestört, Mitochondrien und sarkoplasmatisches Retikulum werden durch die entstehenden Stoffwechselprodukte geschädigt [31,32]. Aufgrund der gestörten Ionenaustausch- und transportmechanismen, die zu einer intrazellulären Anreicherung von H^+-, Ca^{2+}- und Na^+-Ionen führen, kommt es infolge osmotischer Schwellung zum Zellhydrops [28]. Das Zusammenbrechen des Elektrolytgradienten ist im EKG als ST-Hebung zu sehen [25]. Ischämie und intrazelluläre Azidose führen zur Aktivierung von zellschädigenden Phospholipasen und Proteasen, deren Aktivität durch die niedrigen pH-Werte jedoch initial noch gehemmt ist („pH-Paradoxon“) [32,33].

Insbesondere den Ca^{2+}-Ionen kommt bei den Schädigungsmechanismen eine entscheidende Bedeutung zu. Ca^{2+}-Ionen spielen unter physiologischen Bedingungen eine zentrale Rolle als so genannte second messenger in zahlreichen zellulären mechanischen, metabolischen und regulatorischen Prozessen [34,35]. Störungen der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration führen zur Dysregulation der Zellfunktionen und beeinträchtigen die Lebensfähigkeit der Zellen. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration im Rahmen eines Myokardinfarktes [36] ist auf die beeinträchtigte Wiederaufnahme von Ca^{2+}-Ionen in das sarkoplasmatische Retikulum durch die sarkoplasmatische Ca^{2+}-ATPase einerseits [31] und auf die herabgesetzte Aktivität der Na^+-K^+-ATPase [37] sowie die gesteigerte Aktivität des Na^+-H^+-Austauschers zurückzuführen [38]. Die beiden letztgenannten Mechanismen führen zu einem intrazellulären Überschuss an Na^+-Ionen, die durch einen Na^+-Ca^{2+}-Antiporter gegen Ca^{2+}-Ionen ausgetauscht werden [38]. Die daraus resultierende Überladung der Myozyten mit Ca^{2+}-Ionen kann zur Aktivierung von Ca^{2+}-abhängigen Proteasen wie Calpain führen, mit der Folge der Schädigung von myokardialen Proteinen [39].

Bei der nach Infarkt zunehmenden Fragilität von Plasmalemm und Zellorganellen, der Ruptur von Zytoskelett und der Fragmentierung von Sarkomeren und Myofibrillen [40,41] spielen jedoch auch Entzündungsvorgänge eine Rolle. Entzündungsmetabolite wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-α), Interleukin-1 (IL-1) und Transforming-Groth-

Factor-β1 (TGF- β1) werden freigesetzt [42], anfallende freie Sauerstoffradikale [43] und eine Infiltration und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [44] tragen zu den genannten Zellschäden bei.
All diese Mechanismen haben die von Reimer & Jennings beobachtete Zellnekrose und den Verlust von myokardialer Struktur und Funktion zur Konsequenz [45].

Umgeben wird die Nekrosezone von einem perinekrotischen Bereich (area at risk) mit reversibel geschädigten Myozyten [15], die sich zum Teil in einem Dauerkontraktionszustand befinden [46]. Insbesondere in dieser Randzone aber auch in Infarkt-fernen Bezirken finden in erheblichem Maße apoptotische Prozesse statt, durch die es zu einem persistierenden Verlust von Myozyten kommt [47-49]. Daher werden die Apoptoseprozesse, in die auch die Protease Calpain involviert ist [50], mit kardialen Umbauvorgängen und ventrikulärer Dysfunktion in Verbindung gebracht [47,49].
Nekrose- und Apoptosevorgänge ziehen unmittelbar funktionelle Folgen nach sich. So kommt es im Infarktareal zu pathologischen Kontraktionsmustern wie Hypo- oder Dyskinesie [51,52]. Sind ausreichend große Areale betroffen, beeinträchtigt dies die linksventrikuläre Pumpfunktion [21]. Darüber hinaus kann es auch im nicht-infarzierten Myokard zu prolongierten Funktionsstörungen kommen, die als „stunning“ bezeichnet werden [53]. Bleibt die koronare Durchblutung auch nach Infarktereignis reduziert, kann sich das Myokard nicht wieder erholen und verharrt in einem Zustand der „hibernation“ genannt wird und der die ventrikuläre Dysfunktion beschreibt [54].
Eine unmittelbar nach akutem Myokardinfarkt gestörte kardiale Pumpfunktion äußert sich in einer reduzierten Ejektionsfraktion, erniedrigtem Blutdruck und einem herabgesetzten Gipfel im Druck-Zeit-Diagramm bei gleichzeitig erhöhtem endsystolischen Blutvolumen [51]. Letzteres bedingt einen erhöhten Ventrikeldurchmesser, gleichzeitig dünnt sich die Ventrikelwand durch ein seitliches Verschieben der Myozyten sowie durch Nekrose und Apoptose aus [55]. Diese Kombination führt in Übereinstimmung mit dem LaPlace´schen Gesetz zu einer achtfach erhöhten Wandspannung, die wiederum zu einer ventrikulären Dilatation führt [56]. Daraus entwickelt sich bei manchen Patienten ein Teufelskreis, der in akuter Herzinsuffizienz, kardiogenem Schock und Herzrhythmusstörungen enden kann [57,58]. Arrhythmien sind im Rahmen eines Myokardinfarktes eine häufige Todesursache [59] und

können auch durch Substanzen wie Kalium, cyclisches Adenosinmonophosphat, Calcium oder Laktat ausgelöst werden, die sich bei Ischämie anreichern [60].

Nachdem ischämisches Myokard Sekunden nach dem Infarktereignis zunächst an Festigkeit einbüßt, nimmt diese in der Folge aufgrund von myokardialem Ödem und myofibrillärer Kontraktion wieder zu [61]. Von diesen akuten Mechanismen werden die im weiteren Verlauf eintretenden Prozesse unterschieden und in ihrer Gesamtheit als „Remodeling“ bezeichnet.

Remodeling stellt einen komplexen Prozess im Herzen dar, der Veränderungen in Struktur, Konfiguration und Topographie auf globaler Ebene und Veränderungen in Myozyten und anderen Zellen auf zellulärer und subzellulärer Ebene beinhaltet [62].

In einer frühen Phase nach akutem Myokardinfarkts verformt und vergrößert sich das Ventrikellumen durch Ausdünnung und Dehnung des infarzierten Areals [63,64] aufgrund von funktionellen und strukturellen Veränderungen der kardialen Muskelfasern [65]. Gleichzeitig beginnen die narbigen Heilungsprozesse durch die Proliferation von Bindegewebszellen wie Fibroblasten und der Produktion von Kollagenfasern [66], die die Reißfestigkeit des Gewebes erhöhen [67]. Neben den reparativen Vorgängen im infarzierten Myokard erfasst die Fibrose jedoch auch nicht-infarzierte Areale, in denen ebenfalls erhebliche Mengen an Kollagen abgelagert werden [68].

Zunehmend tragen auch die späten Veränderungen im nicht-infarzierten Myokard zur Dilatation des Herzens bei [69]: Die kontraktilen Elemente nehmen an Länge zu und die Ventrikelgeometrie wird zunehmend kugelförmig [70]. Die Myozyten beider Ventrikel hypertrophieren aufgrund einer gesteigerten Druck- und Volumenbelastung [71].

Mitursächlich für kardiales Remodeling nach akutem Myokardinfarkt sind vermehrt freigesetzte Hormone: Gesteigerte Aktivität von Angiotensin-Converting-Enzyme in Myozyten und Entzündungszellen nach Myokardinfarkt führt zu erhöhten Werten von Angiotensin II, das über AT-1- und AT-2-Rezeptoren unter anderem kardiale Hypertrophie, Fibrose und Apoptose induziert [72] sowie eine Heraufregulierung kardialer Calpaine vermittelt [73]. Aldosteron [74], Endothelin [75] und Katecholamine [76] wirken ebenfalls profibrotisch und tragen zum Remodeling bei.

Apoptosevorgänge spielen in der Pathogenese des kardialen Remodelings ebenfalls eine wesentliche Rolle [77]. So kommt es zum Beispiel in einer Initialphase kardialer Hypertrophie zu einer Welle von Apoptose unter Myozyten [78].

Obschon die Mechanismen des Remodelings als Adaptationsreaktion des Herzen der Aufrechterhaltung der Pumpfunktion dienen [79,80], führen die strukturellen Veränderungen langfristig zu gegenteiligen Effekten wie Herzinsuffizienz und Arrhythmien [58] und sind mit einer herabgesetzten Lebenserwartung assoziiert [81].

1.3 Diagnose und aktuelle Therapie des akuten Myokardinfarktes

Die Diagnose und Therapie des typischen akuten Myokardinfarkts erfolgt anhand von Richtlinien wie sie von der European Society of Cardiology [8] oder der American Heart Association / American College of Cardiology [82] herausgegeben werden und kontinuierlich aktualisiert werden.
Die Diagnose fußt danach auf drei Säulen:

1. Klinisch typischer retrosternaler Schmerz, der durch die Gabe von Nitroglycerin nicht zu kupieren ist.
2. Pathologische Zeichen im EKG wie ST-Hebungen, neu aufgetretener linksfaszikulärer Block oder Q-Wellen.
3. Typischer Anstieg von biochemischen Markern wie der Troponine i und t oder der kardialen Creatinkinase (CK-MB).

Da der akute Myokardinfarkt häufig atypisch verläuft, wurden entsprechende Algorithmen entwickelt, nach denen eine Infarktwahrscheinlichkeit eingeschätzt, eine Risikostratifikation vorgenommen und eine entsprechende Therapie zugeordnet wird [17,83]. Hierbei kommen in einer initialen Phase auch andere diagnostische Methoden wie die Echokardiographie oder die myokardiale Perfusionsszintigraphie zum Einsatz.
Die in den Richtlinien der europäischen und amerikanischen Fachgesellschaften empfohlenen therapeutischen Maßnahmen sind durch zahlreiche randomisierte Studien und Meta-Analysen auf Wirksamkeit getestet und hinsichtlich Mortalität als vorteilhaft angesehen worden. Etwaige Einschränkungen sind in den Richtlinien aufgeführt.

Die Therapie des akuten Myokardinfarktes wird in eine prähospitale beziehungsweise frühe Phase und eine hospitale Phase eingeteilt. In erstere fallen Maßnahmen wie die Anwendung von Nitraten, die über eine Venodilatation zu einer Reduktion von rechts- und linksventrikulärer Vorlast und damit zu einem verminderten Sauerstoffbedarf

führen [83,84]. Zusätzlich wirken Nitrate vasodilatatorisch auf Koronargefäße, fördern die Durchblutung über kollaterale Gefäße und inhibieren Thrombozytenaggregation und Vasospasmen [83,85].

Eine suffiziente Schmerzbekämpfung durch Opioide hilft ebenfalls den myokardialen Sauerstoffbedarf zu senken, indem die Aktivierung des sympathischen Nervensystems gedämpft wird [82,86]. Sauerstoff, nasal oder per Maske verabreicht, kann einen Beitrag leisten die Infarktgröße zu limitieren [87]. Unter Umständen ist auch die Gabe von Beta-Blockern, Antiemetika und Sedativa indiziert [8,88].

Eine Antikoagulationstherapie mit Acetylsalicylsäure, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infarkt begonnen wird, trägt über eine antithrombotische und inhibitorische Wirkung auf Thromboxan A_2 zu einer erheblichen Mortalitätssenkung bei [82,89].

Eine Thrombolyse als Reperfusionstherapie kann bei entsprechenden Voraussetzungen bereits prähospital begonnen werden [82,90] oder wird schnellstmöglich im Krankenhaus eingeleitet [8]. Durch die Verabreichung von thrombolytischen Substanzen wie Reteplase oder Tenecteplase wird Plasminogen aktiviert, was über die Auflösung des Thrombus und Aufrechterhaltung der Rekanalisierung [91,92] zu einer deutlichen Prognoseverbesserung führt [93]. Diese Therapie kann mit Heparin kombiniert werden, das in Verbindung mit Antithrombin III den aktivierten Gerinnungsfaktor Xa und Thrombin hemmt [8,82].

In der hospitalen Phase werden die bereits eingeleiteten Maßnahmen fortgesetzt und ergänzt. Pharmakotherapeutisch spielen dabei noch Thrombozytenaggregationshemmer wie ADP-Rezeptor-Antagonisten und Glykoproteinrezeptor IIa/IIIb-Inhibitoren eine Rolle, sowie die bereits in einer akuten Phase mortalitätssenkenden ACE-Hemmer [82,94].

In kardiologischen Zentren besteht die Möglichkeit einer perkutanen koronaren Intervention (PCI), die als primäre Koronarintervention vor oder begleitend zu einer Thrombolysetherapie durchgeführt wird und die mit dem Einbringen von Stents in ein Koronargefäß kombiniert werden kann [8]. Sie stellt durch die erhebliche Senkung der Mortalität die bevorzugte Therapieform des akuten Myokardinfarkts dar [8,95]. Eine sekundäre Koronarintervention nach erfolgloser Thrombolysetherapie kann ebenfalls noch vorteilhaft sein [96].

Nicht durchführbare oder fehlgeschlagener Koronarintervention, plötzliche Okklusion einer Koronararterie bei Katheterisierung und kardiogener Schock bei ausgewählten

Patienten sind Indikationen zur koronararteriellen Bypass-Anlage, die auch im Zusammenhang mit anderen kardiochirurgischen Maßnahmen bei mechanischen Defekten nach Infarkt durchgeführt wird [8].

Darüber hinaus beinhalten die Richtlinien der Fachgesellschaften Strategien zur Beherrschung von Komplikationen des akuten Myokardinfarkts wie Arrhythmien, Herz-Kreislauf-Stillstand, Rupturen des Herzens oder Pumpversagen und kardiogener Schock [8,82].

1.4 Calpain

Calpain, abgeleitet vom ursprünglichen Namen Calcium-activated, neutral and intracellular cysteine proteinase [97], wurde 1964 von Guroff zum ersten Mal in Rinderhirn beschrieben [98]. 1975 folgte die erste Dokumentation im Herzmuskel [99]. Nach ersten Versuchen der Isolierung und Charakterisierung [100,101] wurde durch Mellgren erstmals eine zweite Form des Enzyms entdeckt [102].

Inzwischen sind 14 Mitglieder der Calpain-Familie in Säugern bekannt, davon alle auch im Menschen [103].

Die Calpaine sind Cysteinproteasen und gehören strukturell in dieselbe Subgruppe (Clan) wie Papain [104].

Am besten charakterisiert sind das von Guroff entdeckte Calpain I und das von Mellgren beschriebene Calpain II, die ubiquitär in menschlichen Zellen vorkommen [103] und sich in ihrem Bedarf an Calcium zur Aktivierung unterscheiden: Calpain I benötigt mikromolare Konzentrationen von Ca^{2+}-Ionen und wird deswegen auch µ-Calpain genannt, während Calpain II oder m-Calpain millimolare Konzentrationen zur vollen proteolytischen Aktivität braucht [105]. Obschon sich Calpain I und II auch in ihrem Aminosäureaufbau [106], in ihrer Aminosäuresequenz [107] und in ihren immunologischen Eigenschaften [108] unterscheiden, weisen beide große strukturelle Ähnlichkeiten auf: Beide Enzyme sind Heterodimere mit einer großen katalytischen 80 kDa- und einer kleinen regulatorischen 28 (30) kDa-Einheit [109].

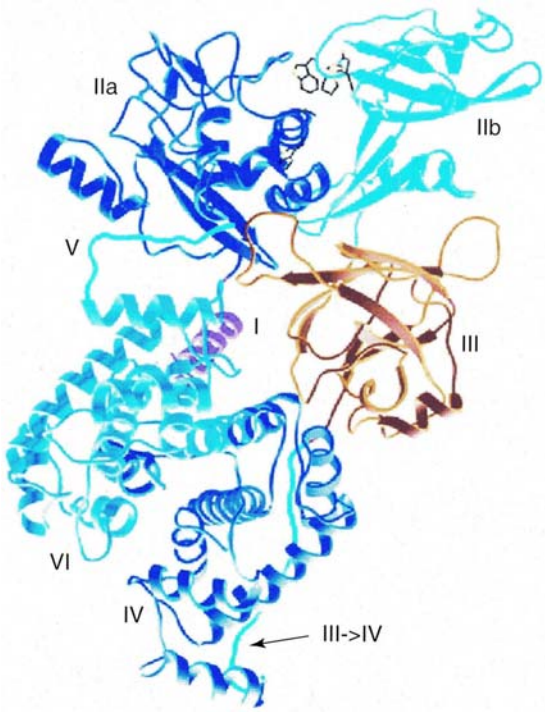


Abb. 2: Dreidimensionale Struktur von humanem Calpain II in Abwesenheit von Calcium. Gezeigt sind die verschiedenen Domänen I-VI, die Unterdomänen IIa und IIb, sowie die Verbindungsregion zwischen Domäne III und IV [103].

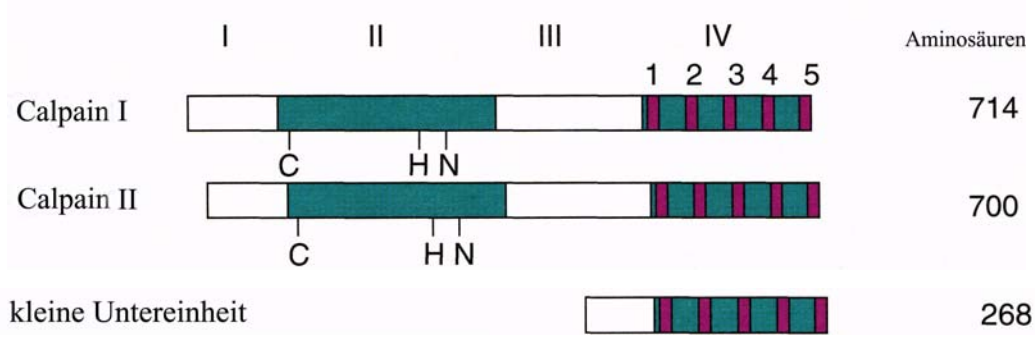


Abb. 3: Schematische Strukturen von Calpain I und II sowie der homologen kleinen Untereinheit. C, N und H bezeichnen die katalytischen Cystein-, Histidin- und Asparaginreste. In Domäne IV sowie in Domäne VI der kleinen Untereinheit sind die fünf EF-hand-Strukturen nummeriert [103].

Erstere ist aus 714 (Calpain I) beziehungsweise 700 (Calpain II) Aminosäuren aufgebaut und ist spezifisch für jede Calpainform [110-112]. Die 80 kDa-Einheit besteht aus vier Domänen: Domäne I stellt ein NH_2-terminales Propeptid dar, Domäne II beinhaltet die aktive, proteolytische Stelle und Domäne III ist eine Ca^{2+}-regulierte Phospholipid bindende Domäne. Domäne IV weist fünf Calcium bindende so genannte EF-hand Strukturen auf wie sie auch in Calmodulin vorkommen [103,113].

Die regulatorische 28 kDa-Einheit ist aus 268 Aminosäuren aufgebaut und allen Calpainformen gemein [103,114]. Sie besteht aus zwei Domänen, einer hydrophoben Domäne V zur Interaktion mit Zellmembranen [115] und der Domäne VI, die große Homologien zur Domäne IV der 80 kDa-Einheit aufweist und ebenfalls Calcium binden kann [114]. Domäne VI ist mit dieser Domäne IV über eine der EF-hand Strukturen verbunden [116].

Die Aktivierung der Calpaine steht offenbar in engem Zusammenhang mit ihrer Lokalisation in der Zelle. Unter physiologischen Bedingungen liegt ein Großteil des Calpains verteilt im Zytoplasma vor und zu einem kleineren Teil gebunden an die Zellmembran [112,117]. Unter ischämischen Bedingungen konnten Calpaine vorwiegend an den Zellmembranen nachgewiesen werden [118]. Nach einem Modell von Suzuki & Sorimachi [119] kommt es bei erhöhten intrazellulären Calciumkonzentrationen zu einer Bindung der Ionen an Calpain und in der Folge zu einer Verlagerung an die Zellmembran (Abb. 4). Phospholipide der Zellmembranen wie Phosphatidylinositol (PIP_2) vermögen mit Calpain zu interagieren und deren Bedarf an Ca^{2+}-Ionen zur Aktivierung beziehungsweise zur Autolyse zu senken [120,121]. Eine Autolyse beider Calpainformen, ebenfalls in Gegenwart von Ca^{2+}- Ionen, besteht in dem N-terminalen Abbau von Aminosäuren, der sich in der Reduktion der 80 kDa-Einheit zu 76-78 kDa und der 28 kDa-Einheit zu 18 kDa ausdrückt [122,123]. Die Folge ist eine erhöhte proteolytische Aktivität und wiederum ein erniedrigter Bedarf an Calcium [124]. Die Autolyse wird auch durch membranständige Aktivatorproteine gefördert, die jeweils für Calpain I und Calpain II spezifisch sind und ebenfalls den Ca^{2+}-Bedarf senken [125,126]. Ferner findet unter dem Einfluss von Ca^{2+}-Ionen eine Dissoziation beider Untereinheiten statt, wobei die große Untereinheit in eine aktivierte Form überführt wird und ins Zytosol freigesetzt wird [119,127].

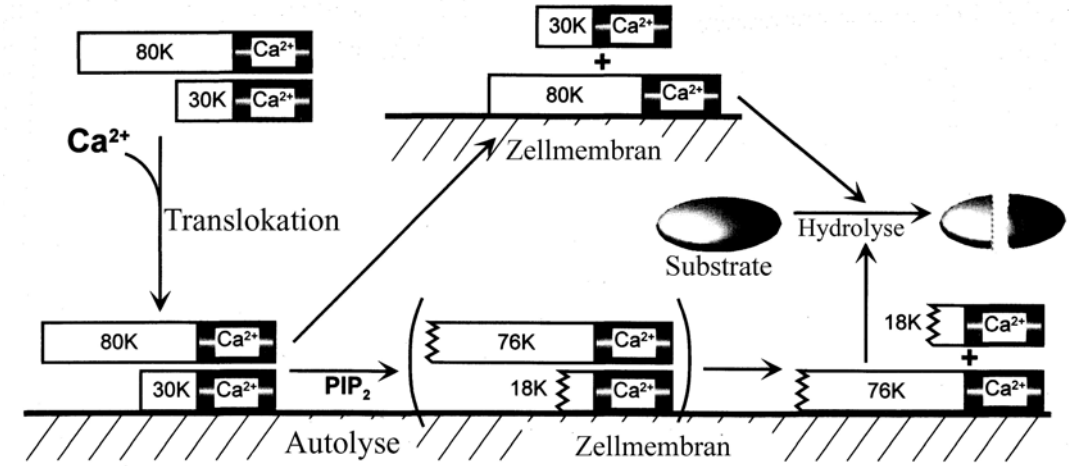


Abb. 4: Aktivierung von Calpain durch Ca^{2+}-Ionen. Nach Ca^{2+}-Bindung folgt eine Translokation von Calpain zur Zellmembran, wo die weiteren Aktivierungsschritte Dissoziation und Autolyse stattfinden [119,128].

Diese Mechanismen sind insbesondere deshalb wichtig, da Calpaine in ihrer Grundform nur geringe proteolytische Aktivität zeigen und zur Aktivierung unphysiologisch hohe Ca^{2+}-Konzentrationen benötigen, aber dennoch auch unter physiologischen Bedingungen aktiv sind [119]. Weitere Aktivierungsfaktoren wie zum Beispiel DNA [129] wurden beschrieben, sind aber bisher wenig verstanden [119].

Calpaine werden ferner auch durch Calpastatin reguliert, das 1978 erstmals von Waxman und Krebs beschrieben wurde [130]. Es handelt sich dabei um einen spezifischen, endogenen Calpaininhibitor, der in verschiedenen Formen ebenfalls ubiquitär in Zellen vorkommt [112,123] und in Zytosol und an den Zellmembranen lokalisiert ist [131]. Calpastatin kommt im Herzen als 84 kDa und 110 kDa schweres Molekül vor und kann mehrere Ca^{2+}-gebundene Calpainmoleküle reversibel binden [105,112]. Im physiologischen Zustand übersteigt die Calpastatinaktivität die Aktivität der beiden kardialen Calpaine zusammen [112]. Unter pathologischen Bedingungen dagegen konnte eine Verschiebung dieses Gleichgewichts beobachtet werden [123], so zum Beispiel auch bei kardialer Ischämie, bei der es zu gesteigerter Calpainaktivität und reduzierter Calpastatinaktivität kommt [132,133]. Dabei scheint ein proteolytischer Abbau von Calpastatin durch Calpaine eine Rolle zu spielen [133].

Viele der Regulationsmechanismen der Calpaine sind jedoch weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung und nicht endgültig geklärt [112].

Ebenso ist das Wissen über die physiologischen Funktionen augrund der komplizierten Zuordnung von spezifischen Substraten zu Calpain in vivo begrenzt [123]. Eine Reihe von Zielstrukturen der Calpaine sind jedoch inzwischen bekannt. Dazu gehören Proteine des Zytoskeletts (wie Spectrin, Dystrophin und Mikrotubulus-assoziierte Proteine), Membranrezeptoren (wie Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und Ionentransporter), Enzyme (wie Kinasen, Phosphatasen und Phospholipasen) sowie Signalmoleküle (wie Transkriptionsfaktoren) [112,134].

Teils durch Modifikation, teils durch Abbau dieser Substrate spielt Calpain bei einer Vielzahl von physiologischen Abläufen eine Rolle, so etwa im Zellzyklus, bei der Thrombozytenaggregation und bei Bahnungsvorgängen im Gehirn [103]. Ferner ist Calpain beteiligt am Umbau des Zellskeletts, bei der Zelldifferenzierung, -proliferation und –migration sowie bei der Signaltransduktion [112,135-137]. Schließlich kommt Calpain auch eine Funktion bei Zelltod und Apoptose zu [112,137].

Eine große Bedeutung hat Calpain auch in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen (Tab. 1).

Tab.1: Mitglieder der Calpainfamilie und Erkrankungen, in deren Pathogenese die Calpainformen von Bedeutung sind [103,112,138,139].

Calpain	**Erkrankung**
Calpain 1	Apoplex, traumatische Hirnschäden, Morbus Alzheimer, Katarakt, Multiple Sklerose, Myokardinfarkt
Calpain 2	Apoplex, traumatische Hirnschäden, Morbus Alzheimer, Katarakt, rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Myokardinfarkt
Calpain 3	Hüftgürtel-Muskeldystrophie 2A, Katarakt
Calpain 9	Magenkarzinom
Calpain 8/10	Diabetes mellitus Typ II

Bei vielen dieser Erkrankungen kommt es auf zellulärer Ebene zu einer Störung der Calcium-Homöostase [112], so auch bei den ischämischen Herzkrankheiten wie dem Myokardinfarkt. Nach einem Infarktereignis kommt es zu einem deutlichen

intrazellulären Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration [36]. Die Calciumüberladung führt über die Aktivierung der im Herzen vorhandenen Calpainformen I und II zu Zellschäden und Zelltod [112,140].

1.5 Ziele der Arbeit

Zahlreiche Studien belegen, dass Calpain I und II bei kardialer Ischämie und akutem Myokardinfarkt zu Gewebeschäden, Nekrose und Apoptose beitragen [39,112]. Darüber hinaus scheint Calpain I eine Rolle beim kardialen Remodeling nach Myokardinfarkt zu spielen [73]. In den bisherigen Studien wurden jedoch weder die regionalen noch die zeitlichen Unterschiede der Calpainaktivität untersucht. Wie in der Einleitung dargelegt, finden jedoch im infarzierten Myokard, im „area at risk“ und im Infarkt-fernen Myokard pathophysiologisch sehr unterschiedliche Prozesse statt. Ziel dieser Arbeit war es daher, diese regionalen und temporalen Veränderungen der Calpainaktivität nach akutem Myokardinfarkt zu untersuchen.

Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass die Anwendung von Calpaininhibitoren eine Proteolyse myokardialer Proteine reduzieren, Infarktgröße begrenzen und eine kardiale Dysfunktion nach Infarkt verhindern konnte [141-143].

Im Gegensatz zu etablierten Therapiemethoden sollen Calpaininhibitoren die enzymatischen Ursachen von Gewebeschäden verhindern. Schwierigkeiten beim Einsatz von Calpaininhibitoren sind jedoch ihre geringe Spezifität, mangelnde Zellpenetration, Toxizität für vitale Zellen und Probleme bei der Verabreichung [144]. Daher ist die Entwicklung neuer Calpaininhibitoren Gegenstand aktueller Forschung [141,145].

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte des selektiven, zellpermeablen Calpaininhibitors CAL 9961 in vitro und in vivo im ischämischen und nicht-ischämischen Herz zu untersuchen, um die Fähigkeit dieser Substanz, Calpain nach Myokardinfarkt zu hemmen, einschätzen zu können.

2. Materialien und Methoden

In dieser Studie wurde an Ratten durch Ligation der linken Koronararterie ein akuter Myokardinfarkt induziert. Ein, 3, 7 und 14 Tagen nach Infarkt wurden die Herzen entnommen und die Enzyme Calpain I und II von Homogenaten des interventrikulären Septums und der freien linken Ventrikelwand mittels Chromatographie auf DEAE-Sepharose getrennt. Die Enzymaktivität wurde in einem Assay mit spezifischem Substrat gemessen.

2.1 Studiendesign

Als Versuchstiere wurden in der Studie ausschließlich männliche Wistar-Ratten mit einem anfänglichen Gewicht von 230-270 g verwendet. Alle Experimente fanden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz in seiner letzten Form von 1993 statt. Die Tiere wurden in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit in Einzelkäfigen gehalten und hatten freien Zugang zu einer Standardnahrung (Altromin®, Altromin GmbH, Lage-Lippe, Deutschland) und zu Trinkwasser.
Die Versuchstiere wurden randomisiert in neun Gruppen eingeteilt, wobei die Anzahl der Tiere pro Gruppe bei 6-8 lag (n = 6-8 pro Gruppe).

Gruppe1	Scheinoperation ohne Behandlung
Gruppe 2-5	Myokardinfarkt (MI) mit Placebobehandlung (0,9% Kochsalzlösung)
Gruppe 6-9	Myokardinfarkt (MI) mit Calpaininhibitor-Behandlung (CAL 9961, 15 mg kg^{-1} d^{-1})

CAL 9961 ist ein neuer, selektiver, zellpermeabler Calpaininhibitor, der von der Firma BASF-Knoll AG (jetzt Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland) in

Pulverform zur Verfügung gestellt wurde. Die Inhibitorkonstante (K_i) wurde von der Firma mit 200 nM für Calpain I und 25 nM für Calpain II angegeben und die ermittelte wirksame Dosis des Inhibitors mit 15 mg kg^{-1} d^{-1} beziffert.
Von CAL 9961 wurde mit 0,9%iger Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland) eine Stocklösung mit der Konzentration von 10 mg mL^{-1} angelegt und bei 4° C im Kühlschrank vor Licht geschützt gelagert.
Die Behandlung mit CAL 9961 beziehungsweise mit 0,9%iger Kochsalzlösung (Placebo) wurde drei Tage vor der Induktion des Myokardinfarktes begonnen und bis zur Herzentnahme weitergeführt. CAL 9961 wurde täglich nach dem Wiegen der Tiere gewichtsadaptiert subkutan an verschiedenen Stellen injiziert (1,5 mL kg^{-1}, Resorptionsrate laut Knoll AG nahezu 100%). Den Tieren der Gruppen 2-5 wurde eine entsprechende Menge an 0,9%iger Kochsalzlösung subkutan verabreicht.

Nach einer Woche der Haltung in Einzelkäfigen wurde bei den Versuchstieren der Gruppen 2-5 und 6-9 ein Myokardinfarkt induziert, bei den Tieren der Gruppe 1 eine Scheinoperation durchgeführt. Nach 1, 3, 7 und 14 Tagen wurden die Herzen jeweils einer Versuchsgruppe entnommen sowie zu jedem dieser Zeitpunkte zwei Herzen der scheinoperierten Tiere.

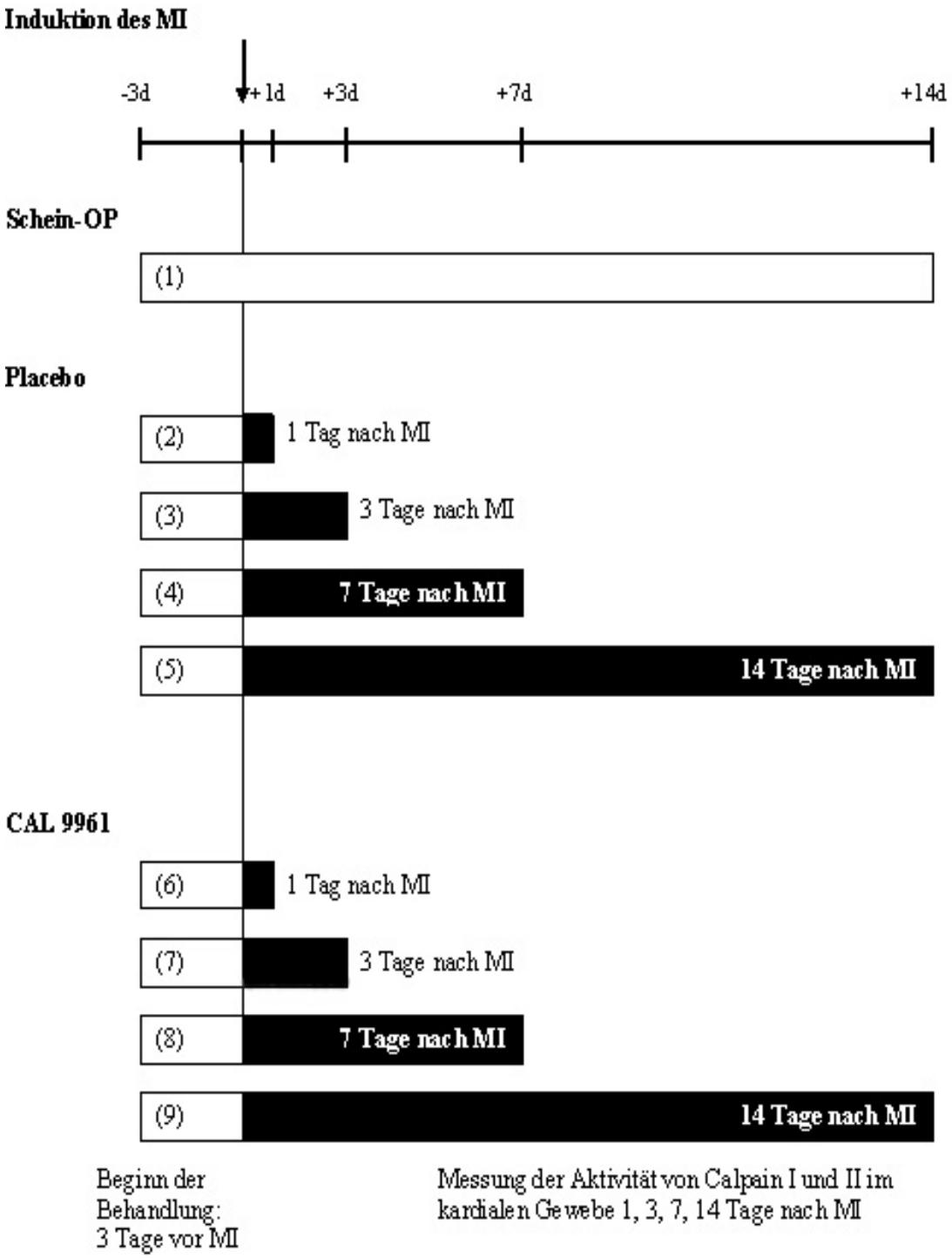


Abb. 5: Darstellung des experimentellen Protokolls (Studiendesign).
(1) = Schein-OP-Gruppe, (2 - 5) = Placebo-Gruppe, Herzentnahme nach 1, 3, 7 und 14 Tagen nach MI, (6 -9) = CAL 9961-Gruppe, Herzentnahme nach 1, 3, 7 und 14 Tagen.

2.2 Induktion von akutem Myokardinfarkt an Ratten

Die Induktion des Myokardinfarkts erfolgte nach einer von Johns & Olson erstmals beschriebenen und von Sandmann et al. modifizierten Technik [146,147].
Nach einwöchiger Haltung in Einzelkäfigen wurden die Tiere der Gruppen 2-5 und 6-9 mit Ether (Diethylether®, Merck, Darmstadt) betäubt und anschließend per intraperitonealer Injektion mit Ketamin-Xylazin (35mg $2mg^{-1}$ kg^{-1}, Sigma, Steinheim, Deutschland) narkotisiert. Nach Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes wurden die Tiere orotracheal intubiert und mit einem Beatmungsgerät für Kleintiere (Animal Respirator®, Rhema Labortechnik, Hofheim) beatmet (Raumluft, 70 Atemzüge pro min, 200 mmH_2O, 2,5 mL pro Atemzug). Während des chirurgischen Eingriffes erfolgte die kontinuierliche Ableitung eines Elektrokardiogramms (Sirecrust®, Siemens, Erlangen) zur Kontrolle der infarktbedingten Veränderungen.
Nach einem Hautschnitt von 2 cm Länge und Verlagerung des linken Pektoralmuskels wurde parallel zur Rippe im vierten Interkostalraum inzidiert und ein Rippenspreizer eingeführt. Nach vorderer Perikardektomie wurde die linke Koronararterie lokalisiert und mit sterilem Nahtmaterial 6-0 (Ethibond®, Ethicon, Norderstedt) dauerhaft ligiert. Die erfolgreiche Ligation wurde durch Verfärbung des ischämischen Myokards sowie durch das Auftreten von Arrhythmien im EKG verifiziert. Bei den scheinoperierten Tieren erfolgte die Ligatur im Myokard neben der Koronararterie. Der Verschluss der Thoraxhöhle erfolgte während eines kurzen Beatmungsstopps zur Verminderung der operationsbedingten intrathorakalen Restluft durch Einzelknopfnähte mit sterilem Nahtmaterial 3-0 (Mersilene®, Ethicon, Norderstedt).

Zu den oben genannten Zeitpunkten wurden die Tiere mit Ether eingeschläfert und die Herzen nach Thorakotomie exzidiert und anschließend gewogen. Interventrikuläres Septum und linke, freie Ventrikelwand wurden abgetrennt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Prozedur wurde zur Vermeidung von übermäßigen postmortalen Artefakten innerhalb von 2 Minuten durchgeführt.
Die Gewebeproben wurden bei -80° C bis zu 7 Tagen gelagert.

Der Grad kardialer Hypertrophie wurde bestimmt durch den Quotienten aus dem gesamten Herzgewicht (THW) und dem Körpergewicht (BW) der Tiere: THW/BW.

2.3 Chromatographische Trennung von Calpain I und II

Zur Homogenisierung des kardialen Gewebes wurde folgende Pufferlösung angesetzt, die zur Verhinderung einer vorzeitigen Autolyse von Calpain frei von Ca^{2+}- Ionen gehalten wurde.

Homogenisierungspuffer:
25 mM Imidazol-HCl, 5 mM Cystein, 1 mM EDTA, pH 7.5

(alle Chemikalien von Sigma, Steinheim, Deutschland)

Die tiefgefrorenen Gewebeproben (Gewicht 0,6 – 1,2 g) wurden in Homogenisierungspuffer überführt (5mL Puffer pro 1g Gewebe) und anschließend mittels IKA® Ultra-Turrax (T 25, Janke und Kunkel, Staufen, Deutschland) bei 20 500 Umdrehungen pro Minute über 60 sec homogenisiert. Alle Abläufe wurden auf Eis und mit vorgekühlter Pufferlösung durchgeführt. Bei 4° C wurden die Homogenate für 1 h bei 100 000 g zentrifugiert (Beckman, Ti 70.1 Rotor, 37 000 Umdrehungen min^{-1}) und die Überstände mit Glycerin zu einer Gesamtkonzentration von 16,7 % (v v^{-1}) versetzt. Diese wurden bei -20° C bis zu 24 h gelagert.
Für die Säulenchromatographie, durchgeführt in einem Kühlraum bei 4° C, wurde eine 1 x 10 cm DEAE-Sepharose-Säule (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) mit einem Fraktionssammler (SuperFrac®, Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verbunden und mit Homogenisierungspuffer equilibriert. Von den Überständen wurden 600 µL zurückbehalten, das restliche Volumen vollständig auf die Säule aufgetragen. Es erfolgte eine Waschung der Säule mit 120 mL Homogenisierungspuffer. Anschließend erfolgte die Elution mit 50 mL einer Kochsalzlösung (NaCl, Sigma, Steinheim, Deutschland) mit einem linearen Gradienten von 0 – 500 mM NaCl [148] bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1}, so dass 25 x 2 mL Fraktionen gewonnen wurden.

2.4 Identifizierung von Calpain in den Fraktionen mittels Western blot

Um Calpain I und II in den Fraktionen sicher zu bestimmen, wurde nach einer von Laemmli [149] modifizierten Methode eine SDS-Elektrophorese durchgeführt. Verwendet wurde hierbei ein Elektrophorese-kit (Sigma, Steinheim, Deutschland).
Nach Herstellerangaben wurden Pufferlösungen mit folgenden Endkonzentrationen angesetzt:

Elektrodenpuffer:
0.025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0.1% Natriumlaurylsulfat (SDS), pH 8.3 bei 25°C

Trenngelpuffer:
3.0 M Tris-HCI, pH 8.7-8.9 bei 25°C

Sammelgelpuffer:
0.5 M Tris-HCI, pH 6.7-6.9 bei 25°C

Probenpuffer:
0.125 M Tris-HCI (pH 6.8), 4% Natriumlaurylsulfat (SDS), 10% 2-Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 0.004% Bromphenol Blau

Ferner wurden vom Hersteller mitgeliefert beziehungsweise nach dessen Angaben angesetzt:
Stocklösung für Acrylamid/Bis-Acrylamid 30%/0,8%, Ammoniumpersulfat-Lösung 1.5%, Tetramethylethylendiamin (TEMED) 0,025%, Natriumlaurylsulfat (SDS) 10%

Nach den Anweisungen des Herstellers wurde zunächst ein Trenngel mit 10% Polyacrylamid, anschließend ein Sammelgel mit 4% Polyacrylamid hergestellt, das auf ersteres in der Elektrophoresekammer verteilt wurde. In das Sammelgel wurde vor

Polymerisation ein Kamm für die Auftragsschächte eingebracht. Für die Gele wurden folgende Ansätze verwendet:

Trenngel:

Reagens	**Volumen in mL**
Acrylamid/Bis.-Stocklösung	10
Trenngelpuffer	3,75
SDS-Stocklösung	0,3
Aqua dest.	14,45
Ammoniumpersulfat-Lösung	1,5
TEMED	0,015

Sammelgel:

Reagens	**Volumen in mL**
Acrylamid/Bis.-Stocklösung	2,5
Sammelgelpuffer	5
SDS-Stocklösung	0,2
Aqua dest.	11,3
Ammoniumpersulfat-Lösung	1
TEMED	0,015

Proben der Fraktionen wurden mit Probenpuffer verdünnt zu einer Proteinkonzentration von 2 µg μL^{-1} und bei 37° C für 2 h inkubiert. Nach dem Füllen der Elektrophoresekammer mit dem Elektrodenpuffer wurde anschließend 10 µL der Proben sowie Standard-Markerproteine (Sigma, Steinheim, Deutschland) in die Schächte aufgetragen und die Elektrophorese bei 30 mA durchgeführt.
Für die Blot-Prozedur wurden folgende Lösungen angesetzt:

Blotpuffer:
0.025 M Tris (pH 8,3), 0,192 M Glycin, 20 % Methanol

Ponceau-Rot-Lösung:
Ponceau-Rot 0,1%, Essigsäure 5%, Aqua dest.

TTBS-Waschpuffer:
0,1% Tween 20, 0,1 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5 bei 25° C

(alle Chemikalien von Sigma, Steinheim, Deutschland)

Anschließend an die Elektrophorese wurde das Gel in Blotpuffer equilibriert und bei 0,8 mA cm^{-2} in 1,5 h auf Immobilon-P Transfer Membranen (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) übertragen.
Der Proteintransfer wurde durch das Anfärben eines Standardproteins (β-Actin, Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bestätigt. Hierbei wurde 5 min mit Ponceau-Rot-Lösung gefärbt und anschließend mit Aqua dest. gewaschen.
Das Bandenmuster der Markerproteine wurde gescannt.
Nach dreimaligem Waschen mit TTBS-Puffer wurden die Membranen in 5% fettfreier Milch in TTBS für 1 h geblockt. Anschließend folgte die Inkubation über 12 h bei 4° C mit einem der folgenden monoklonalen Maus-Antikörper, die in Verdünnungen von 1:1000 in TTBS verwendet wurden:

Anti-large subunit Calpain I, Anti-small subunit Calpain I, Anti-large subunit Calpain II, Anti-small subunit Calpain II

(alle Antikörper von Chemicon, Hofheim, Deutschland)

Im Anschluss wurden die Membranen dreimal mit TTBS-Puffer gewaschen und mit einem sekundären Kaninchen-Anti-Maus-IgG (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper wurde ebenfalls in einer Verdünnung von 1:1000 in TTBS angewendet und war mit einer Meerettichperoxidase gekoppelt. Nach ausgiebigem Waschen mit TTBS wurden die Banden mittels des Chemilumineszenz-Detektion-Verfahrens, basierend auf dem ECL-reagent® (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), sichtbar gemacht. Hierfür wurden die Membranen in einem 1:1 Gemisch der ECL-Reagentien 1 und 2 für 1 min inkubiert und anschließend in Dunkelheit ECL-Hyperfilm (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) 2 min belichtet.

2.5 Enzymassay

Die Aktivität der Calpaine I und II wurde mithilfe des spezifischen, synthetischen Substrats Suc-Leu-Tyr-AMC bestimmt (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland und Affiniti Research, Mamhead, Großbritannien) [150]. Durch Calpain wird der Aminosäurerest proteolytisch abgespalten, wodurch die fluoreszierende AMC-Gruppe freigesetzt wird. Der Versuchsaufbau wurde nach den von Elce und Mitarbeitern [151] beschriebenen Zusammenhängen zwischen der Ca^{2+}-Konzentration und der Proteolyse des Suc-Leu-Tyr-AMC-Substrats entwickelt. EDTA wurde mit verdünnter Natronlauge (Sigma, Steinheim, Deutschland) auf einen neutralen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Die Enzymaktivität wurde in allen Fraktionen und Überständen mit folgenden Ansätzen gemessen.

Fluoreszenz$_{Ca2+}$:

Reagens	**Vol. in µL**	**Endkonzentration**
Probe (Fraktion/Überstand)	170	
$CaCl_2$	20	5 mM
AMC-Suc-Leu-Tyr	10	500 µM

Fluoreszenz$_{EDTA}$:

Reagens	**Vol. in µL**	**Endkonzentration**
Probe (Fraktion/Überstand)	170	
EDTA (neutralisiert)	20	5 mM
AMC-Suc-Leu-Tyr	10	500 µM

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Substrats, und es wurde 60 min bei 30° C inkubiert. Anschließend erfolgte der Abbruch der Reaktion durch die Zugabe von 200 µL Alkalipuffer.

Alkalipuffer:
0,25 M Glycin, 0,085 M Na_2CO_3, 0,12 M NaCl, pH 10,7

(alle Chemikalien von Sigma, Steinheim, Deutschland)

Die Fluoreszenz wurde in einem Spektrofluorometer (Fluorolite 1000®, Dynatech Laboratories, Lampenspannung 6,0 V) bei 470 nm nach Exzitation bei 385 nm in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gemessen. Als Calpain-spezifische Aktivität wurde nur die rein Ca^{2+}-abhängige Aktivität betrachtet:

$Fluoreszenz_{Ca2+}$ - $Fluoreszenz_{EDTA}$ = Calpain-spezifische Aktivität

Zur Bestimmung der Menge des umgesetzten Substrats wurde bei jedem Assay eine Standardkurve mit dem reinen, fluoreszierenden AMC (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) mitgeführt. Hierfür wurde in den Reaktionsansätzen statt der Probe Homogenisierungspuffer verwendet und statt des Substrats AMC in Endkonzentrationen von 0 – 5 µM zugegeben.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Aktivität in den Überständen und in den Fraktionen der CAL 9961 behandelten Tiere wurde die Calpain-spezifische Aktivität auf die Proteinkonzentration bezogen. Diese wurde in den Proben durch die Methode nach Bradford ermittelt [152]. Nach 10 min Inkubation von 100 µL der Proben mit 3 mL des Bradford-Reagens (Sigma, Steinheim, Deutschland) wurde die Absorption bei 595 nm mit einem Spektrophotometer (Ultrospec III, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gemessen. Diese wurde anschließend mit einer Standardkurve verglichen, die aus einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (Sigma, Steinheim, Deutschland) in Homogenisierungspuffer erstellt wurde.

2.6 Test von CAL 9961 in vitro

Um die Effekte von CAL 9961 in vitro zu untersuchen, wurde der Calpainassay mit im Handel erhältlichen, reinen Calpain I und II (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Calpain I und II wurden in Homogenisierungspuffer verdünnt (0,5 units ml^{-1}), diesem Ansatz CAL 9961 mit Endkonzentrationen von 0–500 nM zugefügt und der Enzymassay wie oben beschrieben durchgeführt.
In einem zweiten Schritt wurde Rohüberständen von Septum- und Ventrikelwandproben ebenfalls CAL 9961 mit den Endkonzentrationen 0-500 nM zugefügt und der Assay wie oben beschrieben durchgeführt.

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Evaluation wurde mit Systat-Software (Systat, London, Großbritannien) durchgeführt. Es erfolgte eine einseitige Varianzanalyse bei wiederholten Messungen (ANOVA). Unterschiedliche Mittelwerte zwischen den einzelnen Gruppen wurden durch den post hoc unpaarigen Student`s t-Test oder den Bonferroni-Test verglichen. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung vom Mittelwert angegeben.

3. Ergebnisse

In dieser Studie wurde die Aktivität von Calpain I und II im infarzierten und nicht-infarzierten Rattenmyokard zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion eines akuten Myokardinfarkts quantifiziert. Darüber hinaus wurden die Effekte von CAL 9961 in vitro und in vivo getestet.

3.1 Etablierung von chromatographischer Trennung und Enzymassay

3.1.1 AMC-Substrat wird durch Calpain Ca^{2+}-abhängig umgesetzt

Als Voraussetzung für das sichere Erfassen der Calpainaktivität musste zunächst ein Enzymassay als zuverlässiges Verfahren mit reproduzierbaren Ergebnissen etabliert werden.

Bei ersten Vorversuchen der Substratumsetzung durch im Handel erhältliches, reines Calpain konnte nur wenig Ca^{2+}-abhängige Fluoreszenz gemessen werden. Dagegen zeigte sich in Übereinstimmung mit Sasaki et al. [150], dass durch hochaktive Lösungen des Calpain-ähnlichen Enzyms Papain nennenswerte Mengen des Substrats umgesetzt werden konnten. Der Aminosäurerest an der fluoreszierenden AMC-Gruppe ließ sich durch konzentrierte Salzsäure oder starke Hitze (95° C) jedoch nicht abspalten, also eine unspezifische, enzymunabhängige Spaltung des Substrats nicht eintrat.

Durch eine Justierung der Lampenspannung des Spektrofluorometers von 4 Volt auf 6 Volt gelang es, eine stärkere Fluoreszenz nach Substratumsetzung zu registrieren, im Fall von Calpain I und II mit einer deutlichen Calciumabhängigkeit. Diese Einstellung wurde daher beibehalten.

Nach 60 min wurden die Enzymassays gestoppt. Dazu wurde zunächst EDTA eingesetzt unter der Vorstellung, dass dem Ansatz Ca^{2+} entzogen und somit Calpain nicht mehr aktiv sein würde. Vorversuche zeigten jedoch, dass auch nach EDTA-Zugabe Substrat weiterhin umgesetzt wurde. Alternativ wurde Trichloracetat eingesetzt,

jedoch führte die Ausfällung der Proteine zu einer gestörten Fluoreszenzmessung. Daher wurde in dieser Studie Alkali-Puffer eingesetzt, der in Vorversuchen die Reaktion zuverlässig stoppte und nicht mit der Fluoreszenzmessung interferierte.

3.1.2 AMC-Konzentration und Fluoreszenz verhalten sich linear

Mit reinem, fluoreszierenden AMC wurde eine Standardkurve erstellt, die zeigte, dass sich Produktkonzentration und Fluoreszenz im Bereich von 0 - 30 µM linear ($r^2 = 0,998$) verhalten und erst ab höheren AMC-Konzentrationen die Kurve flacher verläuft. Die in dieser Studie erhobenen Werte bewegten sich jedoch alle innerhalb des linearen Bereichs.

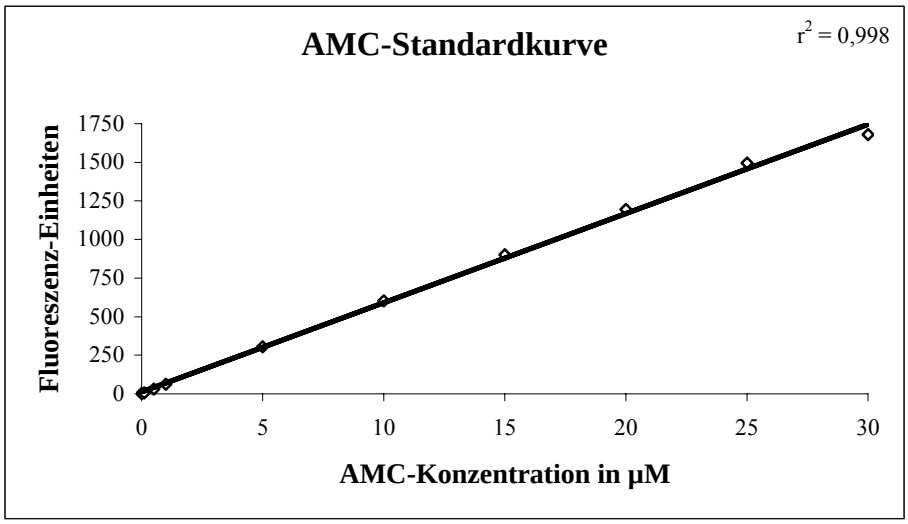


Abb. 6: Fluoreszenz-Einheiten des Spektrofluorometers (Dynatech Laboratories) aufgetragen gegen steigende AMC-Konzentrationen in Homogenisierungspuffer (µM).

3.1.3 Glycerin-Zusatz verhindert Proteinpräzipitation

Im Vorfeld dieser Studie wurde getestet, ob sich in den Gewebeproben von infarzierten Rattenherzen tatsächlich Ca^{2+}-abhängige, enzymatische Aktivität nachweisen lässt. Nach Homogenisierung und Zentrifugation wurden die rohen Überstände bei -20° C beziehungsweise -80° C eingefroren. Nach dem Auftauen fiel jedoch eine starke

Aggregation der Proteine auf. Bei Versuchen mit diesen Proben zeigte sich im Unterschied zu frischen Überständen, dass kaum noch proteolytische Aktivität vorhanden war.
Unter der Vorstellung, dass die Überstände zu stark mit Proteinen gesättigt sein könnten und diese daher zur Aggregation neigen, wurden die Proben mit Homogenisierungspuffer verdünnt. Jedoch präzipitierten die Proteine auch bei geringeren Proteinkonzentrationen. Durch Zugabe von Glycerin wurde erreicht, dass die Flüssigkeit bei -20° C nicht mehr auskristallisierte. Dadurch konnte die Präzipitation und Inaktivierung der Enzyme verhindert werden.

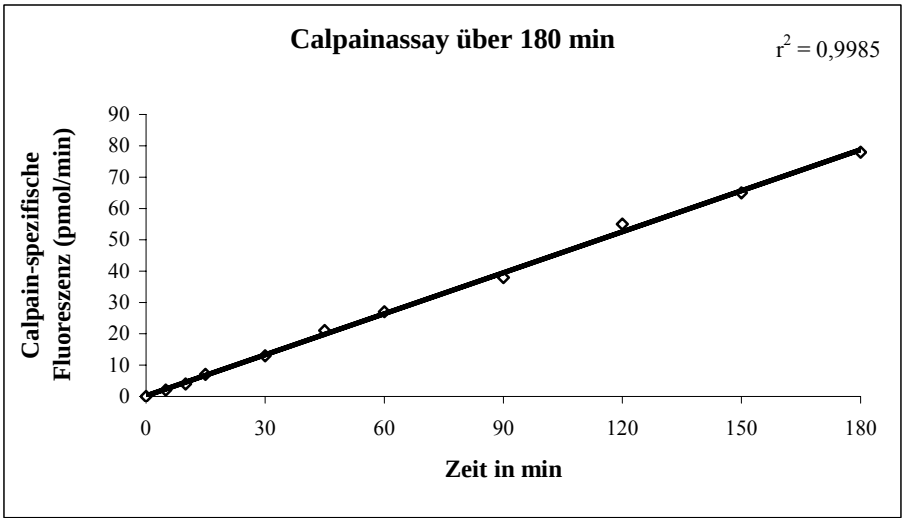
3.1.4 Niedrige pH-Werte und hohe Salzkonzentrationen hemmen die Enzymaktivität

Die Einflüsse von pH-Wert und Salzkonzentration in den Reaktionsansätzen auf die enzymatische Aktivität wurde in Vorversuchen zu dieser Studie untersucht. Hierbei zeigte sich, dass ein Absinken des pH-Wertes einen Abfall der Aktivität verursachte. Da den Reaktionsansätzen zur Bestimmung von Ca^{2+}-unabhängiger Aktivität leicht saures EDTA zugesetzt werden sollte, wurde dieses vorher durch verdünnte Salzsäure neutralisiert.
NaCl, das sich durch die Elution in den Fraktionen befand, führte ebenfalls zu einer Enzyminhibition, die bei maximal 20% lag. Diese Hemmung wurde im Versuchsaufbau nicht ausgeglichen, jedoch nicht als relevant angesehen, da stets Proben der gleichen Chromatogrammregion, also gleicher Salzkonzentration und damit gleicher Hemmstärke verglichen wurden.

3.1.5 Enzymassay entspricht quantitativem Testverfahren

Durch Testen von Verdünnungsreihen der Überstände und Fraktionen sowie durch Abbrechen des Enzymassays nach definierten Zeitpunkten von 5-240 min konnte festgestellt werden, dass sich die Substrat-Hydrolyse linear zu Zeit (Abb. 7a, r^2 = 0,9985) und zur Proteinmenge (Abb. 7b, r^2 = 0,9877) verhielt. Daher wurde der Enzymassay als quantitatives Testverfahren angesehen.

a)



b)

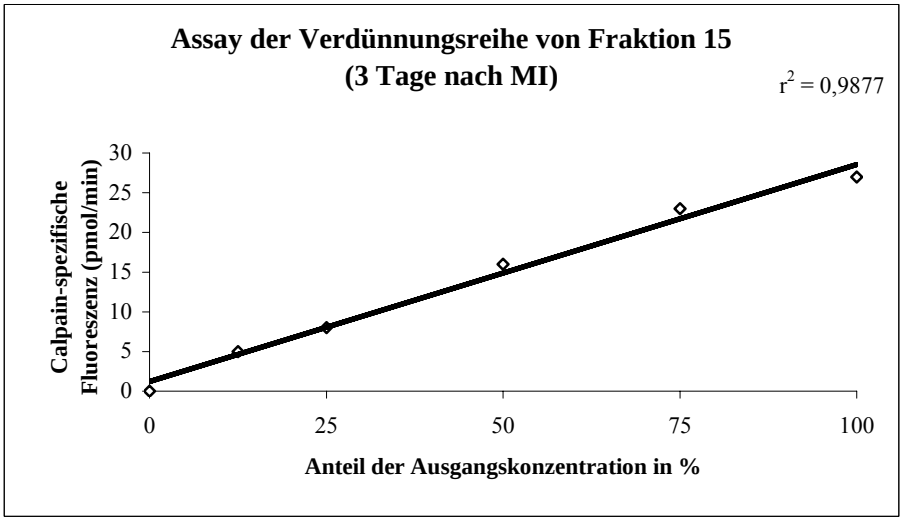


Abb. 7a, b: Repräsentative Ergebnisse von Enzymassays, hier mit Fraktion 15 einer Gewebeprobe 3 Tage nach MI - die Calpain-spezifische Fluoreszenz (pmol min^{-1}) aufgetragen gegen **a)** die Zeit (min) und **b)** gegen den Anteil der Ausgangskonzentration in einer Verdünnungsreihe (%).

3.2 Aktivitätsprofil kardialer Calpaine nach Myokardinfarkt

3.2.1 Calpain I und II können chromatographisch getrennt werden – Identifizierung der Enzyme in den Fraktionen durch Western blot

Nach Homogenisierung und Zentrifugation der Gewebeproben wurden Calpain I und II aus den rohen Überständen durch Anionenaustauscher-Chromatographie auf DEAE-Sepharose mittels eines linearen Gradienten von 0 – 500 mM NaCl getrennt. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Spalla et al. [148] konnten zwei Gipfel von Ca^{2+}-abhängiger Enzymaktivität beobachtet werden. Der erste Gipfel trat bei 180-240 mM NaCl, entsprechend den Fraktionen 8 – 12, auf, der zweite Aktivitätsgipfel wurde bei 260-320 mM NaCl in den Fraktionen 13 – 16 beobachtet (Abb. 8a, b). Mithilfe des Immunoblots ließ sich innerhalb des ersten Gipfels Calpain I als vorherrschendes Enzym nachweisen, Calpain II war dagegen in den Fraktionen des zweiten Gipfels vorhanden (Abb. 9). Bei beiden Calpainformen konnten jeweils die großen Untereinheiten mit einer deutlichen Bande dargestellt werden, die kleineren 28 kDa-Untereinheiten ließen sich auch mit zahlreichen verschiedenen Antikörper-Konzentrationen nicht nachweisen.

3.2.2 Calpainaktivität nach Myokardinfarkt in Überständen von Septum und Ventrikelwand erhöht

Die Aktivität von Calpain I und II wurde im interventrikulären Septum und in der freien linken Ventrikelwand 1, 3, 7 und 14 Tage nach akutem Myokardinfarkt gemessen, um regionale und zeitliche Veränderungen zu erfassen. Nach Homogenisierung und Zentrifugation der kardialen Gewebeproben enthielten die Überstände beide Calpainformen, so dass aus diesen die Calpain-Gesamtaktivität gemessen werden konnte. Wie in Abbildung 10a gezeigt, war die Calpainaktivität in den Überständen des interventrikulären Septums (IS) bei den Placebo-Tieren 1 Tag nach MI signifikant erhöht gegenüber den scheinoperierten Tieren. Im weiteren Zeitverlauf erhöhte sich die Aktivität der Calpaine 3 und 7 Tage nach dem Infarkt und erreichte nach 14 Tagen ihr Maximum.

Die Calpainaktivität in den Überständen der freien linken Ventrikelwand (LVFW) war zwar ebenfalls 1 Tag nach MI signifikant erhöht, erreichte aber im Gegensatz zu den Septumüberständen ihr Maximum bereits nach 3 Tagen nach Infarktereignis und fiel dann nach 7 und 14 Tagen deutlich ab (Abb. 10b).
Die Gruppe der scheinoperierten Tiere wies in den Überständen von IS und LVFW sowie zu den verschiedenen Zeitpunkten nach MI durchgehend etwa gleich niedrige Calpainaktivitäten auf. Die verschiedenen Zeitpunkte sind daher nicht getrennt dargestellt (Abb. 10a, b).

3.2.3 Höhere Calpain I-Aktivität in IS-Fraktionen mit Maximum nach 14 Tagen und höhere Calpain II-Aktivität in LVFW-Fraktionen mit Maximum nach 3 Tagen

Um quantitative Unterschiede zwischen den Aktivitäten der beiden Calpainformen innerhalb des infarzierten (LVFW) und des nicht-infarzierten Areals (IS) zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt bestimmen zu können, wurden Calpain I und II mittels DEAE-Sepharose-Chromatographie getrennt. In den Eluaten von IS und LVFW der Placebo-behandelten Tiere wurden innerhalb des gleichen Fraktionsbereiches zwei Aktivitätsgipfel beobachtet. Der erste Bereich in den Fraktionen 8-12 repräsentiert die Aktivität von Calpain I, der zweite Bereich von Fraktion 13-16 die von Calpain II. Diese Bereiche sowie die Breite der Gipfel waren bei allen Proben nahezu identisch, so dass die Gipfelhöhe als semiquantitative Messung der Aktivität der einzelnen Calpainformen angesehen werden kann.
Wie in Abbildung 8a gezeigt war in den IS-Fraktionen der Placebo-behandelten Tiere nach Infarkt die Aktivität von Calpain I (erster Gipfel) dreifach höher im Vergleich zu Calpain II (zweiter Gipfel). Beide Gipfel nahmen allerdings im Zeitverlauf nach Induktion des Infarktes zu, so dass die höchsten Calpainaktivitäten 14 Tage nach MI in den IS-Eluaten nachweisbar waren.
Im Gegensatz zu den Fraktionen des Septums (IS) war in den Eluaten der linken Ventrikelwand (LVFW) signifikant mehr Aktivität von Calpain II (zweiter Gipfel) relativ zu Calpain I (erster Gipfel) messbar (Abb. 8b). Beide Calpainformen erreichten hier jedoch schon nach 3 Tagen nach Infarkt ihre maximale Aktivität. Nach 7 und 14 Tagen blieben die Calpainaktivitäten trotz eines Rückgangs weiterhin noch erhöht.

a)

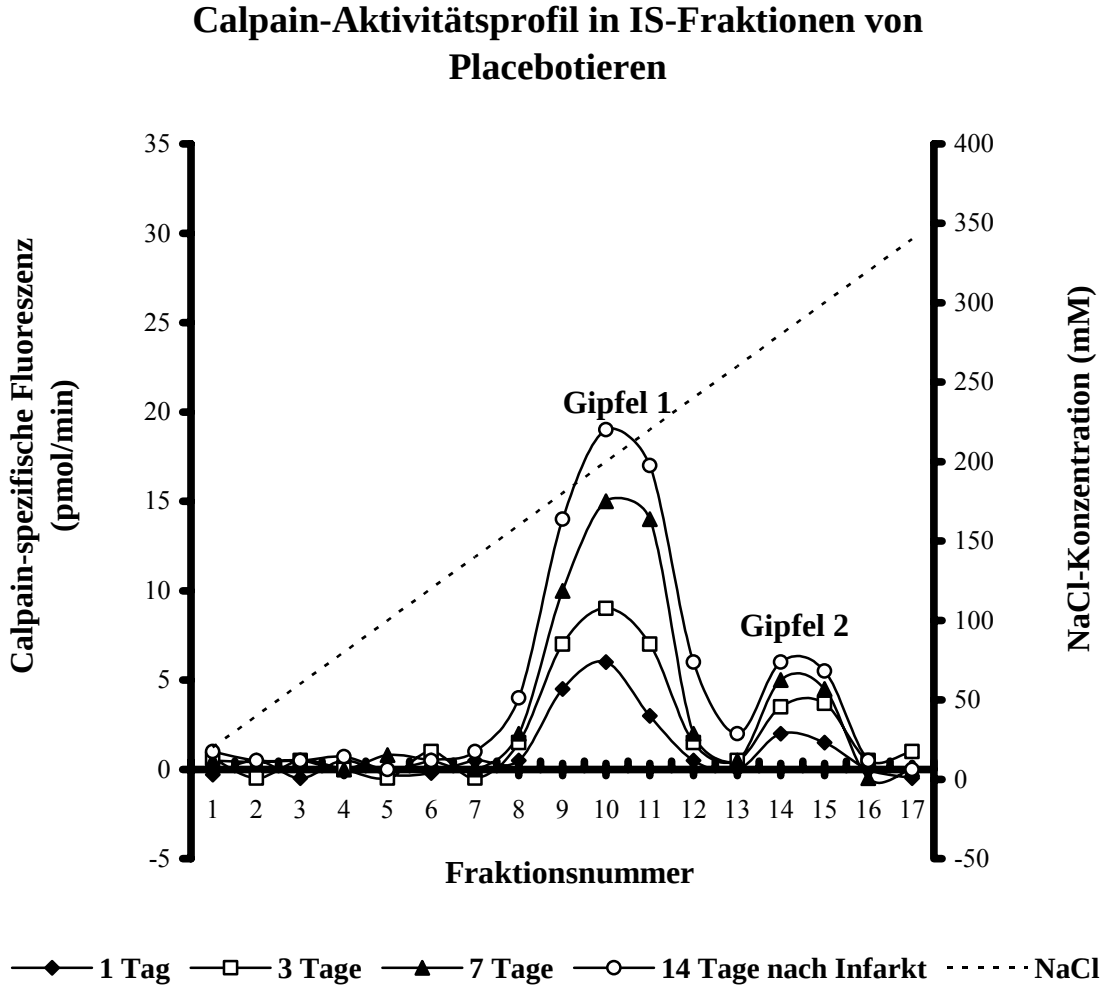


Abb. 8a: Elutionsprofil der Calpain-spezifischen Aktivität ($Fluoreszenz_{Ca2+}$-$Fluoreszenz_{EDTA}$; pmol min^{-1}) nach Anionenaustauscher-Chromatographie auf DEAE-Sepharose von Überständen des interventrikulären Septums Placebo-behandelter Tiere 1, 3, 7 und 14 Tage nach Infarkt. Zwei Aktivitätsgipfel waren in den Fraktionen 8-12 (180-240 mM NaCl) und 13-16 (260-320 mM NaCl) zu beobachten. Die Aktivitätsgipfel in den IS-Fraktionen nahmen im Zeitverlauf nach Infarkt zu und erreichten maximale Werte 14 Tage nach Infarkt.

b)

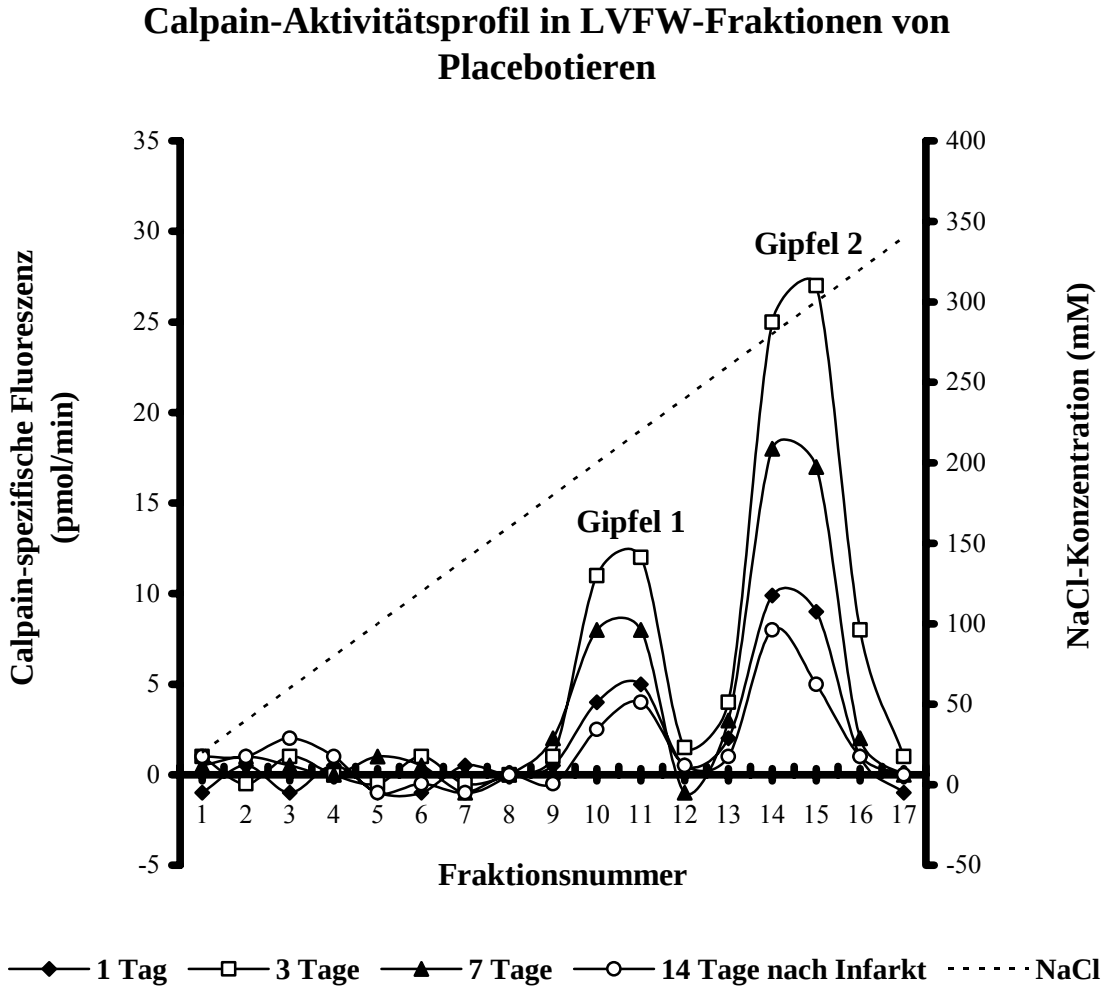


Abb. 8b: Elutionsprofil der Calpain-spezifischen Aktivität ($Fluoreszenz_{Ca2+}$-$Fluoreszenz_{EDTA}$; pmol min^{-1}) nach Anionenaustauscher-Chromatographie auf DEAE-Sepharose von Überständen der linken, freien Ventrikelwand Placebo-behandelter Tiere 1, 3, 7 und 14 Tage nach Infarkt. Zwei Aktivitätsgipfel waren in den Fraktionen 8-12 (180-240 mM NaCl) und 13-16 (260-320 mM NaCl) zu beobachten. Die Aktivitätsgipfel in den LVFW-Fraktionen erreichten 3 Tage nach Infarkt ihre Maxima.

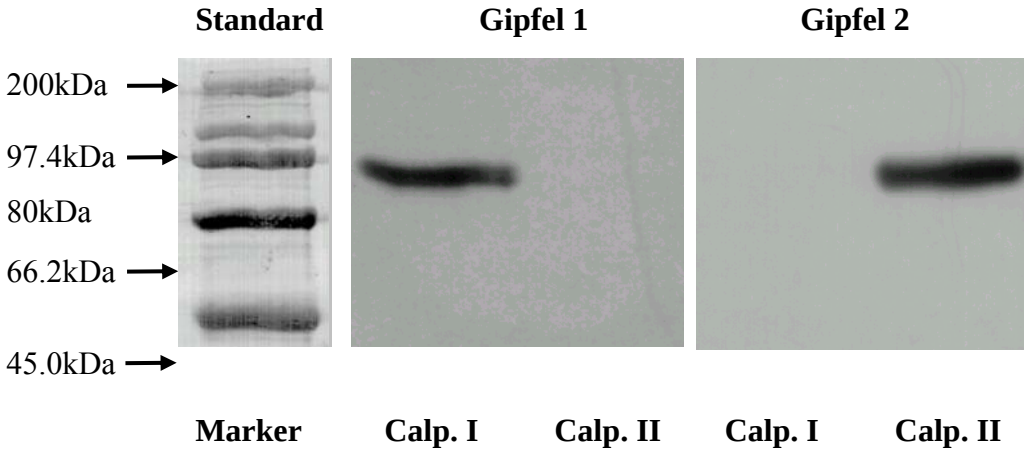
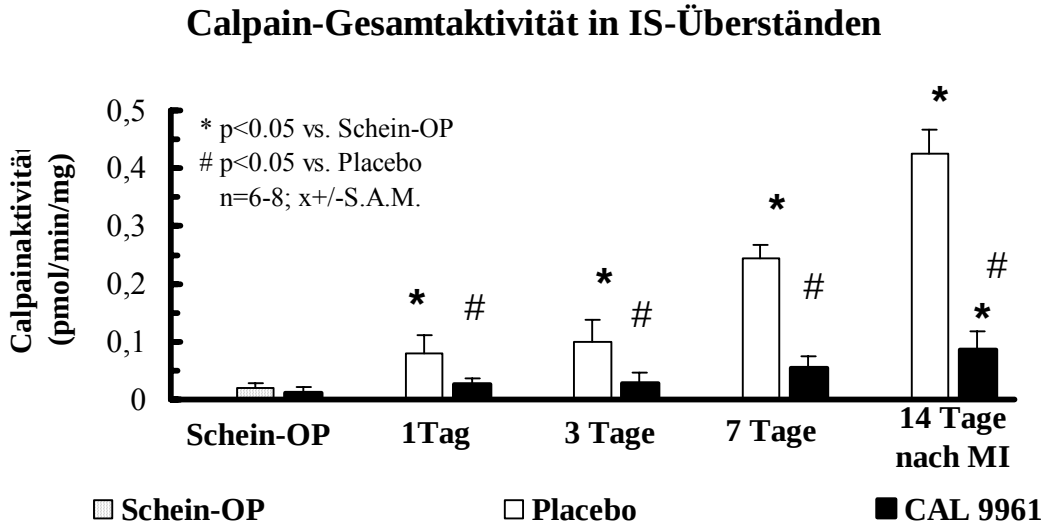


Abb. 9: Repräsentatives Ergebnis von Western blots der kardialen Calpaine I und II in Fraktionen des infarzierten Rattenmyokards nach Anionenaustauscher-Chromatographie auf DEAE-Sepharose. Bei beiden Calpainformen wurde die große 80 kDa-Einheit identifiziert. Gipfel 1 enthielt Calpain I, Gipfel 2 dagegen Calpain II.

a)



b)

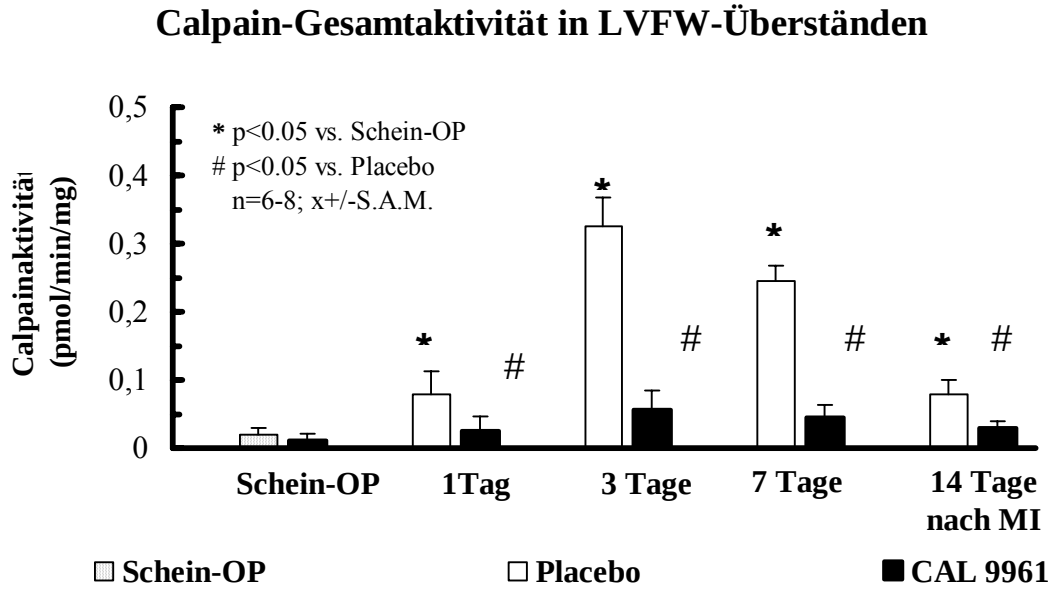


Abb. 10a, b: Calpain-Gesamtaktivität (pmol AMC min^{-1} mg^{-1} Protein) in Überständen von Gewebshomogenaten **a)** des interventrikulären Septums (IS), **b)** der linken, freien Ventrikelwand (LVFW) von scheinoperierten und Infarkt-induzierten Tieren mit Placebo- bzw. CAL 9961-Behandlung, gemessen 1, 3, 7 und 14 Tage nach Infarkt. *p<0,05 verglichen mit Schein-OP; #p<0,05 verglichen mit Placebo; Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichung (S.A.M.); n=6-8.

3.3 Effekte von CAL 9961

3.3.1 CAL 9961 hemmt beide Calpainformen in vitro

Um die Wirkung des spezifischen Calpaininhibitors CAL 9961 in vitro zu untersuchen, wurde der Enzymassay sowohl mit im Handel erhältlichen, reinen Calpain I und II als auch mit den Rohüberständen der kardialen Gewebeproben durchgeführt.
Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Dosisfindung von CAL 9961 ergaben, dass eine Konzentration des Inhibitors von 226 nM L^{-1} im Reaktionsansatz eine vollständige Hemmung der Aktivität von kommerziellem Calpain I und II (0,5 units mL^{-1}) bewirkte. Diese Konzentration führte in den Rohüberständen der kardialen Proben (IS, LVFW) ebenfalls zu einer vollständigen Hemmung der Calpainaktivität (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 CAL 9961 hemmt die Calpain-Gesamtaktivität in vivo

Um die Effekte von CAL 9961 in vivo zu untersuchen, wurden die Versuchstiere der Gruppen 6-9, ab 3 Tage vor Infarktinduktion bis zur Herzentnahme dauerhaft mit dem Calpaininhibitor (15 mg kg^{-1} d^{-1}) behandelt.
Abb. 10a zeigt, dass die chronische Therapie mit CAL 9961, die Infarkt-induzierte Erhöhung der Calpain-Gesamtaktivität in Überständen von IS 1, 3 und 7 Tage nach Infarkt auf Werte abschwächte, die sich von scheinoperierten Tieren nicht mehr signifikant unterschieden. Vierzehn Tage nach Infarkt reduzierte die Behandlung mit CAL 9961 die Calpainaktivität im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren deutlich, relativ zu scheinoperierten Tieren jedoch war sie signifikant erhöht.
Die Erhöhung der Calpain-Gesamtaktivität nach Myokardinfarkt in den LVFW-Überständen wurde durch die CAL 9961-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Gruppe zu allen vier Zeitpunkten vollständig aufgehoben (kein signifikanter Unterschied zu scheinoperierten Tieren)(Abb. 10b).
Diese Ergebnisse entsprechen einer Partialinhibition der Calpain-Gesamtaktivität durch CAL 9961 im nicht-infarzierten Herzgewebe in der chronischen Phase nach

Myokardinfarkt. Dagegen wurde die Calpain-Gesamtaktivität im infarzierten Myokard in der akuten Phase nach Infarkt auf das Level von scheinoperierten Tieren reduziert.

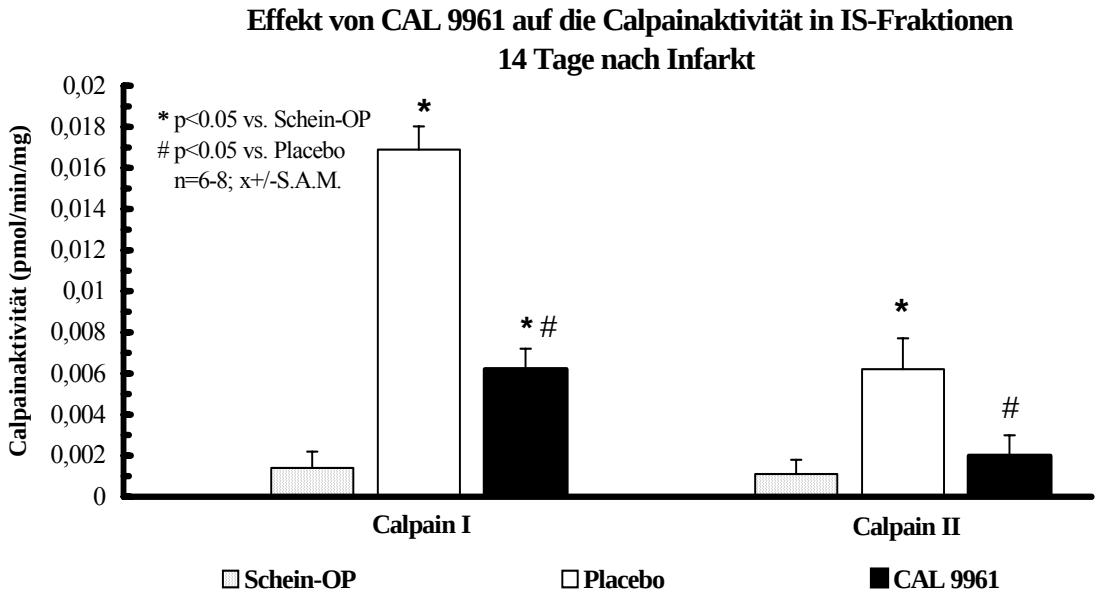
3.3.3 CAL 9961 hemmt beide Calpainformen in vivo

Um zu bestimmen welche Calpainform einer Enzymhemmung durch CAL 9961 unterlag, wurden Calpain I und II aus kardialen Gewebeproben von scheinoperierten und Infarkt-induzierten Tieren mit Placebo- beziehungsweise CAL 9961-Behandlung chromatographisch getrennt.
Die Aktivität von Calpain I und II in IS- und LVFW-Fraktionen wurde durch die CAL 9961-Therapie supprimiert (Abb. 11a, b). Abb. 11a zeigt die unterschiedlichen Aktivitäten in den Septumfraktionen (IS) 14 Tage nach Infarkt: Im Vergleich zur Placebogruppe wurde durch die CAL 9961-Behandlung die Calpain I–Aktivität um 63% reduziert und die Calpain II–Aktivität auf das Level scheinoperierter Tiere abgesenkt (Reduktion um 69 %).
In den Fraktionen des linken Ventrikels (LVFW) 3 Tage nach Infarkt ergab sich dagegen folgendes Bild: Im Vergleich mit der Placebobehandlung wurde der Anstieg der Calpainaktivität nach Infarkt vollkommen aufgehoben, die Aktivität von Calpain I wurde um 57 % und die von Calpain II um 81 % reduziert.

3.3.4 CAL 9961-Behandlung reduziert kardiale Hypertrophie nach Myokardinfarkt

Um die Auswirkungen von CAL 9961 auf die kardiale Hypertrophie nach akutem Myokardinfarkt zu untersuchen, wurde der Quotient aus gemessenem Herzgewicht (THW) und Körpergewicht (BW) der Tiere errechnet (THW/BW).
Vierzehn Tage nach Infarkt war dieser Quotient bei Placebo-behandelten Tieren (0,314 $\pm$ 0,01) signifikant gegenüber den scheinoperierten Tieren (0,256 $\pm$ 0,01) erhöht. Demgegenüber wiesen die Tiere der CAL 9961-Gruppe (0,298 $\pm$ 0,01) im Vergleich mit den Placebo-behandelten Tieren einen deutlich geringeren Quotienten auf, der relativ zu den scheinoperierten Tieren jedoch signifikant erhöht war.
Diese Ergebnisse entsprechen einer Reduktion der kardialen Hypertrophie durch CAL 9961-Therapie.

a)



b)

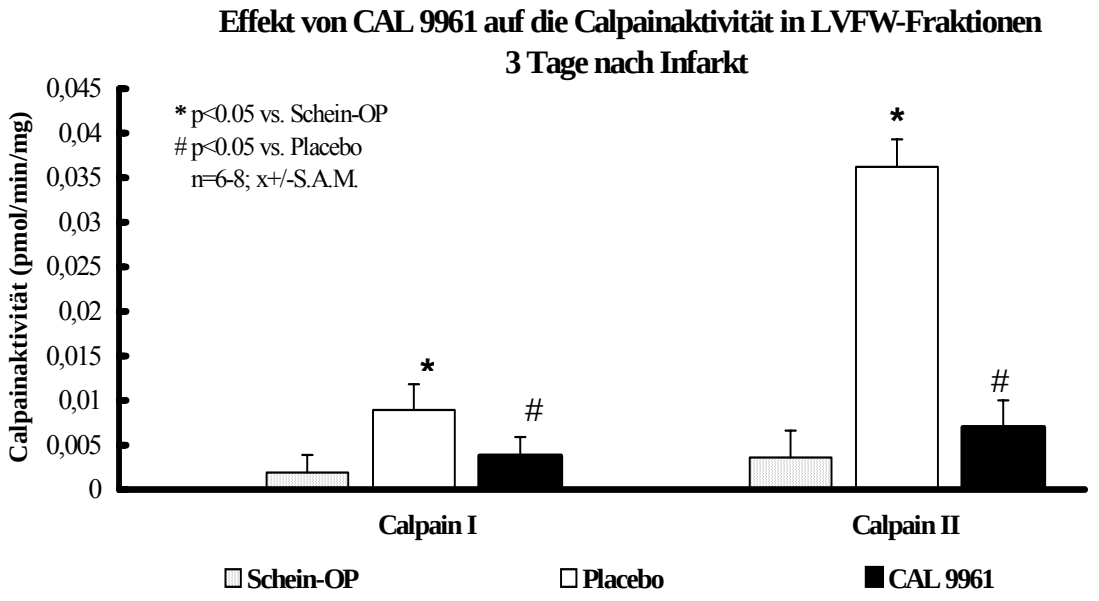


Abb. 11a, b: Effekte der chronischen CAL 9961-Behandlung auf die Aktivität von Calpain I und II (pmol AMC min^{-1} mg^{-1} Protein) in Fraktionen nach Anionenaustauscher-Chromatographie auf DEAE-Sepharose von **a)** interventrikulärem Septum (IS) 14 Tage nach Infarkt und **b)** linker, freier Ventrikelwand (LVFW) 3 Tage nach Infarkt verglichen mit den Fraktionen von scheinoperierten Tieren und Fraktionen infarzierter Herzen von Placebo-behandelten Tieren.
*p<0,05 verglichen mit Schein-OP; #p<0,05 verglichen mit Placebo; Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichung (S.A.M.); n=6-8.

4. Diskussion

4.1 Detektion und chromatographische Trennung von Calpain I und II

Zur Erfassung zeitlicher und regionaler Veränderungen der Aktivität kardialer Calpaine und zur Bestimmung der Effekte des Calpaininhibitors CAL 9961 wurde für diese Arbeit ein einfacher und spezifischer fluorimetrischer Assay für Calpaine etabliert. Mittels Chromatographie auf DEAE-Sepharose wurden die Enzyme aus Überständen kardialer Gewebeproben getrennt, und zwei Aktivitätsgipfel konnten quantifiziert werden. Durch ein Immunoblot-Verfahren konnte im ersten Gipfel die große Untereinheit von Calpain I und im zweiten Gipfel die große Untereinheit von Calpain II identifiziert werden (Abb. 9).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die kleine 28 kDa-Untereinheit beider Enzymformen von der großen Untereinheit nach Chromatographie dissoziiert war.

Eine solche Dissoziation der großen und kleinen Untereinheit bei chromatographischer Trennung wurde bereits durch Elce et al. beschrieben [153] und wird in Gewebepräparationen häufiger beobachtet [105,154].

In Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen kann es neben der Dissoziation zu einer Autolyse der großen Untereinheit kommen, die zur Produktion von aktiven, aber kurzlebigen und instabilen Fragmenten von 78 kDa beziehungsweise 75 kDa führt [151]. Werden dagegen Ca^{2+}-freie Medien für die Calpainseparation verwendet, kann eine Dissoziation vermieden werden [155]. In dieser Studie lagen jedoch trotz der Zugabe von EDTA zum Homogenierungspuffer dissoziierte Untereinheiten vor, Fragmente von 78 kDa oder 75 kDa konnten in den Fraktionen nicht nachgewiesen werden.

Als Erklärung für diese Beobachtung kommt neben einer möglichen Trennung oder einer Degradierung der kleinen Untereinheit bei der Präparation auch eine Dissoziation der Untereinheiten in vivo nach Infarkt in Frage, wie sie im Rahmen des Aktivierungsmechanismus von Calpain geschieht (Abb. 4) [119,127].

Letztlich muss auch eine fehlgeschlagene Antikörper-Bindung in Betracht gezogen, werden, obschon in früheren Studien eine Darstellung auch der kleinen Untereinheit durch die gewählten Antikörper gelungen ist [156].

In dieser Studie war die Ca^{2+}-abhängige, proteolytische Aktivität der 80 kDa-Einheit mittels des fluorimetrischen Enzymassays nach DEAE-Sepharose-Chromatographie in Gegenwart von 5 mM Ca^{2+} messbar, was darauf hinweist, dass die große katalytische Untereinheit als Monomer intakt und aktiv war. Diese Beobachtungen sind konsistent mit Ergebnissen von Yoshizawa et al. [154] und stehen im Widerspruch zu der früher aufgestellten These, dass Calpaine lediglich als Dimere aktiv sind [157].
Die Calpainaktivität, die durch die Methode in dieser Studie gemessen wurde, stellt die maximale Aktivität von Calpain I und II dar, da diese bereits durch Ca^{2+}-Konzentrationen von mehr als 1 mM maximal aktiviert werden, wenn Suc-Leu-Tyr-AMC als Substrat verwendet wird [150]. Bei Extrapolationen auf die Situation in vivo, sollte jedoch die tatsächliche intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration berücksichtigt werden.

Durch den Entzug von Ca^{2+}-Ionen mit EDTA konnte die Calpainaktivität in den Reaktionsansätzen früherer Studien gehemmt werden [158,159]. Dennoch war es im Vorfeld dieser Studie nicht möglich, die Umsetzung von Substrat durch Zugabe von EDTA vollständig zu unterbrechen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch Bindung von Ca^{2+} an die EF-hand-Strukturen des Calpainmoleküls strukturelle Veränderungen innerhalb des Enzyms eintreten [112]. Diese sind möglicherweise durch den Einsatz von Ca^{2+}-Chelatoren nicht mit sofortiger Wirkung reversibel. Ferner kommt auch eine unspezifische, Ca^{2+}-unabhängige Hydrolyse des Substrats durch andere Proteasen wie den bei Infarkt ebenfalls aktivierten Cathepsinen in Betracht [160].

Nach Homogenisierung und Zentrifugation wurden die Überstände der kardialen Gewebeproben bei -20° C beziehungsweise -80° C eingefroren. Dies hatte im Vorfeld dieser Studie zu einer Aggregation und Präzipitation der Proteine geführt. Ursächlich hierfür könnte ein von Pal et al. [161] beschriebener Prozess sein, demzufolge die Untereinheiten von Calpain zunächst in Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen dissoziieren und sich in weiteren Schritten Homodimere der kleinen Untereinheiten und größere Cluster aus großen Untereinheiten und Ca^{2+}-gebundenen Heterodimeren des Calpains bilden.

Durch diesen nur anfänglich noch reversiblen Prozess entstehen unlösliche Aggregate wie sie auch in dieser Studie zu beobachten waren. Da in dieser Studie ein Ca^{2+}-freier Homogenisierungspuffer verwendet worden ist, käme als Erklärung eine Dissoziation der Untereinheiten bereits in vivo in Betracht. Eine Aggregation nach dem von Pal et al. beschriebenen Mechanismus spräche zudem für die Abwesenheit des endogenen Calpaininhibitors Calpastatin in den kardialen Proben, da dieser eine Aggregation verhindert [161]. Eine reduzierte Aktivität von Calpastatin im ischämischen Herzen wurde bereits in früheren Studien beschrieben [132,133].

Durch Zugabe von Polyethylenglycol zu Calpain-haltigen Überständen konnten Yoshizawa et al. eine Aggregation verhindern und die Calpainmoleküle in Lösung halten. Zurückgeführt wird dies auf die Interaktion von Polyethylenglycol mit hydrophoben Abschnitten der dissoziierten Calpainuntereinheiten [154]. Ein solcher Mechanismus könnte auch dem in dieser Studie gewählten Verfahren, in dem durch Zugabe von Glycerin eine Aggregation vermieden werden konnte, zugrunde liegen.

4.2 Calpain I im nicht-infarzierten Myokard nach Infarkt

Nach der Etablierung des Enzymassays für Calpain I und II aus kardialen Gewebeproben, wurde die Aktivität beider Calpainformen im nicht-infarzierten (IS) und infarzierten (LVFW) Rattenmyokard 1, 3, 7 und 14 Tage nach Infarkt gemessen, um regionale und zeitliche Veränderung zu erfassen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der Aktivität von Calpain I im nicht infarzierten Myokard (IS) mit den höchsten Werten 14 Tage nach Infarktereignis, während Calpain II in dieser kardialen Region relativ zu Calpain I weniger Aktivität zeigte (Abb. 8a, 10a). Der Anstieg der Calpain I-Aktivität 14 Tage nach Infarkt wurde begleitet durch eine kompensierte kardiale Hypertrophie, belegt durch den angestiegenen Quotienten THW/BW. Diese Resultate stimmen mit Ergebnissen früherer Studien überein, die eine Heraufregulierung von Transkription und Translation im nicht infarzierten, hypertrophierten Rattenherz zeigten [73]. Ferner konnten Studien an Ratten demonstrieren, dass assoziiert mit kardialer Hypertrophie nach Drucküberlastung, ein diastolischer Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration in ventrikulären Myozyten des insuffizienten Herzens auftrat [36,162]. Ein solcher Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration ereignete sich ebenfalls assoziiert mit kardialer

Hypertrophie im Gefolge eines akuten Myokardinfarktes [163]. Ursächlich hierfür könnte ein vermehrter Einstrom von Ca^{2+}-Ionen in die Myozyten [164] und/oder eine verminderte Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum sein [165]. Diese erhöhten Ca^{2+}-Konzentrationen im nicht-infarzierten Myokard (IS) in der späten Phase nach einem Infarktereignis könnten für die Aktivierung von Calpain I verantwortlich sein.

Da Calpain II sehr viel höhere Konzentrationen an Ca^{2+}-Ionen zur Aktivierung benötigt, die in vitro im millimolaren Bereich liegen [105], ist der Anstieg des intrazellulären Calciums im nicht-infarzierten Myokard wahrscheinlich nicht ausreichend, um Calpain II zu aktivieren. Dagegen konnten frühere Studien zeigen, dass Calpain I bereits durch einen moderaten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration im hypertrophierenden Myokard bei Herzinsuffizienz aktiviert wird [102]. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei der Aktivierung von Calpainen in vivo Mechanismen wie Dissoziation der Untereinheiten, limitierte Autolyse und Komplexbildung mit Calpainaktivatorproteinen eine Rolle spielen, die den Ca^{2+}-Bedarf und die Aktivität beeinflussen [119,123,126].

Da Proteine wie Spectrin (Fodrin) , Dystrophin, und Vinculin, die das Zytoskelett mit der Plasmamembran verbinden [166], Substrate für Calpain I sind [112], könnte ein Abbau dieser myokardialen Strukturproteine der erste Schritt für eine Änderung von Gestalt und Größe der Myozyten nach akutem Myokardinfarkt sein. Calpain I scheint demnach in strukturelle Remodeling-Prozesse und in die Entwicklung kardialer Hypertrophie im nicht-infarzierten Myokard involviert zu sein.
Weitere Studien sind jedoch nötig, um zu untersuchen, ob Calpain im Rahmen eines kardialen Remodelings Strukturproteine auch in vivo abbaut und inwieweit dieser Prozess in der Pathogenese des Remodelings eine Rolle spielt. Erste Ergebnisse weisen in diese Richtung [167].

4.3 Calpain II im infarzierten Myokard

Im Gegensatz zu Calpain I erreichte Calpain II 3 Tage nach Infarktereignis im infarzierten Myokard (LVFW) die maximale Aktivität (Abb. 8b, 10b). Das experimentelle Tiermodell des akuten Myokardinfarktes, das in dieser Studie verwendet

wurde, führte zu einer Ischämie der linken, freien Ventrikelwand. In der akuten Phase des Infarkts ist dies assoziiert mit einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration [168], was als Schlüsselereignis der strukturellen Degradierung des Myokards und der kardialen Nekrose gilt [169].

Die Calcium-Überladung der Myozyten erreicht jedoch nur mikromolare und nicht millimolare Konzentrationen [169], wie sie in früheren Studien für eine optimale Aktivität für Calpain II in vitro angegeben wurden [105]. Matsumura et al. konnten jedoch zeigen, dass Calpain in vivo bereits bei Ca^{2+}-Konzentrationen unterhalb von 1 µM aktiviert wird [170].

Darüber hinaus wäre es möglich, dass der initiale Anstieg des intrazellulären Calciums bereits eine Aktivierung von Calpain I bewirkt, was zu einem Abbau von Membranproteinen führen könnte, die in den Ca^{2+}-Transport involviert sind [171]. Dies hätte eine weitere Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration und konsekutiv eine weitere Aktivierung von Calpain II zur Konsequenz.

In früheren Studien konnten Sandmann und Mitarbeiter eine Heraufregulierung von Calpain II im infarzierten Herz zeigen und Tolnai und Korecky eine Reduktion der Calpastatinaktivität im ischämischen Myokard nachweisen [73,132]. Beides lässt vermuten, dass das Verhältnis zwischen Calpain und Calpastatin in Richtung einer höheren Calpainaktivität verschoben ist.

Diese Aktivierung von kardialem Calpain II führt zu einer gesteigerten Proteolyse von Calpainsubstraten, darunter Proteine des Zytoskeletts und der Plasmamembran [134], mit der Folge von Zellschäden, kardialer Nekrose [158] und Apoptose [50].

Im Widerspruch zu den Ergebnissen in dieser Studie stellten Toyo-Oka et al. [172] in Herzen von Hunden nach Infarktinduktion einen Abfall der Calpainaktivität fest. Bei dieser Studie wurde jedoch keine Unterscheidung zwischen Calpain I und II vorgenommen und im Gegensatz zu dieser Arbeit verwendeten Toyo-Oka et al. kein spezifisches, fluorogenes Substrat zur Bestimmung der Calpainaktivität. Ferner erfolgte die Auswertung der Gewebeproben bereits 3 h nach Infarktereignis, während in dieser Studie das Aktivitätsmaximum für Calpain II erst nach drei Tagen erreicht wurde. Diese Unterschiede könnten die Diskrepanzen zwischen den Studien erklären.

Atsma et al. [173] stellten nach metabolischer Inhibition eine deutliche Aktivitätssteigerung von Calpain fest, sahen jedoch keine Verhinderung des Zelltodes

durch eine Inhibitor-vermittelte Unterdrückung der intrazellulären Calpainaktivität und zogen die Schlussfolgerung, dass Calpain beim Zelltod keine Rolle zukommt. Diese Studie ist durch die verwendete metabolische Inhibition mit Zyanidionen mit dieser Studie, bei der durch Koronarligation ein akuter Myokardinfarkt induziert wurde, nur eingeschränkt vergleichbar. Darüber hinaus wurde keine Differenzierung zwischen den Calpainformen und Herzregionen vorgenommen. Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Atsma et al. haben andere Studien eine protektive Wirkung der eingesetzten Calpaininhibitoren Leupeptin und Calpaininhibitor-1 zeigen können [142,143].

Weitere Studien sind notwendig, um zu untersuchen, ob die in dieser Studie gezeigte Aktivitätssteigerung von Calpain II nach Myokardinfarkt auch in vivo zu einem vermehrten Abbau von Proteinen des Zytoskeletts und der Plasmamembran durch Calpain II führt, und inwiefern ein solcher Abbau bei der Entwicklung der Nekrose von Herzgewebe eine Rolle spielt.

4.4 Auswirkungen des Calpaininhibitors CAL 9961 auf kardiale Calpaine

Eines der Hauptziele dieser Studie war die Untersuchung der Auswirkungen des zellpermeablen Calpaininhibitors CAL 9961 auf die Aktivität der kardialen Calpaine in vitro und in vivo sowie die Einschätzung der Selektivität des Inhibitors zu Calpain I und II.

Die Experimente in vitro zeigten, dass CAL 9961 die Aktivität beider Calpainformen wirksam hemmen konnte, sowohl in Ansätzen mit kommerziellem Calpain I und II als auch in rohen Überständen von kardialen Gewebeproben.

Eine chronische Therapie von Versuchstieren der Infarktgruppen reduzierte die Calpain I-Aktivität 14 Tage nach Infarkt im nicht-infarzierten Myokard und unterdrückte den Anstieg der Calpain II-Aktivität im infarzierten Herzgewebe 3 Tage nach Infarkt (Abb. 11a, b). Der Umstand, dass Calpain I und II in chromatographisch fraktionierten Herzproben inaktiv waren, lässt auf eine deutliche inhibitorische Wirkung von CAL 9961 auf kardiale Calpaine schließen.

Die Ergebnisse in Abb. 11a und b deuten auf eine höhere Affinität von CAL 9961 zu Calpain II hin.
Während in früheren Studien die inhibitorische Potenz verschiedener Calpaininhibitoren wie E-64c [174], Calpaininhibitor-1 [142] und NCO-700 [175] im ischämischen Myokard gezeigt werden konnte, wurde in dieser Studie erstmals die inhibitorische Wirkung des Calpaininhibitors CAL 9961 auf kardiale Calpaine in einem Tiermodell mit permanenter Koronarokklusion an Ratten demonstriert.

Eine Reihe von Studien konnte eine Beteiligung aktivierter Calpaine beim Abbau von kardialen Proteinen wie Alpha-Actinin, Desmin, Spectrin, Vinculin oder Dystrophin unter ischämischen Bedingungen nachweisen [143,167,176]. Dies war assoziiert mit Zelltod der Myozyten, Verlust struktureller Integrität und kardialer Dysfunktion. Weiterhin konnten Studien zeigen, dass durch Einsatz der Calpaininhibitoren NCO-700, E-64c, Leupeptin und Calpaininhibitor-1 eine Reduktion der Infarktgröße beziehungsweise eine Funktionsverbesserung des Arbeitsmyokards erreicht werden konnte [142,143,174,175], was auf eine Beteiligung von Calpainen am myokardialen Abbauprozess nach Infarkt schließen lässt.

Im Widerspruch hierzu konnten Atsma et al. [173] bei einer Studie mit metabolisch gehemmten Myozyten durch Leupeptin und Calpaininhibitor-1 zwar eine Reduktion der Calpainaktivität erreichen, jedoch keine Verhinderung des Zelltodes. Möglicherweise sind diese Diskrepanzen auf die Unterschiede in der Pathogenese zwischen metabolischer Inhibition an neonatalen Rattenmyozyten und Myokardinfarkt an adulten Herzen zurückzuführen. Bei einer Studie mit adulten Myozyten konnten Iizuka und Mitarbeiter [177] eine deutliche Reduktion der Zelltodrate nach Hypoxie durch Calpaininhibitor-1 und E-64 demonstrieren.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie lässt sich vermuten, dass durch CAL 9961 ein Calpain I-vermitteltes strukturelles Remodeling des Herzens in der späten Phase nach Infarkt und Calpain II-induzierte kardiale Gewebeschäden in der akuten Phase nach Infarkt verhindert werden können.
Es sind jedoch weitere Experimente notwendig mit permanent koronarligierten Ratten, um die Korrelation zwischen Inhibition der kardialen Calpaine durch CAL 9961 und

den Auswirkungen auf Infarktgröße, myokardialem Remodeling und kardialer Funktion zu klären. Weitere Studien mit Calpainform-spezifischen Inhibitoren oder Knock-out-Mäusen sind nötig, um die individuelle Rolle von Calpain I und II unter den Bedingungen einer kardialen Ischämie zu bestimmen. Zukünftige Forschung könnte dann eine Überprüfung der klinischen Anwendbarkeit von Calpaininhibitoren zum Ziel haben, auch im Hinblick auf die durch die physiologischen Funktionen von Calpainen zu erwartenden Nebenwirkungen.

5. Zusammenfassung

Als Folge eines akuten Myokardinfarktes kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration assoziiert mit einer Aktivierung der kardialen Cysteinproteasen Calpain I und II. Diese scheinen in der Pathogenese von Gewebeschäden und Nekrose nach Myokardinfarkt eine wesentliche Rolle zu spielen. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Calpain I bei kardialen Umbauprozessen nach Infarkt.
Calpaininhibitoren könnten daher in der Therapie des Myokardinfarkts erfolgreich eingesetzt werden. Unter den Bedingungen einer kardialen Ischämie konnte bei einigen dieser Substanzen eine kardioprotektive Wirkung demonstriert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein Aktivitätsprofil der beiden Calpainformen im infarzierten und nicht-infarzierten Myokard erstellt und die Auswirkungen des Calpaininhibitors CAL 9961 in vitro und in vivo untersucht.
Hierzu wurde an Ratten durch permanente Ligation der linken Koronararterie ein akuter Myokardinfarkt induziert. Ein, 3, 7 und 14 Tage nach Infarkt wurden Calpain I und II aus Gewebehomogenaten von interventrikulärem Septum (IS) und linker, freier Ventrikelwand (LVFW) mittels Chromatographie auf DEAE-Sepharose getrennt. Die Aktivität wurde in scheinoperierten und Infarkt-induzierten Tieren mit chronischer Placebo- oder CAL 9961-Therapie mithilfe eines Enzymassays mit synthetischem Substrat gemessen. Die Therapie wurde 3 Tage vor Infarktinduktion begonnen.

Calpain I-Aktivität erreichte 14 Tage nach Infarkt höchste Werte im nicht-infarzierten Myokard (IS), während die maximale Calpain II-Aktivität 3 Tage nach Infarktereignis im infarzierten Herzgewebe (LVFW) gemessen wurde. In Experimenten in vitro hemmte CAL 9961 beide Calpainformen vollständig. In vivo verhinderte eine chronische Therapie mit CAL 9961 bei Tieren mit Myokardinfarkt teilweise den Anstieg der Calpain I-Aktivität im nicht-infarzierten Gewebe (IS) und reduzierte die Calpain II-Aktivität im infarzierten Myokard (LVFW) auf das Level scheinoperierter Tiere.

Die in dieser Dissertation erbrachten Ergebnisse zeigen, dass die kardialen Calpaine I und II nach einem akuten Myokardinfarkt aktiviert werden, sich ihre Aktivierung jedoch innerhalb des Myokards zeitlich und regional unterscheidet. Die chronische Inhibition dieser Enzyme könnte die Calpain-vermittelten Gewebeschäden limitieren und zur Erhaltung der strukturellen Integrität des Myokards nach Infarkt beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, KORA Herzinfarktregister Augsburg. Altersstandardisierte Herzinfarkt-Raten und 28-Tagesletalität. *Gesundheitsberichterstattung http://gbe-bund.de* 2002.

2. Statistisches Bundesamt, OECD Health Data. Altersstandardisierte Sterbefälle durch akuten Myokardinfarkt. *Gesundheitsberichterstattung http://gbe-bund.de* 2002.

3. Koenig W. Epidemiology of coronary heart disease. *Z.Kardiol.* 1998; 87 Suppl 2: 3-7.

4. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1269-1276.

5. Tavazzi L. Clinical epidemiology of acute myocardial infarction. *Am.Heart J.* 1999; 138: S48-S54.

6. Cooper R, Cutler J, Desvigne-Nickens P, Fortmann SP, Friedman L, Havlik R, Hogelin G, Marler J, McGovern P, Morosco G, Mosca L, Pearson T, Stamler J, Stryer D, and Thom T. Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the United States: findings of the national conference on cardiovascular disease prevention. *Circulation* 2000; 102: 3137-3147.

7. Johansen H, Nair C, Taylor G. Current and future hospitalization after heart attack. *Health Rep.* 1998; 10: 21-28.

8. Van de Werf F, Ardissino D, Betriu A, Cokkinos DV, Falk E, Fox KA, Julian D, Lengyel M, Neumann FJ, Ruzyllo W, Thygesen C, Underwood SR, Vahanian A, Verheugt FW, and Wijns W. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur.Heart J.* 2003; 24: 28-66.

9. Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N.Engl.J.Med.* 1999; 340: 1555-1564.

10. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 1999; 282: 2035-2042.

11. Rentrop KP. Thrombi in acute coronary syndromes : revisited and revised. *Circulation* 2000; 101: 1619-1626.

12. Cheitlin MD, McAllister HA, de Castro CM. Myocardial infarction without atherosclerosis. *JAMA* 1975; 231: 951-959.

13. Mirvis DM, Goldberger AL. Electrocardiography. In: Braunwald E., Zipes DP, Libby P, eds. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company 2001: 82-123.

14. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56: 786-794.

15. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am.J.Cardiol.* 1983; 52: 72A-81A.

16. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, Jones RH, Kereiakes D, Kupersmith J, Levin TN, Pepine CJ, Schaeffer JW, Smith EE III, Steward DE, Theroux P, Alpert JS, Eagle KA, Faxon DP, Fuster V, Gardner TJ, Gregoratos G, Russell RO, and Smith SC Jr. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J.Am.Coll.Cardiol.* 2000; 36: 970-1062.

17. Hamm CW, Bertrand M, Braunwald E. Acute coronary syndrome without ST elevation: implementation of new guidelines. *Lancet* 2001; 358: 1533-1538.

18. Pollack CV, Jr., Roe MT, Peterson ED. 2002 update to the ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: implications for emergency department practice. *Ann.Emerg.Med.* 2003; 41: 355-369.

19. Edwards WD. Pathology of Myocardial Infarction and Reperfusion. In: Gersh BJ, Rahimtoola SH, eds. *Acute myocardial infarction*. New York: Chapman & Hall 1997: 16-50.

20. Schoen FJ. The Heart. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1999: 543-598.

21. Antman EM, Braunwald E. Acute myocardial infarction. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, eds. *Heart Disease: A textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company 2001: 1114-1207.

22. Harper RW, Kennedy G, DeSanctis RW, Hutter AM Jr. The incidence and pattern of angina prior to acute myocardial infarction: a study of 577 cases. *Am.Heart J.* 1979; 97: 178-183.

23. Uretsky BF, Farquhar DS, Berezin AF, Hood WB Jr. Symptomatic myocardial infarction without chest pain: prevalence and clinical course. *Am.J.Cardiol.* 1977; 40: 498-503.

24. Logan RL, Wong F, Barclay J. Symptoms associated with myocardial infarction: are they of diagnostic value? *N.Z.Med.J.* 1986; 99: 276-278.

25. Fozzard HA, Makielski JC. The electrophysiology of acute myocardial ischemia. *Annu.Rev.Med.* 1985; 36: 275-284.

26. Gadsboll N, Hoilund-Carlsen PF, Nielsen GG, Berning J, Brunn NE, Stage P, Hein E, Marving J, Longborg-Jensen H, and Jensen BH. Symptoms and signs of heart failure in patients with myocardial infarction: reproducibility and relationship to chest X-ray, radionuclide ventriculography and right heart catheterization. *Eur.Heart J.* 1989; 10: 1017-1028.

27. Goldberg RJ, Gore JM, Alpert JS, Osganian V, de Groot J, Bade J, Chen Z, Frid D, and Dalen JE. Cardiogenic shock after acute myocardial infarction. Incidence and mortality from a community-wide perspective, 1975 to 1988. *N.Engl.J.Med.* 1991; 325: 1117-1122.

28. Theroux P. Protection of the myocardial cell during ischemia. *Am.J.Cardiol.* 1999; 83: 3G-9G.

29. Opie LH. Myocardial metabolism and heart disease. *Jpn.Circ.J.* 1978; 42: 1223-1247.

30. Alpert JS. The pathophysiology of acute myocardial infarction. *Cardiology* 1989; 76: 85-95.

31. Imai K, Wang T, Millard RW, Ashraf M, Kranias EG, Asano G, Grassi de Gende AO, Nagao T, Solaro RJ, and Schwartz A. Ischaemia-induced changes in canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *Cardiovasc.Res.* 1983; 17: 696-709.

32. Ferrari R. Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion. *Am.J.Cardiol.* 1995; 76: 17B-24B.

33. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, and Cascio WE. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* 1996; 76: 99-114.

34. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995; 80: 259-268.

35. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature* 1998; 395: 645-648.

36. Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ.Res.* 1987; 60: 700-707.

37. Kobayashi Y, Sasai Y, Nakamura N, Katagiri T. Studies on the Na+-K+-ATPase in myocardial infarction. *Jpn.Circ.J.* 1981; 45: 1256-1263.

38. Allen DG, Xiao XH. Role of the cardiac Na+/H+ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc.Res.* 2003; 57: 934-941.

39. Yoshida K, Inui M, Harada K, Saido TC, Sorimachi Y, Ishihara T, Kawashima S, and Sobue K. Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of calspectin (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ.Res.* 1995; 77: 603-610.

40. Su X, Sekiguchi M, Endo M. An ultrastructural study of cardiac myocytes in postmyocardial infarction ventricular aneurysm representative of chronic ischemic myocardium using semiquantitative and quantitative assessment. *Cardiovasc.Pathol.* 2000; 9: 1-8.

41. Jennings RB, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Myocardial ischemia and reperfusion. *Monogr Pathol.* 1995; 37: 47-80.

42. Das UN. Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction. *Mol.Cell Biochem.* 2000; 215: 145-152.

43. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 1991; 5 Suppl 2: 249-268.

44. Mehta J, Dinerman J, Mehta P, Saldeen TG, Lawson D, Donnelly WH, and Wallin R. Neutrophil function in ischemic heart disease. *Circulation* 1989; 79: 549-556.

45. Reimer KA, Jennings RB. Myocardial ischemia, hypoxia and infarction. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz A, Morgan H, eds. *The heart and cardiovascular system*. New York: Raven Press 1986: 1133-1201.

46. Bowers KC, Allshire AP, Cobbold PH. Bioluminescent measurement in single cardiomyocytes of sudden cytosolic ATP depletion coincident with rigor. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1992; 24: 213-218.

47. Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res.Cardiol.* 1998; 93 Suppl 3: 8-12.

48. Rodriguez M, Lucchesi BR, Schaper J. Apoptosis in myocardial infarction. *Ann.Med.* 2002; 34: 470-479.

49. Abbate A, Melfi R, Patti G, Baldi F, D'Ambrosio A, Manzoli A, Baldi A, and Di Sciascio G. Apoptosis in recent myocardial infarction. *Clin.Ter.* 2000; 151: 247-251.

50. Chen M, Won DJ, Krajewski S, Gottlieb RA. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 29181-29186.

51. Forrester JS, Wyatt HL, da Luz PL, Tyberg JV, Diamond GA, Swan HJ. Functional significance of regional ischemic contraction abnormalities. *Circulation* 1976; 54: 64-70.

52. Herman MV, Heinle RA, Klein MD, Gorlin R. Localized disorders in myocardial contraction. Asynergy and its role in congestive heart failure. *N.Engl.J.Med.* 1967; 277: 222-232.

53. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146-1149.

54. Schwarz ER, Speakman MT, vom Dahl J, Kloner RA. Hibernating myocardium: is there evidence for chronic flow reduction? *Heart Dis.* 1999; 1: 155-162.

55. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 1988; 78: 186-201.

56. Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ.Res.* 1990; 67: 23-34.

57. Hollenberg SM, Kavinsky CJ, Parrillo JE. Cardiogenic shock. *Ann.Intern.Med.* 1999; 131: 47-59.

58. Braunwald E, Pfeffer MA. Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am.J.Cardiol.* 1991; 68: 1D-6D.

59. Cooklin M. Devices for the management of ventricular arrhythmias in cardiac failure. *Heart Fail.Rev.* 2002; 7: 301-310.

60. Opie LH. Products of myocardial ischemia and electrical instability of the heart. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1985; 5: 162B-165B.

61. Pirzada FA, Ekong EA, Vokonas PS, Apstein CS, Hood WB Jr. Experimental myocardial infarction. XIII. Sequential changes in left ventricular pressure-length relationships in the acute phase. *Circulation* 1976; 53: 970-975.

62. Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr.Drug Targets.Cardiovasc.Haematol.Disord.* 2003; 3: 1-30.

63. Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, Garrison JB, Weisfeldt ML. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography. *N.Engl.J.Med.* 1979; 300: 57-62.

64. Hutchins GM, Bulkley BH. Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *Am.J.Cardiol.* 1978; 41: 1127-1132.

65. Erlebacher JA, Richter RC, Alonso DR, Devereux RB, Gay WA, Jr. Early infarct expansion: structural or functional? *J.Am.Coll.Cardiol.* 1985; 6: 839-844.

66. Vracko R, Thorning D, Frederickson RG. Connective tissue cells in healing rat myocardium. A study of cell reactions in rhythmically contracting environment. *Am.J.Pathol.* 1989; 134: 993-1006.

67. Lerman RH, Apstein CS, Kagan HM, Osmers EL, Chichester CO, Vogel WM, Connelly CM, and Steffee WP. Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit. *Circ.Res.* 1983; 53: 378-388.

68. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am.J.Pathol.* 1995; 147: 325-338.

69. Erlebacher JA, Weiss JL, Eaton LW, Kallman C, Weisfeldt ML, Bulkley BH. Late effects of acute infarct dilation on heart size: a two dimensional echocardiographic study. *Am.J.Cardiol.* 1982; 49: 1120-1126.

70. Mitchell GF, Lamas GA, Vaughan DE, Pfeffer MA. Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1992; 19: 1136-1144.

71. Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. *Am.J.Physiol* 1985; 248: H876-H882.

72. Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, and Weber, M. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 2002; 16: 149-160.

73. Sandmann S, Yu M, Unger T. Transcriptional and translational regulation of calpain in the rat heart after myocardial infarction--effects of AT(1) and AT(2) receptor antagonists and ACE inhibitor. *Br.J.Pharmacol.* 2001; 132: 767-777.

74. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 2000; 25: 299-306.

75. Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc.Res.* 1993; 27: 2130-2134.

76. Dorn GW. Adrenergic pathways and left ventricular remodeling. *J.Card Fail.* 2002; 8: S370-S373.

77. Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Baldi A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J.Cell Physiol* 2002; 193: 145-153.

78. Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, and Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J.Clin.Invest* 1996; 97: 2891-2897.

79. Gaudron P, Eilles C, Ertl G, Kochsiek K. Early remodelling of the left ventricle in patients with myocardial infarction. *Eur.Heart J.* 1990; 11 Suppl B: 139-146.

80. Gulch RW, Jacob R. Geometric and muscle physiological determinants of cardiac stroke volume as evaluated on the basis of model calculations. *Basic Res.Cardiol.* 1988; 83: 476-485.

81. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161-1172.

82. Ryan TJ, Antman EM, Brooks NH, Califf RM, Hillis LD, Hiratzka LF, Rapaport E, Riegel B, Russell R O, Smith EE III, Weaver WD, Gibbons RJ, Alpert JS, Eagle KA, Gardner TJ, Garson A Jr., Gregoratos G, and Smith SC Jr. 1999 update: ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction: Executive Summary and Recommendations: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). *Circulation* 1999; 100: 1016-1030.

83. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, and Ruzyllo W. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur.Heart J.* 2002; 23: 1809-1840.

84. Loos D, Schneider R, Schorner W. Changes in regional body blood volume caused by nitroglycerin. *Z.Kardiol.* 1983; 72 Suppl 3: 29-32.

85. Warnica JW. Pharmacologic Management of Acute Myocardial Infarction. In: Gersh BJ, Rahimtoola SH, eds. *Acute Myocardial Infarction*. New York: Chapman & Hall 1997: 275-307.

86. Herlitz J. Analgesia in myocardial infarction. *Drugs* 1989; 37: 939-944.

87. Maroko PR, Radvany P, Braunwald E, Hale SL. Reduction of infarct size by oxygen inhalation following acute coronary occlusion. *Circulation* 1975; 52: 360-368.

88. Arntz HR, Tebbe U, Schuster HP, Sauer G, Meyer J. Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des akuten Herzinfarkts in der Prähospitalphase. *Zeitschrift für Kardiologie* 2000; 89: 364-372.

89. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.

90. Prehospital thrombolytic therapy in patients with suspected acute myocardial infarction. The European Myocardial Infarction Project Group. *N.Engl.J.Med.* 1993; 329: 383-389.

91. Sherry S. Concepts, Perspectives and Clinical Applications. In: Sherry S, ed. *Fibrinolysis, Thrombosis & Hemostasis*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 1992: 119-160.

92. Verstraete M. Third-generation thrombolytic drugs. *Am.J.Med.* 2000; 109: 52-58.

93. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. *Lancet* 1994; 343: 311-322.

94. Latini R, Maggioni AP, Flather M, Sleight P, Tognoni G. ACE inhibitor use in patients with myocardial infarction. Summary of evidence from clinical trials. *Circulation* 1995; 92: 3132-3137.

95. Canto JG, Every NR, Magid DJ, Rogers WJ, Malmgren JA, Frederick PD, French WJ, Tiefenbrunn AJ, Misra VK, Kiefe CI, and Barron HV. The volume of primary angioplasty procedures and survival after acute myocardial infarction. National Registry of Myocardial Infarction 2 Investigators. *N.Engl.J.Med.* 2000; 342: 1573-1580.

96. Ellis SG, Da Silva ER, Heyndrickx G, Talley JD, Cernigliaro C, Steg G, Spaulding C, Nobuyoshi M, Erbel R, and Vassanelli C. Randomized comparison of rescue angioplasty with conservative management of patients with early failure of thrombolysis for acute anterior myocardial infarction. *Circulation* 1994; 90: 2280-2284.

97. Murachi T. Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem.Int.* 1989; 18: 263-294.

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

99. Dayton WR, Goll DE, Stromer MH, Reville WJ, Zeece MG, Robson RM. Some properties of a Ca2+-activated protease that may be involved in myofibrillarprotein turnover. In: Reich E, Rifkin DB, Shaw E, eds. *Proteases and Biological control*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory 1975.

100. Dayton WR, Reville WJ, Goll DE, Stromer MH. A Ca2+-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 1976; 15: 2159-2167.

101. Dayton WR, Goll DE, Zeece MG, Robson RM, Reville WJ. A Ca2+-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 1976; 15: 2150-2158.

102. Mellgren RL. Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two forms with different requirements for calcium. *FEBS Lett.* 1980; 109: 129-133.

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

104. Barrett AJ, Rawlings ND. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem.* 2001; 382: 727-733.

105. Croall DE, DeMartino GN. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 1991; 71: 813-847.

106. Croall DE, DeMartino GN. Comparison of two calcium-dependent proteinases from bovine heart. *Biochim.Biophys.Acta* 1984; 788: 348-355.

107. Emori Y, Kawasaki H, Sugihara H, Imajoh S, Kawashima S, Suzuki K. Isolation and sequence analyses of cDNA clones for the large subunits of two isozymes of rabbit calcium-dependent protease. *J Biol Chem.* 1986; 261: 9465-9471.

108. Yoshimura N, Hatanaka M, Kitahara A, Kawaguchi N, Murachi T. Intracellular localization of two distinct Ca2+-proteases (calpain I and calpain II) as demonstrated by using discriminative antibodies. *J Biol Chem.* 1984; 259: 9847-9852.

109. Sorimachi H, Suzuki K. The structure of calpain. *J Biochem.(Tokyo)* 2001; 129: 653-664.

110. Aoki K, Imajoh S, Ohno S, Emori Y, Koike M, Kosaki G, and Suzuki, K. Complete amino acid sequence of the large subunit of the low-Ca2+-requiring form of human Ca2+-activated neutral protease (muCANP) deduced from its cDNA sequence. *FEBS Lett.* 1986; 205: 313-317.

111. Imajoh S, Aoki K, Ohno S, Emori Y, Kawasaki H, Sugihara H, and Suzuki, K. Molecular cloning of the cDNA for the large subunit of the high-Ca2+-requiring form of human Ca2+-activated neutral protease. *Biochemistry* 1988; 27: 8122-8128.

112. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003; 83: 731-801.

113. Tompa P, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K, Friedrich P. Domain III of calpain is a ca2+-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001; 280: 1333-1339.

114. Kawasaki H, Imajoh S, Kawashima S, Hayashi H, Suzuki K. The small subunits of calcium dependent proteases with different calcium sensitivities are identical. *J Biochem.(Tokyo)* 1986; 99: 1525-1532.

115. Imajoh S, Kawasaki H, Suzuki K. The amino-terminal hydrophobic region of the small subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. *J Biochem.(Tokyo)* 1986; 99: 1281-1284.

116. Lin GD, Chattopadhyay D, Maki M, Wang KK, Carson M, Jin L, Yuen PW, Takano E, Hatanaka M, DeLucas LJ, and Narayana SV. Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 A resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat.Struct.Biol* 1997; 4: 539-547.

117. Kumamoto T, Kleese WC, Cong JY, Goll DE, Pierce PR, Allen RE. Localization of the Ca(2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anat.Rec.* 1992; 232: 60-77.

118. Kunimatsu M, Tada T, Narita Y, Ozaki Y, Liu ZQ, Shearer TR, and Sasaki, M. Activation of calpain in myocardial infarction: an immunohistochemical study using a calpain antibody raised against active site histidine-containing peptide. *Cardiovasc.Pathol.* 1999; 8: 7-15.

119. Suzuki K, Sorimachi H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.* 1998; 433: 1-4.

120. Pontremoli S, Melloni E, Sparatore B, Salamino F, Michetti M, Sacco O, and Horecker BL. Binding to erythrocyte membrane is the physiological mechanism for

activation of Ca2+-dependent neutral proteinase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1985; 128: 331-338.

121. Pontremoli S, Melloni E, Sparatore B, Salamino F, Michetti M, Sacco O, and Horecker BL. Role of phospholipids in the activation of the Ca2+-dependent neutral proteinase of human erythrocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1985; 129: 389-395.

122. Nagainis PA, Sathe SK, Goll DE, Edmunds T. Autolysis of high-Ca2+ and low-Ca2+-forms of the Ca2+-dependent proteinase from bovine skeletal muscle. *Federation Proceedings* 1983; 42: 1780.

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

124. Imajoh S, Kawasaki H, Suzuki K. Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP): reduction of the Ca2+-requirement is due to the NH2-terminal processing of the large subunit. *J Biochem.(Tokyo)* 1986; 100: 633-642.

125. Michetti M, Viotti PL, Melloni E, Pontremoli S. Mechanism of action of the calpain activator protein in rat skeletal muscle. *Eur.J Biochem.* 1991; 202: 1177-1180.

126. 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.

127. Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K. Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995; 208: 376-383.

128. Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, Kinbara K, Ishiura S. Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol Chem.Hoppe Seyler* 1995; 376: 523-529.

129. Mellgren RL, Song K, Mericle MT. m-Calpain requires DNA for activity on nuclear proteins at low calcium concentrations. *J Biol Chem.* 1993; 268: 653-657.

130. Waxman L, Krebs EG. Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem.* 1978; 253: 5888-5891.

131. Suzuki K, Imajoh S, Emori Y, Kawasaki H, Minami Y, Ohno S. Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. Activation at the cell membrane and biological function. *FEBS Lett.* 1987; 220: 271-277.

132. Tolnai S, Korecky B. Calcium-dependent proteolysis and its inhibition in the ischemic rat myocardium. *Can.J Cardiol.* 1986; 2: 42-47.

133. Sorimachi Y, Harada K, Saido TC, Ono T, Kawashima S, Yoshida K. Downregulation of calpastatin in rat heart after brief ischemia and reperfusion. *J Biochem.(Tokyo)* 1997; 122: 743-748.

134. Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J* 1994; 8: 814-822.

135. Perrin BJ, Huttenlocher A. Calpain. *Int.J Biochem.Cell Biol* 2002; 34: 722-725.

136. Reverter D, Sorimachi H, Bode W. The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function. *Trends Cardiovasc.Med.* 2001; 11: 222-229.

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

138. Szomor Z, Shimizu K, Fujimori Y, Yamamoto S, Yamamuro T. Appearance of calpain correlates with arthritis and cartilage destruction in collagen induced arthritic knee joints of mice. *Ann.Rheum.Dis.* 1995; 54: 477-483.

139. Hong SC, Goto Y, Lanzino G, Soleau S, Kassell NF, Lee KS. Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 1994; 25: 663-669.

140. Atsma DE. Introduction. In: Atsma DE, ed. *Mechanisms of cell death in energy depleted cardiomyocytes: role of calcium overload, calpain and phospholipase*. Leiden: Atsma DE 1996: 1-23.

141. DePetrillo PB. Calpains inhibitors - A review of the recent patent literature. *Idrugs.* 2002; 5: 568-576.

142. Iwamoto H, Miura T, Okamura T, Shirakawa K, Iwatate M, Kawamura S, Tatsuno H, Ikeda Y, and 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.

143. Matsumura Y, Saeki E, Inoue M, Hori M, Kamada T, Kusuoka H. Inhomogeneous disappearance of myofilament-related cytoskeletal proteins in stunned myocardium of guinea pig. *Circ.Res.* 1996; 79: 447-454.

144. Wang KK, Yuen PW. Development and therapeutic potential of calpain inhibitors. *Adv.Pharmacol.* 1997; 37: 117-152.

145. Inoue J, Nakamura M, Cui YS, Sakai Y, Sakai O, Hill JR, Wang KK, and Yuen PW. Structure-activity relationship study and drug profile of N-(4-fluorophenylsulfonyl)-L-valyl-L-leucinal (SJA6017) as a potent calpain inhibitor. *J Med.Chem.* 2003; 46: 868-871.

146. Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. A method of occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954; 140: 675-682.

147. Sandmann S, Spitznagel H, Chung O, Xia QG, Illner S, Janichen G, Rossius B, Daemen MJ, and Unger T. Effects of the calcium channel antagonist mibefradil on haemodynamic and morphological parameters in myocardial infarction-induced cardiac failure in rats. *Cardiovasc.Res.* 1998; 39: 339-350.

148. Spalla M, Tsang W, Kuo TH, Giacomelli F, Wiener J. Purification and characterization of two distinct Ca2+-activated proteinases from hearts of hypertensive rats. *Biochim.Biophys.Acta* 1985; 830: 258-266.

149. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

150. Sasaki T, Kikuchi T, Yumoto N, Yoshimura N, Murachi T. Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *J Biol Chem.* 1984; 259: 12489-12494.

151. Elce JS, Hegadorn C, Arthur JS. Autolysis, Ca2+ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J Biol Chem.* 1997; 272: 11268-11275.

152. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976; 72: 248-254.

153. Elce JS, Davies PL, Hegadorn C, Maurice DH, Arthur JS. The effects of truncations of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation. *Biochem.J* 1997; 326 (Pt 1): 31-38.

154. Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K. A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity. *FEBS Lett.* 1995; 358: 101-103.

155. Michetti M, Salamino F, Tedesco I, Averna M, Minafra R, Melloni E, and Pontremoli, S. Autolysis of human erythrocyte calpain produces two active enzyme forms with different cell localization. *FEBS Lett.* 1996; 392: 11-15.

156. Zhang W, Lane RD, Mellgren RL. The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells. *J Biol Chem.* 1996; 271: 18825-18830.

157. Tsuji S, Imahori K. Studies on the Ca2+-activated neutral proteinase of rabbit skeletal muscle. I. The characterization of the 80 K and the 30 K subunits. *J Biochem.(Tokyo)* 1981; 90: 233-240.

158. Iizuka K, Kawaguchi H, Yasuda H, Kitabatake A. The role of calcium activated neutral protease on myocardial cell injury in hypoxia. *Jpn.Heart J* 1992; 33: 707-715.

159. Molinari M, Anagli J, Carafoli E. Ca(2+)-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J Biol Chem.* 1994; 269: 27992-27995.

160. Tsuchida K, Aihara H, Isogai K, Hanada K, Shibata N. Degradation of myocardial structural proteins in myocardial infarcted dogs is reduced by Ep459, a cysteine proteinase inhibitor. *Biol Chem.Hoppe Seyler* 1986; 367: 39-45.

161. Pal GP, Elce JS, Jia Z. Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium. *J Biol Chem.* 2001; 276: 47233-47238.

162. Gwathmey JK, Morgan JP. Altered calcium handling in experimental pressure-overload hypertrophy in the ferret. *Circ.Res.* 1985; 57: 836-843.

163. Sandmann S, Min JY, Meissner A, Unger T. Effects of the calcium channel antagonist mibefradil on haemodynamic parameters and myocardial Ca(2+)-handling in infarct-induced heart failure in rats. *Cardiovasc.Res.* 1999; 44: 67-80.

164. Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri Z, Parker TG, Liu PP, Backx PH. Relationship between K+ channel down-regulation and [Ca2+]i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 1999; 517 (Pt 1): 229-245.

165. Szymanska G, Stromer H, Kim DH, Lorell BH, Morgan JP. Dynamic changes in sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Pflugers Arch.* 2000; 439: 339-348.

166. Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc.Res.* 2000; 45: 273-278.

167. Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyo-oka T, and Takeo S. Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc.Res.* 2003; 59: 419-427.

168. Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ.Res.* 1990; 66: 135-146.

169. Grinwald PM, Nayler WG. Calcium entry in the calcium paradox. *J Mol.Cell Cardiol.* 1981; 13: 867-880.

170. Matsumura Y, Saeki E, Otsu K, Morita T, Takeda H, Kuzuya T, Hori M, and Kusuoka H. Intracellular calcium level required for calpain activation in a single myocardial cell. *J Mol.Cell Cardiol.* 2001; 33: 1133-1142.

171. Salamino F, Sparatore B, Melloni E, Michetti M, Viotti PL, Pontremoli S, and Carafoli E. The plasma membrane calcium pump is the preferred calpain substrate within the erythrocyte. *Cell Calcium* 1994; 15: 28-35.

172. Toyo-oka T, Kamishiro T, Gotoh Y, Fumino H, Masaki T, Hosoda S. Temporary salvage of ischemic myocardium by the protease inhibitor bis[ethyl(2R,3R)-3-[(S)-methyl-1-[4-(2,3,4-trimethoxyphenyl-methyl) piperazin-1-ylcarbonyl]butyl-carbonyl]oxiran-2-carbo xylate]sulfate. *Arzneimittelforschung.* 1986; 36: 671-675.

173. Atsma DE, Bastiaanse EM, Jerzewski A, Van der Valk LJ, Van der Laarse A. Role of calcium-activated neutral protease (calpain) in cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition. *Circ.Res.* 1995; 76: 1071-1078.

174. Toda G, Matsushita S, Kuramoto K, Oda S, Ezaki H, Hattori A, and Kawashima S. Calcium-activated neutral protease inhibitor (E-64c) and reperfusion for experimental myocardial infarction. *Jpn.Heart J* 1989; 30: 375-386.

175. Toyo-oka T, Kamishiro T, Masaki M, Masaki T. Reduction of experimentally produced acute myocardial infarction size by a new synthetic inhibitor, NCO-700, against calcium-activated neutral protease. *Jpn.Heart J* 1982; 23: 829-834.

176. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circ.Res.* 1987; 60: 478-486.

177. Iizuka K, Kawaguchi H, Kitabatake A. Effects of thiol protease inhibitors on fodrin degradation during hypoxia in cultured myocytes. *J Mol.Cell Cardiol.* 1993; 25: 1101-1109.

7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Freerk Prenzel

8. Lebenslauf

Zur Person

Name	Freerk Prenzel
Adresse	Franz-Mehring-Str.55, 17489 Greifswald
Geburtstag und -ort	26. Dezember 1975 in Kiel
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. Klaus-D. Prenzel und Beate Prenzel, geb. Schütze

Schulbildung

1982 – 1986	Gauß-Grundschule Bremerhaven
1986 – 1987	Orientierungsstufe der Gaußschule Bremerhaven
1987 – 1992	Lessing – Gymnasium, Bremerhaven
1992 – 1995	Oberstufe Schulzentrum Geschw. Scholl Bremerhaven
1995	Abitur

Zivildienst

1995 – 1996	Ergotherapie und Pflege im Altenpflegeheim Henri-Dunant, DRK Kiel

Berufsausbildung

1996 – 1998	Vorklinisches Studium / Christian-Albrechts-Universität Kiel
1998 – 2002	Klinisches Studium / Christian-Albrechts-Universität Kiel

Ärztliche Prüfungen

19. 8. 1998	Ärztliche Vorprüfung
31. 8. 1999	1. Abschnitt
19. 3. 2002	2. Abschnitt
13. 5. 2003	3. Abschnitt

Famulaturen

2/1999 – 3/1999	Innere Medizin / Städtisches Krankenhaus Kiel
9/1999 – 10/1999	Institut für Pharmakologie / Universität Kiel
8/2000 – 10/2000	Pädiatrie / Rainbows Kinderkrankenhaus, Case Western Reserve University Cleveland, Ohio, USA
2/2001 – 3/2001	Allgemeinmedizin / Free Clinic of Greater Cleveland, Ohio, USA
8/ 2001	Gynäkologie, Infektiologie / District Hospital Lushoto, Tansania

4/2002 – 3/2003	*Praktisches Jahr* Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
1.Tertial	Chirurgie / Uniklinikum Greifswald
2.Tertial	Innere Medizin / St.Anthony, University of Newfoundland, Kanada Innere Medizin/ Uniklinikum Greifswald
3.Tertial	Pädiatrie / Uniklinikum Greifswald

Beruf

seit 12/2004	Arzt im Praktikum, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Leipzig

Publikationen

April 2002	Sandmann, S., Prenzel, F., Shaw, L., Schauer, R., Unger,T.: *„Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium - influence of the calpain inhibitor CAL 9961.“* British Journal of Pharmacology
Oktober 2002	Sandmann, S., Spormann, J., Prenzel, F., Shaw, L., Unger, T.: *„Calcium channel blockade limits transcriptional, translational and functional up-regulation of the cardiac calpain system after myocardial infarction.“* European Journal of Pharmacology

Greifswald,

9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Felix, Direktor der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, für die uneigennützige Betreuung und großartige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Unger, ehemaliger Direktor des Instituts für Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, danke ich sehr für die Vergabe des interessanten Themas sowie für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten.

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bedanke ich mich sehr herzlich bei Dr. rer. nat. Steffen Sandmann, der jederzeit hilfsbereit war, immer als Ansprechpartner zur Verfügung stand und mich auch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus gefördert hat.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Privatdozent Dr. rer. nat. Lee Shaw und den anderen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel herzlich bedanken für die tatkräftige Hilfe und die über das fachliche hinaus gehenden Denkanstöße.

Ein herzlicher Dank gilt schließlich meinen Eltern für jede Art der Unterstützung und dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben.