

Vergleichende Untersuchungen über die Aktivierung von isoliertem Calpain und einer calciumabhängigen cytosolischen Protease in Linsenepithelzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vom Diplombiologen Heiner Sann geb. am 16.09.1959 in Erfurt

Gutachterin bzw. Gutachter:

- 1. PD Dr. Ingo Willhardt, Medizin. Fakultät, Inst.f.Physiol. Chemie, Halle
- 2. Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann, FB Biochemie/Biotechnologie, Inst.f.Biotechnologie, Halle
- 3. Prof. Dr. Peter Bohley, Physiologisch-Chemisches Institut, Tübingen

verteidigt in Halle (Saale) am 29. März 2000

Zusammenfassung

Ziel der Untersuchungen war es, die Wirkung der Proteinase Calpain (EC 3.4.22.17) in Zellen besser zu verstehen. Den medizinischen Hintergrund bilden dabei beschriebene Zellschädigungen bei vermuteten Disregulationen und speziell ein möglicher Zusammenhang von Calpain und Cataracten der Augenlinse (siehe S. 4).

Calpain (m-Calpain), Calpastatin und Proteasomen wurden dazu aus Rinderherz isoliert. Boc-Leu-Met-7-Amino-4-Methylcumarin (Boc-Leu-Met-AMC), ein geeignetes Peptidsubstrat, wurde synthetisiert und es wurden für die immuncytochemische Untersuchung monoklonale und polyklonale anti-m-Calpain-Antiseren gewonnen.

Das aus Rinderherz isolierte m-Calpain wurde charakterisiert. Es war ohne Calciumionen nicht aktiv und voll aktiv ab ca. 1mM Ca²⁺. Weiterhin benötigte es für die enzymatische Aktivität SH-Gruppen-reduzierendes Thiol (Mercaptoethanol). Mit Calpaininhibitoren wurde es inhibiert. In der SDS-Elektrophorese konnte m-Calpain in zwei Untereinheiten von ca. 30kD und 80kD getrennt werden und war im Zymogramm nach Ca²⁺-Zufuhr aktiv. Es wurde im Westernblot dargestellt.

Vergleichende Untersuchungen mit Proteasomen in vitro ergaben, daß diese Proteasen Boc-Leu-Met-AMC im Gegensatz zu m-Calpain zwischen 0mM und 5mM Ca^{2+} unabhängig von der Calciumkonzentration hydrolysierten. Dies war für die folgenden in vivo-Untersuchungen sehr wichtig, da in Linsenepithelzellen das Peptidsubstrat sehr wohl calciumabhängig hydrolysiert wurde und somit der Einfluß von Proteasomen vernachlässigt werden konnte.

Die ultramikroskopische Darstellung von m-Calpain im Rasterkraftmikroskop brachte eine Übereinstimmung mit einem Molekülmodell von MURACHI (26). Es waren deutlich Abschnitte oder Domänen zu erkennen. Unter geeigneten Bedingungen organisierte sich m-Calpain auf der Oberfläche der Siliciumobjektträger zu fädigen Strukturen.

In Augenlinsen finden Yoshida et al. m-Calpain (180). Somit ist es uns möglich, Befunde aus unseren Versuchen mit m-Calpain aus Herzhomogenat mit denen von Linsenepithelzellen zu vergleichen.

Das Calpain-Antigen aus homogenisierten und fraktionierten Linsenepithelzellen hatte im Westernblot ein vergleichbar niedriges Molekulargewicht von weniger als 70kD. Ein ähnlich leichtes Molekül wurde auch im Westernblot von Herzhomogenat neben der 80K- und 30K-Untereinheit des Calpain nachgewiesen.

In Linsenepithelzellen wurden die eingesetzten Peptidsubstrate unterschiedlich hydrolysiert: Boc-geschützte Peptide wurden spontan und hinreichend für den quantitativen Nachweis mit Hilfe der HPLC hydrolysiert. Succinylierte Derivate wurden dagegen nicht nachweisbar umgesetzt, sie sind offensichtlich nicht membranpermeabel. Daraus konnte das Fehlen einer Ektoproteasewirkung durch Calpain geschlußfolgert werden.

Calpain-Inhibitoren hemmten vergleichbar zu in vitro-Versuchen, mit der Ausnahme von E-64, welches offensichtlich nicht membranpermeabel ist. Damit ergab sich ein weiterer Hinweis auf das Fehlen einer Ektoprotease mit Calpainwirkung.

Eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchungen mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen in Linsenepithelzellen war der Nachweis, daß deren Calciumhaushalt gezielt mit dem Ionophor Ionomycin beeinflußt werden konnte. Es wurde gezeigt, daß der Umsatz von Boc-Leu-Met-AMC calciumabhängig war. Allerdings war er bei niedrigen Calciumkonzentrationen im Cytosol hoch und wurde bei 2mM Ca²⁺ inhibiert !

Diese Tatsache führte zu dem Schluß, das wir es hier auch mit einer noch nicht beschriebenen, durch Ca²⁺ hemmbaren Protease zu tun haben könnten. Alle folgenden Versuche orientierten aber weiter auf Calpain.

Der immuncytochemische Nachweis erbrachte keine diffuse Verteilung von Calpain. Es wurden fädige Strukturen gefunden, die beim Vergleich mit dem Cytoskelett Übereinstimmungen brachten. Auch immunologisch wurde nachgewiesen, daß kein Calpain auf der Oberfläche von Linsenepithelzellen existierte.

Nach dem Versuch, Calpain aus Linsenepithelzellen mit Triton-X-100 in Hepes-Puffer zu extrahieren, war keine Veränderung der Antigenität gegen Calpain festzustellen. Dies deutete auf eine Verankerung des Enzyms in der Zelle bzw. auf die Unfähigkeit des Detergenz, es zu lösen hin.

Linsenepithelzellen wurden bei hoher mikroskopischer Auflösung mit den Peptidsubstraten Boc-Leu-Met-AMC oder Boc-Leu-Met-CAMC inkubiert. Dabei wurde keine diffuse, sondern eine strukturierte Fluoreszenz gefunden. Kerne erschienen dunkel, wurden von einem sehr hellen Saum umgeben. Die Fluoreszenz wurde als Reihen von Punkten und unterbrochenen Linien sichtbar. Das Ergebnis war vergleichbar mit denen von immuncytochemischen Untersuchungen, wo ebenfalls eine diffuse Fluoreszenz erwartet und Filamentgebilde gefunden wurden. Es ergaben sich Ähnlichkeiten der Bilder, jedoch keine Identität zwischen der Darstellung des Calpain-Antigens und den Orten proteolytischer Aktivität. Sofern diese Aktivität von Calpain ausgeht, kann man annehmen, daß die Gesamtkonzentration des Enzymproteins von der Konzentration an aktivem Enzym abweicht.

Es wurde gezeigt, daß derzeitige Vorstellungen über Lokalisation und Aktivierung von Calpain möglicherweise überprüft werden müssen. Dabei ist die Tatsache einer Hemmung der Proteolyse bei hoher Calciumionenkonzentration in der Zelle besonders interessant. Bisher wurde von einer Aktivierung des Calpain bei einer Erhöhung der cytosolischen Calciumionenkonzentration ausgegangen. Übereinstimmungen der immuncytochemischen Darstellung von Calpain mit dem Cytoskelett legen nahe, daß Calpain einen Haftmechanismus besitzen muß, der es dem Enzym gestattet, sich am Cytoskelett zu verankern. Auf der einen Seite werden in neueren Arbeiten Cytoskelettelemente als Calciumstores beschrieben, was gleichbedeutend mit einer inhomogenen Verteilung von Calcium im Cytosol ist, und auf der anderen Seite sind vermutlich die im Molekül vorhandenen EF-hand-Strukturen als Anker anzusehen. Sie verfügen über eine hohe Bindungsaffinität zu Ca^{2+} und sind in einer Vielzahl untersuchter calciumbindender Proteine enthalten. Die dominierende negative Ladung der EF-hands in beiden Calpainuntereinheiten CL und CS dokumentiert sich auch in den Bindungseigenschaften und im Elutionsverhalten an DEAE-Ionenaustauscher. Es ist ein Hinweis auf vergleichbare isoelektrische Eigenschaften.

Methodisch gestattet uns die Verwendung von diffusiblen fluorogenen Peptidsubstraten mit gleichfalls diffusiblem Fluorophor sehr einfach, den hydrolytischen Umsatz der Zellen mit Hilfe einer HPLC reproduzierbar zu quantifizieren. Weiterhin wurden erfolgreich bei hoher lichtmikroskopischer Auflösung in lebenden Zellen Orte proteolytischer Aktivität nachgewiesen. Hier ergeben sich Möglichkeiten, weitere Untersuchungen anzuschließen, welche die Inhibition der Proteolyse bei hoher Ca²⁺-Konzentration und entgegengesetzt eine mögliche Aktivierung von Calpain betreffen, und die einen Einfluß der Protease auf das Cytoskelett beinhalten.

Besonders interessant sind meiner Meinung nach Fragestellungen, die sich auf den Zusammenhang von Calpainaktivität und cytosolisch niedriger Ca²⁺-Konzentration beziehen. Außerdem ist sehr interessant, warum ein offensichtlich aktives Calpain, welches spontan Peptidsubstrate hydrolysiert, nicht konsequent seine endogenen Substrate, z.B. Teile des Cytoskelettes minimiert. Weiterhin gestaltet sich die Differenzierung zwischen Calpain und Aktivitäten anderer Proteasen im Cytosol recht schwierig, wie unsere Ihibitionsversuche (Calpain und Proteasomen) gezeigt haben. Zahlreiche in der Literatur beschriebene Wirkungen des Calpain sind wahrscheinlich nicht ausschließlich auf diese Protease zurückzuführen.

Einfü	ihrung	Seite
1. 2. 3.	Calpain, historischer Abriß Calpain - Molekülaufbau und aktuelle Ansichten zur Aktivität Ziel der Arbeit	1 5 7
Kapi	tel 1: Untersuchungsmaterial – Herstellung, Bozugsguollon	0
	Bezugsqueilen	8
1.1	Untersuchungsobjekte	8
1.1.1	Gewinnung von Proteasomen	0 11
1.1.3	Linsenepithelzellen	13
1.2	Proteasesubstrate	14
1.2.1	Proteine	14
1.2.2	Peptide	14
1.3	Inhibitoren	18
1.3.1	Proteininhibitor (Calpastatin)	18
1.3.2	Peptide- und andere Inhibitoren	20
1.4	Anti-Calpain-Antiseren	21
1.4.1	Polyklonal, Kaninchen-anti-m-Calpain-Antiserum	21
1.4.2		21
1.5 1 5 1	Fluoreszenzfarbstoffe zur Untersuchung des Calciumgehaltes in	23
1.5.1	Zellen	23
1.5.2	Fluoreszenzfarbstoffe zur Untersuchung der Proteaseaktivität	24
1.5.3	Untersuchung zur Quantifizierung durch Fluoreszenzmessung von	
	AMC	24
1.6	lonophoren	26
Kapi	tel 2: Untersuchungsmethoden und Ergebnisse	27
2.1 E	nzymaktivitätsuntersuchungen	27
2.1.1	Untersuchungen mit isoliertem m-Calpain	27
2.1.1.	1 Nachweis einer Ca ²⁺⁻ abhängigen cytosolischen Thiolprotease in	
911	vitro – Calpain 2. Kinatigaha Untarguahungan dag Substrat Umgatzag yan Calpain	27
2.1.1.	3 Hemmung von Calpain mit synthetischen Proteaseinhibitoren	29
~	und endogenem Proteininhibitor Calpastatin	30
2.1.1.	4 Elektrophoretischer Nachweis von m-Calpain	33
2.1.1.	5 Nachweis der Aktivität einer Calcium-abhängigen cytosolischen	0.4
911	Thiolprotease in der Nativelektrophorese – Zymogramm 6. Immunologischer Nachweis von m Calpain im Westernblet	34
2.1.1.	7 Vergleichende Untersuchungen zwischen m-Calpain und	33
	Proteasomen	36
2.1.2	Untersuchungen an Rinder-Linsenepithelzellen	39
2.1.2.	1 Immunologischer Nachweis von Calpain aus Linsenepithelzellen	-
010	im Westernblot 2. Detaktion, protocketischer Aldigität im Linger uithele ling	39
2.1.2.	Z Detektion proteolytischer Aktivität in Linsenepithelzellen vom Rind mit Hilfe fluorogener Peptidsubstrate	40

2.1.2.3	Nachweis des Umsatzes von Boc-Leu-Met-AMC und Boc-Leu- Met-CAMC bei hoher mikroskopischer Auflösung in	
	Linsenepithelzellen	42
2.1.2.4	Einfluß von Inhibitoren auf die Hydrolyse von Peptidsubstraten in Linsenepithelzellen	44
2.1.2.5	Beeinflussung der Konzentration frei verfügbarer Calciumionen in Linsenepithelzellen	47
2.1.2.6	Calciumabhängigkeit der Hydrolyse von Peptidsubstraten in Linsenepithelzellen	49
2.1.2.7	Kombination von Zeitabhängigkeit und Calciumabhängigkeit der Hydrolyse von Peptidsubstraten in Linsenepithelzellen	54
2.2 Unt	tersuchungen zur Struktur von Calpain	59
2.2.1 Ho	ochauflösende Darstellung von Calpain mit Hilfe der	
Ra	asterkraftmikroskopie (Atomic force microscopy)	59
2.2.1.1	Kurze Einführung	59
2.2.1.2	Dimensionen eines Einzelmoleküls	60
2.2.1.3	Selbstorganisation des Calpain	62
222 lm		64
2.2.2 III	Immuncytochemiaahan Nachusia yan m Calnain in Zallan	04
2.2.2.1	Machweis den Sperifität des manaklanalen Anti m Calpain	04
2.2.2.2	Antiserums 1E8	66
2.2.2.3	immuncytochemische Darstellung von Calpain nach Inkubation mit Detergenz	70
2.2.2.4	Immuncytochemischer Ausschluß von m-Calpain auf der Zelloberfläche	71
2.2.2.5	Vergleich von Bestandteilen des Cytoskelettes und Calpain nach	
	immuncytochemischer Färbung in Linsenepithelzellen	72
2.2.2.6	Vergleich von Bestandteilen des Cytoskelettes mit Calpain nach immuncytochemischer Doppelmarkierung in Linsenepithelzellen	75
Kapitel	3: Einordnung der Ergebnisse – Diskussion	79
3.1 W	/ie sicher ist der Calpain-Nachweis?	79
311	m-Calnain isoliert aus Herzmuskelhomogenat vom Rind mittels	
0.1.1	Säulanchromatographia	79
312	Calpain-Enzymaktivität in vitro	70
3.1.2	Calpain in der Flektronhorese und im Westernhlet	70
2.1.J	Calpain in Linsononitholzellon	79 QA
215	Calpain in Ensenepimeizenen	80 85
3.1.3	Calpani ini Kasterkrattinikroskop – utrastrukturene Darstenung	00
3.2 Bi	indung des Calpain	86
3.2.1	Bindung des Calpain an Silicium-Objektträger	86
3.2.2	Bindung von Calpain und Calpastatin an DEAE-Cellulose	87
3.2.3	Hinweise auf die Ablagerung von Ca ²⁺ und Phosphat im Cytoskelett	88

3.3	Intrazelluläre Calciumhomöostase und abgeleitete Schlußfolgerungen	89
3.4	Vergleich eigener Ergebnisse mit den Befunden von Suzuki und Sorimachi (40)	92
3.5	Aktivierungsschema von m-Calpain an Mikrofilamenten	96
	Literatur	97
Anha	ng	
	Abbildungsverzeichnis	
	Abkürzungen	

Chemikalien

Geräte und Verbrauchsmaterial

Erklärungen

Lebenslauf

Einführung

1. Calpain, historischer Abriß

1. Entdeckung:

Im Jahre 1964 wird von Guroff erstmals eine cytosolische, durch Calciumionen aktivierbare Protease beschrieben, die ihr Wirkoptimum bei neutralem pH-Wert besitzt. Sie hat einen essentiellen Bedarf an Calciumionen und SH-reduzierenden Agenzien, wie Mercaptoethanol. Die proteolytische Aktivität erscheint erst nach einem Chromatographie-Trennschritt an einer Ionenaustauschmatrix aus DEAE-Cellulose. Sie verschwindet schnell bei der Inkubation mit Ca²⁺ und wird durch die Anwesenheit von Substrat geschützt. Das Enzym wirkt autoproteolytisch. Es wird eine Substratspezifität für die Spaltstelle Tyr-Leu angegeben. Eine geringe Konzentration von EDTA (0,1 μ M) wirkt aktivierend auf die Protease bei gleichzeitiger optimaler Konzentration von Ca²⁺ (4).

Meyer et al. beschreiben im gleichen Jahr einen "phosphorylase b kinase activating factor Ca-dependent" (KAF), der von Huston und Krebs (1968) als Ca²⁺⁻ abhängige Protease erkannt wird (43,33,38).

Busch et al. identifizieren 1972 einen calciumaktivierbaren sarcoplasmatischen Faktor (CASF), der Z-Linien hydrolysiert (38), Inoue et al. 1977 einen Protein-Kinase Caktivierenden Faktor (44) und Ishiura et al. (1978) gelingt die chromatographische Reinigung von CANP (Calcium-aktivierte neutrale Protease) bis zur Homogenität (45).

2. Substrate

Als in vitro-Substrat für Calpain wird zuerst Casein beschrieben (4). Dieses Protein gilt auch heute noch als das Standard-Testsubstrat (33). Calpain spaltet bevorzugt Peptidsubstrate, wenn hydrophobe Aminosäurereste (Tyr, Met, Leu, Val) oder Arginyl-Reste in Position P2 vorhanden sind (1,33).

Guroff beschreibt 1964 einen erfolgreichen Hydrolyseversuch mit nativem Substrat, der oxidierten β -Kette von Insulin (4). Als Spaltstelle deutet er die Position zwischen den Aminosäureresten 16 und 17 (Tyr, Leu). Später werden eine Reihe (meist cytosolischer) Proteine als Calpainsubstrate angegeben:

Substrat	Quelle	Substrat	Quelle
Calponin	146,147	Keratin	145
Crystallin in Augenlinsen	126-130	Kernproteine	151
Cyclin D1	160	Myelin basic protein	124,125
Cytoskelettproteine	69,70	Neuropeptide	136
Troponin, Tropomyosin, C-Protein			
Dystrophin	155	$NF_{\kappa}B^{-1}$	156,157
Erythrozyten Ca ²⁺ -ATPase	142-144	p53 ²	158
Fibrinogen und Plättchenproteine	133,134,135	Proteinkinase	123
Fodrin	131,132	Proteinkinase C	137-140
Histon	141	Rhodopsin	150
iNOS ³	159	Tau	148,149
Intrazelluläre Domäne von NCAM ⁴	152,153	Transcriptionsfaktoren	154
und N-Cadherin		c-Jun und c-Fos	

Tabelle 1: native Proteine als Substrate von Calpain

 $^{^1}$ Nucleärer Faktor $_\kappa\!B$, bezeichnet nach einem Aktivator der Expression der $\kappa\!-\!$ Kette, einer Spezies der leichten Kette von Antikörpern

² Tumorsupressor-Protein

³ NO (Stickstoffmonoxid)-Sythase

⁴ Neutrales Cell-Adhäsions-Molekül, Rezeptormolekültyp der Zelloberfläche

Später werden auch synthetische Di-und Tripeptide als Substrate verwendet (40).

3. Erste medizinische Interpretationen über den Einfluß von Calpain

Nach Arbeiten über die Interaktion von Calpain mit Cytoskelett-und Muskelproteinen von Dayton et al. 1976 und Reddy et al. 1975 (69,70,73) folgen erste medizinisch relevante Interpretationen von Muskeldystrophie und Hypertrophie des Herzens im Zusammenhang mit Calpain durch Sims et al. 1976 und Kar et al. 1976 (72,71).

4. Endogener Inhibitor

Waxman et al. und Nishiura et al. entdecken 1978 unabhängig einen endogenen Inhibitor (10,74), ein Protein, welches die Protease bei Anwesenheit von Calciumionen in vitro hemmt.

5. Nomenklatur

1981 prägt Murachi die Begriffe "Calpain" für Calciumionen-abhängige, Papainähnliche Cysteinprotease und "Calpastatin" für dessen endogenes Inhibitorprotein (9).

6. Klonierung

Die erste molekularbiologische Arbeit erscheint 1984 von Ohno et al., in der die Klonierung der großen Untereinheit von Calpain (80K, CL⁵) aus Hühnchenskelettmuskel beschrieben wird. Dabei werden detaillierte Aussagen über den Molekülaufbau getroffen (siehe S.5-6).

7. Aktivierung

Zu diesem Zeitpunkt ist unklar, wie Calpain physiologisch überhaupt aktiv sein kann. Der Gegensatz des Bedarfs an freien Calciumionen in vitro (ca. 1mM) zu der cytosolischen Verfügbarkeit von weniger als 1μ M ist nicht zu erklären.

Erste Hinweise kommen von Mellgren 1980, der zwei unterschiedliche Calpaine aus Kaninchen-Herzmuskel isoliert: der Calciumbedarf für die halbmaximale Aktivität beträgt 400μM für m-Calpain⁶ und 40μM für μ-Calpain⁷ (7).

Mehr als 60 Årbeiten über die Aktivierung durch Herabsetzen des Calciumbedarfs bei μ - und m-Calpain folgen. Einige Beispiele dazu: 1981 beschreiben Suzuki et al. die Aktivierung durch Autolyse (80,81), DeMartino et al. finden 1982 einen aktivierenden Faktor (82), Kishimoto et al. beschreiben 1983 die erhöhte Proteolyse von PKC durch Calpain bei Anwesenheit von Phospholipiden (83), Pontremoli et al. sprechen 1984 von der Aktivierung von Proenzymen des Calpain (84) und Pontremoli et al. stellen 1987 Isovalerylcarnitin als Aktivator vor (85). Kuroda et al. beschreiben 1991 basische Proteine Histon H1 und Poly-L-Lysin als Aktivatoren für die limitierte Proteolyse von PKC durch Calpain (87) und 1996 veröffentlichen Arthur et al., daß alle untersuchten Phospholipide m-Calpain aktivieren (88).

Im Gegensatz dazu werden auch Arbeiten veröffentlicht, die der Aktivierung durch Autolyse zumindest bei μ -Calpain, dem Enzym mit geringem Calciumbedarf widersprechen (89,90).

In der 1998 erschienenen Übersichtsarbeit von Suzuki et al. bleibt die Frage nach der Aktivierung von m-Calpain bei cytosolischen Calciumkonzentrationen offen (40).

8. Vorkommen von Calpain in diversen Spezies

Ursprünglich findet Guroff eine calciumabhängige Protease in der Präparation des Überstandes aus Hirnhomogenat von Ratte, später auch bei Rind, Schwein,

⁵ 80K, CL: Synonyme für die große Untereinheit von Calpain, abgeleitet von MW 80kD und "Calpain large",

⁶ m-Calpain und Calpain II sind Synonyme

⁷ μ-Calpain und Calpain I sind Synonyme

Maus, Meerschwein und Kaninchen⁸. In Niere und Milz der Ratte detektiert er keine calciumabhängige Aktivität (4).

Heute ist akzeptiert, daß Calpaine in allen Mammalia und Avia vorkommen (33,38) Sogenannte Atypische Homologe des Calpain werden in Insekten, Nematoden, Pilzen und Hefe beschrieben (33,38,39). In Pflanzen und Procaryoten wurde die Protease nicht gefunden.

9. Vorkommen von Calpain in Organen von Säugern und Vögeln

Calpain ist ein Heterodimer und besteht aus einer kleinen Untereinheit mit MW 30kD (30K, CS⁹) und einer großen Untereinheit von MW 80kD (80K, CL). Sogenanntes ubiquitäres Calpain kommt im gesamten Organismus in isolierbaren Mengen vor. Organspezifische Calpaine wurden durch Aufklärung des Genoms entdeckt. Das Vorkommen von Calpain-Homologen ist Grundlage für eine systematische Einteilung (33,38,39):

Ubiqutär verbreitetes Calpain			Organsp	ezifisch	es Calpai	n	
m-Calpain	µ-Calpain	µ∕m- Calpain	nCL-1 p94	Lp82	nCL-2	nCL-2´	nCL-4
Mammalia Avia	Mammalia Avia	Avia	Muskel	Augenlinse	Magen	Magen	Vedauungs- gewebe

Tabelle 2: Einteilung der Calpain-Spezies

10. Intrazelluläre Lokalisation

Seit der Arbeit von Guroff (4) wird angenommen, daß Calpain im Cytosol frei beweglich ist.

Es gibt Befunde, die dieser Auffassung widersprechen: Nelson und Traub beschreiben 1981 die Assoziation einer Vimentin¹⁰-spezifischen Ca²⁺-abhängigen Protease mit der Triton-X-100-unlöslichen Zellfraktion (75). Eine solche Protease, assoziiert am Cytoskelett, beschreiben auch Ishizaka et al. 1985 (76). Lampi et al. finden 1992 Calpain im unlöslichen Pellet von Augenlinsen bei Ratten (77).

Nach Emori et al. ist Calpain in der frühen Phase der embryonalen Entwicklung bei Drosophila am Actin, einem Teil des Cytoskeletts gebunden (78).

11. Calpain und Signaltransduktion

Arbeiten über Substrate führen bald zu der Annahme, daß Calpain in Signalkaskaden involviert ist: Calpainproteolyse der Plasmamembran-Ca²⁺-Pumpe spaltet einen C-terminalen 14kD-Teil ab, der die Calmodulin-bindende Domäne einschließt. Es wird ein voll aktives 124kD Fragment erzeugt (161). PTH¹¹-induzierte

⁸ Die späteren Ergebnisse sind etwas unklar, da aus den Aufzeichnungen nicht hervorgeht, ob ein essentieller DEAE-Chromatographie-Trennschritt durchgeführt wurde. Ohne diesen kann die Casein-Proteolyseaktivität z.B. auch vom heute bekannten Proteasom stammen (5)

⁹ 30K, CS: Synonyme für die kleine Untereinheit des Calpainheterodimers, abgeleitet von MW 30kD und "Calpain Small"

¹⁰ Vimentin: (von lat.: vimentum = Flechtwerk), Filament-Protein (MG. 53000) des Cytoskeletts von Bindegewebszellen (z.B. Fibroblasten, Fettzellen), Blutgefäß-Epithelzellen, Leukocyten u. Zellen in Kulturen. Die aus V. durch spontane Zusammenlagerung gebildeten Fasern gehören zu den intermediären Filamenten des Typs II (13)

¹¹ PTH: Parathormon

Osteoblastenkontraktion wird vermittelt durch Cysteinproteasen (36). Calpain hat Anteil an der ATP-Ausschüttung von Thrombozyten nach Thrombinstimulation (162). Wasserstoffperoxid induziert Cataract der Augenlinse bei gleichzeitiger Aktivierung von Calpain (163). Calpain ist einbezogen in Fibronectin-induzierte Chemotaxis von NIH-L13 Fibroblasten (164). Calpain ist eine Matrixprotease im Knochen-Kallus nach Fraktur (122). Calpain spielt eine Rolle bei der Apoptose ("induction"- und "release"-Modell) (165). Verabreichen eines Calpaininhibitors (AK275) schützt vor Hirnschädigung nach Ischämie (166). Der Calpain-abhängige PCD-Signalweg¹² unterstützt die HIV-Immunschwäche und fordert die Anwendung von Calpaininhibitoren (167). Ein Antisense-Oligodesoxeribonucleotid gegen die mRNA von m-Calpain verhindert die Myoblastenfusion (168). Aurintricarbonsäure (ATA) verhindert die Apoptose und ist ein Calpain-Inhibitor (169). Calpaininduzieren Apoptose in Prostata-Adenokarzinomzellen Inhibitoren (170).Leberzellkarzinom-Zellen sind resistent gegen Anoxie durch Verhindern einer Phospholipase-gesteuerten Calpainaktivierung (171). Die m-Calpain-Expression ist erhöht bei Veränderung der mechanischen Spannung von Muskeln in vivo (172). Calpain trägt zum Silicium-induzierten Abbau von $I_{\kappa}B\alpha^{13}$ und zur Aktivierung von NF_xB¹⁴ bei (68). Calpain hat Anteil an Progression des Zellzyklus in der späten G1-Phase (173).

12. Krankheitsbilder

1976 werden von Sims et al. und Kar et al. erste Beschreibungen zu Muskeldystrophie und Hypertrophie veröffentlicht (s.o.). Es folgen weitere Arbeiten unterschiedlicher Autoren über den Zusammenhang von Calpain mit:

Krankheitsbild	Quelle	Krankheitsbild	Quelle
acute quadriplegic myopathy	95	Knochenheilung nach	122
	111		00.00
Altersveranderungen in	111	limp girdle	92,93
Augenlinsen		Muskeldystrophie Typ 2A	
Alzheimer Pathogenese	102,103,104	long term potentiation	100,101
C C		(Neuropathologie)	
atypische Nemaline Myopathie	95	Montreal Plättchen-	110
		Syndrom	
Calpaineinfluß bei Arthritis	117,118,119	Multiple Sklerose	105,106
Calpaineinfluß bei diversen	112,113,114	Myelinabbau durch	107
Catarakten		freigesetztes Calpain	
Duchenne Muskeldystrophie	91	Myocard Infarkt	96,97
genetisch determinierte	98,99	Risikofaktor bei	115,116
Hypertension		Lebertransplantaten	
Ischämie	108,109	systemische Rheumatische	120,121
		Erkrankung	

Tabelle 3: Krankheitsbilder, die mit Calpain in Zusammenhang gebracht werden

¹² PCD: Abkürzung und Synonym für Programmierter Zelltod, programmed cell death, Apoptose

¹³ I_{κ}B α : Inhibitorprotein von NF_{κ}B

¹⁴ NF_{κ}B: Transscriptionsfaktor, beteiligt an der Expression von Genen der κ -Ketten, einem Typ der leichten Kette von Immunglobulinen

2. Calpain - Molekülaufbau und aktuelle Ansichten zur Aktivität

Die Beschreibung von Calpain erfolgt nach Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe K. Suzuki (27,33,38,39,40)

Calpain ist die Kurzbezeichnung für calciumabhängige Papain-ähnliche cytosolische Protease.

Bei Säugetieren sind zwei Calpainspezies beschrieben, die ubiquitär vorkommen und die sich in ihrem Calciumionenbedarf unterscheiden. Der Ca²⁺-Bedarf von m-Calpain für die halbmaximale Aktivität wurde bei der erstmaligen Beschreibung mit ca. 0,4mM und von μ -Calpain ca. 40 μ M benannt (7). Suzuki gibt 1998 für die halbmaximale Aktivierung 5-50 μ M für μ -Calpain und 200-1000 μ M für m-Calpain an. Frei verfügbare Calciumionen in der Zelle liegen in Konzentrationen kleiner als 1 μ M vor.

Calpain ist ein Heterodimer. Es hat ein MW von 110kD. Die kleine Untereinheit (30K, CS) hat ein MW von 30kD, die große Untereinheit (80K, CL) ein MW von 80kD. In der SDS-Elektrophorese bilden beide Untereinheiten ein charakteristisches Bandenmuster.

Am besten beschrieben ist Calpain aus Säugetieren. Nach molekularbiologischen Untersuchungen sind die 80K-Untereinheit von μ -Calpain (μ -80K, μ -CL) und m-Calpain (m-80K, m-CL) vergleichbar, aber nicht identisch. Die kleine Untereinheit 30K (CS) wird als identisch angesehen. Unterschiede in der Calciumabhängigkeit sind demnach in den Unterschieden der großen Untereinheiten zu finden.

Die großen Untereinheiten 80K bestehen aus vier Domänen, I, II, III und IV, während die kleine Untereinheit 30K aus zwei Domänen IV´ und V besteht. Von den Genen IV und IV´ ist bekannt, daß sie den gleichen Ursprung besitzen. Der N-terminalen Domäne I und der Domäne III von 80K konnten noch keine Funktionen zugeordnet werden.

80K kann bei der Aktivierung in vitro autolysiert werden. Nach Guroff (4) und auch aus eigenen Versuchen ist ersichtlich, daß Calpain der Autoproteolyse unterliegt. Diese führt in vitro nach kurzer Zeit bei Raumtemperatur und genügend Ca²⁺ zum irreversiblen Verlust von Enzymaktivität. Es gibt Hinweise, daß nach Autolyse von m- und μ -80K geringere Ca²⁺-Konzentrationen für die Aktivierung erforderlich sind. Die Autolyse soll in einen Aktivierungsmechanismus involviert sein.

Neuere Untersuchungen lassen vermuten, daß Veränderung des Calciumbedarfs auf die Dissoziation der Untereinheiten zurückzuführen sind. Danach wäre die Autolyse ein Ergebnis der Aktivierung.

Die Domäne II ist eine Cystein-Protease. Sie ist vergleichbar mit Papain. Die Aminosäurereste Cys, His, Asn der Active-site sind identisch zu Papain, was durch zielgerichtete Mutagenese bestätigt wurde. Es ist die am stärksten konservierte Domäne in der Calpainfamilie. Dies weist auf unentbehrliche Funktionen hin.

In der Domäne IV von 80K wurden ursprünglich vier EF-hand¹⁵ (EF2-EF5) gefunden.

¹⁵ EF-hand: "(Calmodulin-Faltung). Strukturmotiv der Calmodulin-Familie Calcium-bindender Proteine, bestehend aus einer Helix (E), einer verbindenden Polypeptid-Schleife (engl.: loop), die das gebundene Calcium-Ion umgibt u. einer weiteren Helix (F), die etwa wie der ausgestreckte Zeigefinger, der gebeugte Mittelfinger u. der abgespreizte Daumen einer rechten Hand angeordnet sind." D.h. die beiden Helices sind senkrecht zueinander angeordnet.(41) "Das Motiv ist vierfach in Calmodulin enthalten."(13)

EF-hand-Strukturen sind bei modulierenden Proteinen (Calmodulin, Troponin C, Calcineurin B, Myosin light chains, Recoverin, S-modulin, Visinin, VILIP, Neurocalcin, Hippocalcin, Frequenin, Caltractin, Calpain, S100 proteins) und Calcium-Transportern (Parvalbumin, Calbindin D_{9K} , Calbindin D_{28K} , Calretinin) beschrieben.(41)

Diese Strukturen sind von Calmodulin bekannt und können potentiell je ein Ca^{2+} binden. Es sind noch zwei weitere EF-hand beschrieben, davon liegt EF6 zwischen den Domänen II und III und EF1 N-terminal von EF2.

Die kleine Untereinheit 30K besteht aus zwei Domänen, IV' und V. Domäne IV' ist homolog zu IV von 80K.

Domäne V ist ein hydrophober Abschnitt, reich an Glycin-Resten. Diese Domäne soll mit Membranen und/oder Membran-verankerten Proteinen hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Teile der Domäne können bei der Aktivierung durch Ca^{2+} abgetrennt werden. Wahrscheinlich ist die Region nicht in die proteolytische Aktivität einbezogen.

Molekularbiologische Untersuchungen haben ergeben, daß es weitere von μ - und m-Calpain unterscheidbare großen Calpainuntereinheiten gibt. Sie werden in der Calpainsystematik als nicht ubiquitär vorkommend, sondern als organspezifisch angesehen. Dazu gehören: im Skelettmuskel nCL-1 (p94)¹⁶, welches 2 zwischengeschaltete Domänen IS1 und IS2 beinhaltet und im Magen und glatter Muskulatur nCL-2. Es wurden noch weitere Clone beschrieben.



Abbildung 1: Struktur der Calpainuntereinheiten nach Sorimachi et al. (38)

oben:große Untereinheit 80K, CL von m-, μ- und μ/m-Calpainunter:kleine Untereinheit 30K, CS

¹⁶ nCL: novel Calpain Large subunit

3. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist in ein Projekt eingebunden, in welchem pathophysiologische Aspekte und Zellschädigungen unter Beteiligung von Calpain untersucht werden. Ein Teil der Forschungsrichtung orientiert sich an der Aufklärung von Ursachen der Kataraktogenese der Augenlinse. So ist es nicht erstaunlich, daß Calcium, ein möglicher Faktor für die Kataraktbildung, die Frage nach dem Einfluß einer calciumabhängigen intrazellulären Protease (Calpain) aufwirft (56,121,31).

Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, daß zuerst einmal grundlegende und praktische Fragen zum Calpain zu klären waren:

- 1. Wie und wo findet man Calpain und sind eine calciumabhängigen Proteolyse und Calpain identisch?
- 2. Wie können wir die Calpain-Wirkung in vitro und vor allem in vivo von der anderer cytosolischer Proteasen trennen?
- 3. Ist Calpain in vivo aktiv?
- 4. Wird Calpain in vivo aktiviert oder inhibiert, wenn ja, wie?

Bereits in den Fragen 1. und 2. wird ein grundsätzliches Problem angedeutet: Im Cytosol existiert eine weitere gut charakterisierte Protease, das Proteasom. Dieser multikatalytische Enzymkomplex kann mehr als *10 verschiedene* katalytische Zentren gleichzeitig beinhalten (5,61-67). In Arbeiten über Calpain (und gleiches gilt auch für Proteasomen) wurde bis vor wenigen Jahren kaum etwas über die andere Protease erwähnt. Erst in jüngerer Zeit werden vergleichende Arbeiten bekannt mit dem Ziel, die Aktivitäten zu unterscheiden (55-60).

Zur Frage 3. und 4. gibt es bis heute nur modellhafte Vorstellungen (11,25,26,27,31,34). Die wichtigste ungeklärte Frage ist noch immer: Bekannte Formen von Calpain benötigen in vitro mikromolare (μ -Calpain) oder millimolare (m-Calpain) Konzentrationen an Calciumionen für die Aktivität. Bestimmbare Konzentrationen freier Calciumionen in Zellen liegen aber im Bereich kleiner 1 μ M (38).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin:

- 1. zu zeigen, daß Calpain mit den gleichen oder vergleichbaren Methoden in vitro und in vivo nachgewiesen werden kann.
- 2. ein Versuchsschema zu entwickeln, welches es in vivo gestattet, die Wirkung von Calpain von der anderer Proteasen, speziell von Proteasomen zu unterscheiden.
- 3. den Nachweis anzutreten, daß der Calciumgehalt -in vitro das entscheidende Kriterium für die Calpainaktivität- in Linsenepithelzellen gezielt beeinflußt werden kann.
- 4. die Calciumabhängigkeit der Calpainaktivität in Linsenepithelzellen zu untersuchen.
- 5. Ein Modell zu entwickeln, in welchem der Widerspruch zwischen niedriger cytosolischer Calciumkonzentration und einem aktiven Calpain gelöst wird.

Kapitel 1: Untersuchungsmaterial - Herstellung, Bezugsquellen

Im Vorfeld der Untersuchungen zu Calpain sind ein Teil der verwendeten Enzyme und Substanzen selbst isoliert oder hergestellt worden. Dazu zählen m-Calpain, Calpastatin, Proteasomen, einige Peptidsubstrate sowie polyklonale und monoklonale Antiseren gegen m-Calpain. Die Methoden werden in diesem Kapitel beschrieben. Weiterhin werden die Bezugsquellen der übrigen Materialien angegeben.

1.1 Untersuchungsobjekte

1.1.1 Gewinnung von m-Calpain

Modifiziert nach Croall et al. (174)

Es wird von der Arbeitsgruppe Willhardt ein erarbeitetes effektives Isolierungsverfahren, modifiziert nach (174) verwendet. 450g Rinderherz (frisch oder tiefgekühlt) werden mit Trispuffer (0,05M Tris HCl, pH 7,4, 0,05M NaCl, 0,0025M EGTA, 0,0025M EDTA, 0,005M Mercaptoethanol, Spatelspitze PMSF) im Eisbad homogenisiert. Nach 1 Stunde Zentrifugieren bei 20000g filtriert man den Überstand über DEAE-Sephacel Ionenaustauscher und eluiert mit einem Kochsalzgradienten 0,05M-0,4M. Nach diesem Schritt ist die calciumabhängige Proteolyse in den Fraktionen durch hydrolytische Spaltung von Azocasein in Gegenwart von 5mM Calcium detektierbar (2).



Diagramm 1: Calpain-Isolation aus Rinderherz-Homogenat über DEAE-Sephacel, Proteinnachweis (280nm) und Enzymaktivitätsnachweis (336nm, Azocaseinhydrolyse) in den Fraktionen

Fraktionen mit Calpainaktivität werden vereinigt, konzentriert und gegen 0,05M HEPES-Puffer pH 7,4 (mit 0,5M NaCl, 0,005M EGTA, 0,005M Mercaptoethanol) dialysiert. Anschließend wird über eine Säule mit Red Sepharose filtriert. Die Hauptmenge inaktiven Proteins eluiert man mit dem Dialysepuffer. Nach Wechsel zu Puffer ohne NaCl erscheint m-Calpain als scharfer Peak.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mit Azocasein (siehe Diagramm 2), die Reinheit wird durch SDS-Elektrophorese (siehe Abbildung 2) getestet und der Proteingehalt nach Lowry bestimmt (3).



Diagramm 2: Calpain-Isolation aus Rinderherz-Homogenat über Red-Sepharose, Proteinnachweis (280nm) und Enzymaktivitätsnachweis (336nm, Azocaseinhydrolyse) in den Fraktionen



Reinigung von Calpain mit Hilfe der HPLC

Vorbereitung für die Rasterkraftmikroskopie

m-Calpain, extrahiert über DEAE-Sephacel und Red Sepharose, wird einer weiteren Reinigung über Resource Q (6ml Säulenvolumen) an der HPLC unterzogen (1,8ml/min, 0,02M Tris-HCl pH 7,4, 0,002M EDTA/EGTA, NaCl-Gradient 0,04-0,4M). Danach wird die Fraktion zweimal entsalzt (Centrisart SM 13239, 10kD-Ausschluß) und evtl. eingeengt.



Diagramm 3: HPLC-Reinigung von m-Calpain-haltigen Fraktionen nach der Säulenchromatographie, Detektion von Protein durch Absorption bei λ =280nm

Gipfel 1 - Enzymaktivität von m-Calpain

Abbildung 3: SDS-Gelelektrophorese von m-Calpain vor und nach Reinigung durch die HPLC

- 1 vor der HPLC-Reinigung
- 2 nach HPLC-Reinigung und Entsalzung



1.1.2 Gewinnung von Proteasomen

Die Präparation von Proteasomen (multikatalytische Protease) als weitere intrazelluläre proteolytische Aktivität, erfolgt aus dem gleichen Organ, dem Rinderherzmuskel. Sie ist ähnlich der Calpain-Gewinnung: Rinderherz (frisch oder tiefgekühlt) wird mit Trispuffer-A (0,02M Tris HCl, pH 7,4, 0,1M NaCl, 0,002M EDTA, 0,005M Mercaptoethanol) im Eisbad homogenisiert. Nach einstündiger Zentrifugation erfolgt eine Ammoniumsulfatfraktionierung des Überstandes. Die Ausfällung im Bereich von 35-65% wird abzentrifugiert, gelöst und gegen 0,05M Trispuffer dialysiert. Man filtriert den Überstand über DEAE-Toyoperl Ionenaustauscher und eluiert mit einem Kochsalzgradienten 0,1M-0,4M. Zur Detektion der Proteasomen-Aktivität wird der Umsatz des fluorogenen Substrates Bz-Val-Gly-Arg-AMC nach Dahlmann et al. genutzt (siehe Diagramm 4) (5).

Die in Trispuffer (0,5M NaCl, 0,05M Tris HCl, pH 7,4, 0,005M EGTA, 0,005M Mercaptoethanol) äquilibrierten Proteasomenfraktionen werden über Red Sepharose mit gleichem Puffer eluiert. Der Aktivitätsgipfel und die Proteinbanden werden detektiert (siehe Diagramm 5, 6 und SDS-Elektrophorese Abbildung 4).

Es wird schließlich eine Trennung über Sephacryl S-200 mit Trispuffer (0,05M Tris HCl, pH 7,4, 0,0025M EGTA, 0,0025M EDTA, 0,005M Mercaptoethanol) durchgeführt, die neben der Proteintrennung auch eine Abtrennung des NaCl der vorhergehenden Trennstufe bewirkt.





Diagramm 6: Detektion von Protein und Aktivität während des 3. Separationsschrittes von Proteasomen an Sephacryl S-200



1.1.3 Linsenepithelzellen

Angaben A. Thate

Rinderlinsenepithelzellen stammen aus der hauseigenen Kultivierung. Sie erfolgt steril bei 37°C in geschlossenen Kulturflaschen und MEM (Minimum Essential Medium Eagle + 10% Fötales Kälberserum + Glutamin + Streptomycin+ Penicillin). Für Untersuchungen werden die Zellen mit Trypsin (Trypsin/ EDTA-Lösung 0,2%) von der Unterlage gelöst, auf Objektträger in Petrischalen eingesät und weiterkultiviert (37°C, 1% CO₂). Zu Vergleichszwecken (Substratumsatz-Analysen) wird die Zellzahl eingestellt.

Allgemeine Charakteristika der Linsenepithelzellen vom Rind

Mit den Zellen des Augenlinsenepithels vom Rind steht ein Modell zur Verfügung mit vorteilhaften Eigenschaften: die Zellen sind keine Zellinie und wachsen über viele Passagen konstant, sie haften auf Glasunterlagen, sie wachsen bis zur Konfluenz (lückenloses Aneinanderwachsen) scheinbar einlagig. Zur Ablösung von der Unterlage wird eine Trypsinlösung benutzt, d.h. die Anhaftung der Zellen geschieht über Proteinanker. Ca²⁺-Entzug (bzw. Ca²⁺-und/oder Mg²⁺-Entzug) führt zur Verminderung der Unterlagenhaftung (eigene Beobachtungen beim Einsatz von EDTA oder EGTA).

1.2. Proteasesubstrate

1.2.1 Proteine

Für den Aktivitätsnachweis der Proteasen werden als 0,2%iger Zusatz im Zymogramm Casein (6) und als eigenständiger Test für Proteolyse Azocasein (2) genutzt.

1.2.2 Peptide

Eine Alternative zu Proteinen als Substrate für Calpain stellen kurzkettige, z.B. N-geschützte Di- und Tri-Peptide dar, die C-terminal mit einem Fluorogen wie AMC¹⁷ als Label amidartig verknüpft sind (siehe S. 24) (1). Diese sind z.T. membranpermeabel und können in vitro wie auch in vivo eingesetzt werden. Die Synthese von Boc-Leu-Met-AMC wird hier als repräsentatives Beispiel beschrieben.

Synthese von Peptidyl-Aminomethylcumarin (Boc-Leu-Met-AMC)

Modifiziert nach Sasaki (1)

13. Synthese von Boc-Leu-Met-AMC

Eine Reihe der verwendeten z.T. Zellmembran-permeablen Substrate sind selbst synthetisiert worden. Die Synthesen sind in Arbeiten von Sasaki et al.(1) und bei Rosser et al.(12) beschrieben und werden im allgemeinen gemäß Formelschema (s.u.) durchgeführt. Die Knüpfung der Peptidbindung erfolgt über N-Hydroxysuccinimidester; die Ankopplung des 7-Amino-4-Methylcumarin-Restes (AMC) an die C-terminale Aminosäure wird über ein gemischtes Anhydrid erreicht (siehe Schema 1, 2 S.16f.).

Dem gemischten Anhydrid4, gebildet aus Boc-Met-OH1 (3,01 mmol) unter Zusatz von N-Ethylmorpholin2 (3,2 mmol) und Butylchloroformat3 (3,2 mmol) in THF (15 ml) wird bei -20° C AMC5 (560,6 mg) in DMF (5 ml) zugegeben. Nach 10-30 min wird bei 0°C weitere 2 h gerührt, danach 2 Tage bei Raumtemperatur. Das Fluid wird abfiltriert, der feste Rückstand mit 90% Methanol in Wasser extrahiert und filtriert. Boc-Met-AMC6 fällt bei 4°C aus, wird eingeengt am Rotationsverdampfer und nochmals mit 50% Methanol in Wasser gefällt. Die Ausbeute ist 65% nach Filtration.

Met-AMC fällt nach Entschützen7 mit TFA in trockenem Ether bei 4°C aus, wird abfiltriert und getrocknet.

Einer Lösung des Met-AMC-TFA-Salzes⁸ (1,2 mmol) und N-Ethyl-morpholin¹⁰ (1,2 mmol) in DMF (5 ml) wird Boc-Leu-OSu⁹ (1,2 mmol) in THF (15 ml) bei 0°C zugegeben. Die Reaktion verläuft 2 Tage bei RT. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum und Aufnahme in Ethylacetat (30 ml) wird je zweimal extrahiert mit 5% NaHCO₃ und 5% KHSO₄ in Wasser. Die Ausbeute nach Trocknen über Na₂SO₄ und Entfernen des Ethylacetates im Vakuum beträgt 55,3% (345mg=0,66mM).

1. Reinigung des Peptides:

Das Peptidsubstrat wird durch Flash-Chromatographie an einer Kieselgel-Säule (Höhe x Durchmesser 300x25mm, V~230ml, flacher Boden) mit Hilfe des Elutionsgemisches Ethylacetat/Dichlormethan 1/1 von restlichen Bestandteilen des Reaktionsansatzes getrennt. Die Laufgeschwindigkeit beträgt 30min 1,85ml/min danach 3,3ml/min. Es ist in dieser Reinigungsstufe eine Ausbeute von 67% erzielt worden.

2. Prüfung des Substrates durch HPLC und Massenspektroskopie

An der Forschungsstelle der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. "Enzymologie der Proteinfaltung" ist das Syntheseprodukt durch HPLC und Massenspektroskopie von M. Drewello bestätigt worden.

¹⁷ AMC: 7-Amino-4-Methylcumarin





Diagramm 7:

HPLC-Trennung und Identifikation von Produkten der Boc-Leu-Met-AMC-Synthese nach saurer und basischer Extraktion 280nm: Absorption 340/440nm: Fluoreszenz; ACN/H₂O 60/40%



Diagramm 8:

HPLC-Trennung und Identifikation von AMC 280nm: Absorption 340/440nm: Fluoreszenz



Diagramm 9:

HPLC-Diagramm zur Reinheit des Syntheseproduktes Boc-Leu-Met-AMC, (Angaben mit freundlicher Unterstützung von M. Drewello, Forschungsstelle der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. "Enzymologie der Proteinfaltung", Halle)





Schema 2:

andere Peptid-Substrate

Andere verwendete Peptidsubstrate stammen von folgenden Firmen:

Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC Bz-Val-Gly-Arg-AMC Boc-Leu-Met-CAMC

Bachem Bachem **Molecular Probes**

1.3 Inhibitoren

1.3.1 Endogener Proteininhibitor (Calpastatin)

Methode

450g Rinderherz (frisch oder tiefgekühlt) werden mit Trispuffer (0,05M Tris HCl, pH 7,4, 0,05M NaCl, 0,0025M EGTA, EDTA 0,0025M, 0,005M Mercaptoethanol, 5mg PMSF) im Eisbad homogenisiert. Nach 1 Stunde Zentrifugieren bei 20000g filtriert man den Überstand über DEAE-Sephacel Ionenaustauscher und eluiert mit einem Kochsalzgradienten 0,05M-0,4M. Die Calpastatin-haltigen Fraktionen werden durch ihre Hemmwirkung auf die Calpainaktivität bei der Hydrolyse des fluorogenen Substrates Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC identifiziert.

Die Fraktionen werden vereinigt und langsam auf 95°C erhitzt, im Eisbad abgekühlt und ausgefallenes Eiweiß abzentrifugiert. Der Überstand wird zur weiteren Proteinauftrennung über ein Molsieb vom Typ Superdex 200 filtriert. Der Calpastatin-haltige Bereich wird konzentriert und durch SDS-Elektrophorese auf Reinheit überprüft.



Diagramm 11: Calpastatin-Isolation aus Rinderherz-Homogenat über DEAE-Sephacel, Aktivitätsmessung indirekt über Inhibition der Hydrolyse von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC durch Calpain



Diagramm 12: Calpastatin-Separation über Superdex 200 aus aktiven Fraktionen der DEAE-Sephacel-Trennung; Aktivitätsmessung indirekt über Inhibition der Hydrolyse von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC durch Calpain



Ergebnis

Nach zwei Separationsschritten wird im Test nach Lowry 0,974g/l Protein nachgewiesen. Calpastatin erscheint auf der Elektrophorese als eine Hauptbande und zwei Nebenbanden zwischen 29kD und 45kD.

1.3.2 Peptide- und andere Inhibitoren

Inhibitoren, die in den beschriebenen Untersuchungen verwendet werden, stammen von folgenden Firmen:

_			
	Bezeichnung	Inhibitor für	Quelle
	CALPAIN INHIBITOR I N-Ac-Leu-Leu-Norleucinal,	Calpain und Proteasomen	BOEHRINGER MANNHEIM
	CALPAIN INHIBITOR II N-Ac-Leu-Leu-Methional	Calpain, Cathepsin B und L	BOEHRINGER MANNHEIM
	CALPEPTIN Z-Leu-Norleucinal	Calpain, Papain	NOVABIOCHEM
	CHYMOSTATIN,	Cysteinproteasen, Chymotrypsin, Papain	CALBIOCHEM
	E-64, N-(trans-Epoxysuccinyl)-L-Leucin-4-Guani- dinobutylamid	Cysteinproteasen	FLUKA
	E-64d, EST (2S,3S)-trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-3- Methylbutan-Ethylester	Cysteinproteasen	CALBIOCHEM
	lodazetamid	Cysteinproteasen	E.MERCK
	LEUPEPTIN Ac-Leu-Leu-Arginal	Cathepsin, Papain	CALBIOCHEM
	NEM N-Ethylmaleinimid	SH-alkylierend, SH-Enzyme, Endonucleasen	SCHUCHARDT; MÜNCHEN
	PCMPS p-Chlormercurisulfonsäure Natriumsalz	SH-Enzyme, Proteinasen	SIGMA
	Pepstatin	Aspartatproteasen	CALBIOCHEM
	p-Hydroxymercuri-Benzoesäure Natriumsalz HgC₀H₄COONa	SH-Enzyme allgemein	CHEMAPOL, PRAG
	PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid	Serinproteasen	SERVA
	ZAAPCK	Peptidasen	Jahreis et al. (15)
	Z-Leu-Tyr-Chlormethylketon	SH-Enzyme, Proteinasen, Papain, Calpain	BACHEM

Tabelle 4: Protease-Inhibitoren und deren Bezugsquelle

1.4 Anti-Calpain-Antiseren

1.4.1 Polyklonal, Kaninchen-anti-m-Calpain-Antiserum

Angaben: G.Hahn

Vor der Immunisierung wird Blut für die Erzeugung von Nullserum abgenommen. Kaninchen werden mit 250µg Calpain II, gewonnen aus Rinderherz, und komplettem Freudschen Adjuvants immunisiert. Nach 6 Wochen erfolgt eine erste Boosterung, 2 Tage später eine zweite mit jeweils 50µg Calpain. 10 Tage nach Boostern für das erste Antiserum ist eine Blutentnahmen durchgeführt worden, danach weitere im Abstand von 14 Tagen.

Die Spezifität wird durch Ochterlony-Test und Westernblot überprüft; der Proteingehalt wird nach Lowry bestimmt.

1.4.2 Monoklonal, Maus-anti-m-Calpain-Antiserum

Angaben zum Assay nach Wagner et al. (17)

Monoklonale Antikörper entstammen der Kooperation mit Dr. I. Lachmann, Universität Leipzig. Für die Tests wird der monoklonale Antikörper 1E8, Überstand vom 02.06.1998 verwendet.

Angaben zur Spezifität

An Latex-Partikel (2.9µm, Polysciences, Warrington, PA, USA) werden 10µg/ml Ziege-anti-Maus-IgG (Dianova, Hamburg) in PBS über Nacht bei Raumtemperatur (schütteln) adhäriert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween-20 (0,1%; "PBS/T") erfolgt eine Inkubation mit Hybridom-Kulturüberständen der monoklonalen Antikörper 1E8 (anti-m-Calpain) und 7F10 (Kontrollantikörper, gegen Extrazellulärprotein von Aeromonas salmonicida gerichtet) (1:3 PBS/T, 4 Stunden, Raumtemperatur, schütteln). Nach drei Waschschritten erfolgt die Inkubation mit inaktiviertem Calpain (1:5 PBS/T, 3 Stunden, 4°C, schütteln). Inaktivieren ist erforderlich, da die aktive Protease (Calpain) in Vorversuchen vermutlich die Antikörper-Antigen-Reaktion verhindert hat. Es wird erneut dreimal gewaschen, das Latex-Sediment in SDS-Probenpuffer resuspendiert, 10min auf 95°C erhitzt über eine SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose-Folie (0,45µm, Serva) transferiert (Westernblot). Das mittels monoklonalem Antikörper gefangene und per SDS-PAGE und Westernblot separierte Antigen wird mit Kaninchen-anti-Calpain-Vollserum (1:1000 in PBS/T), Ziege-anti-Kaninchen-POD (Dianova) und DAB/H₂O₂ immunochemisch nachgewiesen.



Abbildung 6: Nachweis der Spezifität von 1E8 (anti-m-Calpain-Antikörper, monoklonal), Antigen: m-Calpain aus Rinderherz, Westernblot nach SDS-PAGE,

MW Molekulargewichtsmarker, 1 Kontrollantiserum, 2+3 zwischen 50.000 und 80.000 kDa mit einzelner Bande: m-Calpain, Banden oberhalb 80.000: Calpain-Antikörperkomplexe

1.5 Fluoreszenzfarbstoffe

1.5.1 Fluoreszenzfarbstoffe zur Untersuchung des Calciumgehaltes in Zellen

Fura 2	Molecular Probes
Fura Red	Molecular Probes
Fluo 3	Molecular Probes

Eine bestimmte Ca²⁺-Konzentration ist für den Nachweis der Ca-abhängigen Protease Calpain in vitro Voraussetzung (siehe S.1-6). Es wird daher angenommen, daß Ca²⁺ auch bei der Aktivierung von Calpain in vivo eine Rolle spielt.

Im Vorfeld dieser Untersuchungen wird überprüft, ob man in geeigneter Form den Ca²⁺-Gehalt der Linsenepithelzellen detektieren und zielgerichtet beeinflussen kann.

Es stehen heute fluoreszierende Farbstoffe zur Verfügung, die Chelatkomplexe mit Ca²⁺ bilden und daraufhin ihre Fluoreszenzeigenschaften in Intensität und/oder Wellenlänge ändern. Beim Einsatz eines einzelnen Farbstoffes, der seine Ca²⁺⁻ abhängige Fluoreszenz in einer Richtung ändert, kann die Auslöschung (Quenchen) und die Wellenlängenverschiebung (Shift) ausgenutzt werden. **Besser** interpretierbar Einsatz ist der zweier Farbstoffe A+B mit gegenläufiger Fluorezenzentwicklung (A=hohe und entgegengesetzt B=geringe Fluoreszenzintensität bei niedriger Calciumkonzentration und umgekehrt). Unter der Voraussetzung des gleichstarken Ausbleichens durch Lichteinfluß orientiert sich das Verhältnis (ratio) beider Fluoreszenzen nur an der Calciumkonzentration.

Erste Tests sind mit Fura2 als einzelnem Farbstoff durchgeführt worden. Wegen Problemen der Interpretation (Ausbleichen durch Lichteinfluß) erfolgen weitere Untersuchungen mit Fluo-3 + FuraRed, einer ratio-Kombination.



Abbildung 7: Excitationsspektrum von Fura 2 (aus 176)

Abbildung 8: Emissionsspektrum von Fluo-3/Fura Red (aus 176)

1.5.2 Fluoreszenzfarbstoffe zur Untersuchung der Proteaseaktivität

AMC, 7-Amino-4-Methylcumarin	Molecular Probes
CAMC, 7-Amino-4-Chlormethylcumarin	Molecular Probes

Für die Untersuchungen der Proteaseaktivität sind Aminomethylcumarinfarbstoffen ausgewählt worden. Diese gestatteten es, da die vorhandenen Untersuchungsgeräte über entsprechende Detektoren verfügen, die gleichen gelabelten Substrate in vitro wie auch in vivo einzusetzen. Eine quantitative Auswertung ist aufgrund der nachfolgend beschriebenen Untersuchung möglich.

1.5.3 Untersuchung zur Quantifizierung durch Fluoreszenzmessung von AMC

Untersuchungen am Fluoreszenzfotometer

Die Umwandlung der Fluoreszenz von AMC in molare Einheiten ist erforderlich, um den Enzymumsatz eines Substrates mit AMC als Fluorogen zu bestimmen.

Folgende Einstellungen für das Meßgerät (Fluoreszenzfotometer F2000, HITACHI) sind von Bedeutung:

 $\lambda_{Exzitation}$ 365nm

 $\lambda_{\text{Emmission}}$ 440nm

Die Exzitationswellenlänge ergibt sich wie folgt: AMC hat eine max. Fluoreszenz bei $\lambda_{Exzitation}$ =340nm. Untersuchungen am Laser Raster Mikroskop (LSM) sind möglich mit dem Argonlaser $\lambda_{Exzitation}$ =365nm. Für die Vergleichbarkeit der Messungen an beiden Geräten wird am Fotometer ebenfalls $\lambda_{Exzitation}$ =365nm benutzt, da die Fluoreszenzausbeute ausreichend ist. Filtereinstellungen und Einstellungen der elektronischen Parameter sind identisch für alle Messungen.

Die molare Fluoreszenzintensität von AMC entspricht der Gleichung y=775,6x+11,751 für die Konzentrationsangabe von AMC [μ M] bei der am F2000 angegebenen abs. Fluoreszenz. Für eine Fluoreszenz bzw. Fluoreszenzsteigerung um 100 Einheiten benötigt man 0,114 μ M AMC.



Diagramm 13: Fluoreszenzkalibrierung von AMC für die Konzentrationsbestimmung am Fotometer F2000, HITACHI

Untersuchungen mit Hilfe der HPLC

Eine weitere Möglichkeit, den bei Substrathydrolyse freigesetzten AMC-Rest zu quantifizieren, besteht in der chromatographischen Auftrennung und Identifizierung seiner Fluoreszenz. Für die Auftrennung wird eine RP-18 Säule mit Vorsäule (Peaks werden etwas verbreitert) genutzt.

Das Elutionsmittel ist ein Acetonitril/Wasser-Gemisch 75%/25%, eluiert wird mit einer Geschwindigkeit von 1ml/min. Es wird 10µl Probe aufgetragen. Als Detektor steht ein Fluoreszenzmonitor zur Verfügung (λ_{Excit} =340nm). Für die Reaktionen in Zellen liegen die erwarteten Fluoreszenzen zwischen 10⁻⁵M bis 10⁻⁶M.





Diagramm 14, 15: HPLC-Trennung und Fluoreszenzdetektion von 10 μ l einer 10⁻⁵ bzw. 10⁻⁶M AMC-Lösung für die Konzentrationsbestimmung, A = Fläche unter dem Gipfel. RP-18, ACN/H₂O 3/1, 1ml/min

Die Flächen unter den AMC-Gipfeln verhalten sich etwa wie 10:1, d.h. im Konzentrationsbereich zwischen 10⁻⁵-10⁻⁶M AMC verhält sich die Fluoreszenzintensität nahezu linear. 4 Flächeneinheiten entsprechen 10⁻⁶l einer 10⁻⁶M AMC-Lösung bzw. 10⁻¹²mol AMC.

1.6 Ionophoren

Ionomycin

Calbiochem

Ionophoren sind Moleküle, die über zwei allgemeine Eigenschaften verfügen: sie können reversibel Komplexe mit Ionen, Ionomycin bevorzugt Ca²⁺, bilden, und sie sind hydrophob. Durch die hydrophobe Eigenschaft lösen sich die Verbindungen in den beschriebenen Untersuchungen bevorzugt in biologischen Membranen, in denen sie beweglich sind. Sie führen wegen ihrer metallbindenden Eigenschaft zum Konzentrationsausgleich der Metallionen in den angrenzenden wässrigen Milieus (13, 37).

Kapitel 2: Untersuchungsmethoden und Ergebnisse

2.1 Enzymaktivitätsuntersuchungen

2.1.1 Untersuchungen mit isoliertem m-Calpain

2.1.1.1 Nachweis einer Ca²⁺-abhängigen cytosolischen Thiolprotease in vitro – Calpain

Calciumabhängigkeit der Aktivität

Methode

Aktives Calpain in Trispuffer (0,05M Tris HCl, pH 7,4, 0,005M EDTA, 0,005M Mercaptoethanol) wird einem Enzymtest mit fluorogenem Substrat im Fluoreszenzfotometer bei steigender Ca-Konzentration unterzogen. Alle Lösungen sind mit tridest. H₂O bereitet, um einen unkontrollierten Ca²⁺-Eintrag zu vermeiden.

- 100µl Mercaptoethanol (0,16M in tridest. H₂O) 25µl Suc-Leu-Leu-Val-Tvr-AMC (0.002M in DMSO)
- + 25μl Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (0,002M in DMS
 + Aμl Ca-Lösung (0,025M CaCl₂ in tridest. H₂O)
- + Apr Ca-Losung $(0, 0.25 \text{ M} \text{ CaCh}_2 \text{ In th}$
- + $200-A\mu$ l tridest. H₂O
- + 655μ l Trispuffer (0,1M Tris-HCl, pH 7,2)

+ 20µl Enzymprobe, m-Calpain aus Rinderherz Start

1000µl

Aµl	4	5	10	20	25	30	40	50	100	200
Ca [mM]	0	0,025	0,15	0,4	0,525	0,65	0,9	1,15	2,4	4,9

Tabelle 5: Mengen und Konzentrationen von CaCl₂ für die Untersuchung der Ca²⁺-Abhängigkeit



Diagramm 16: Abhängigkeit der Calpain-Aktivität von der Ca²⁺-Konzentration

Ergebnis

Die Ca²⁺-Aktivierung der Enzymproben aus Rinderherz erfolgt halbmaximal bei etwa 0,5mM Ca²⁺ und maximal bei etwa 1mM Ca²⁺. Nach Definition handelt es sich hier um m-Calpain bzw. Calpain II.(7,8,9)

Stimulation mit Mercaptoethanol (Thiol)

Methode

Der Versuch basiert auf dem Nachweis der Enzymaktivität mit Azocasein. Die Versuchsansätze werden mit steigender Konzentration an Thiol versehen. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C erfolgt die Messung der Absorption am Specol UV-VIS und die Darstellung mit Hilfe einer Excel-Graphik.

- 25µl Ca-Lösung (0,2M CaCl₂ in Tris-HCl, pH 7,4)
- + 250µl Azocasein (1,5% in 0,05M Tris-HCl, pH 7,4)
- + Aµl ME (Mercaptoethanol) (0,05M in 0,05M Tris-HCl, pH 7,4)

^{+ 450}µl-Aµl Trispuffer (0,05M Tris-HCl, pH 7,4)

+	25µl Enzymprobe, m-Calpain aus Rinderherz	Start
	750µl	

Aμl	0	4	10	20	40	100	200
ME[mM]	0	0,2	0,5	1	2	5	10

Tabelle 6: Mengen und Konzentrationen von Mercaptoethanol, ME für die Untersuchung der Thiol-Abhängigkeit



Diagramm 17: Abhängigkeit der Calpain-Aktivität von der Thiol-Konzentration (Mercaptoethanol, ME)

Ergebnis

Die Aktivierung des m-Calpain aus Rinderherz läßt sich sehr gut demonstrieren. Man kommt zu dem schon 1964 von Guroff beschriebenen Ergebnis (4).

Cytosolische Lokalisation

(siehe SS. 39 ff., 46, 71)

Start

2.1.1.2 Kinetische Untersuchungen des Substratumsatzes von Calpain

Die Umsatzkinetik fluorogener Peptid-Substrate wird wie folgt im Fluoreszenzfotometer bestimmt:

Methode

+	100µl	Mercaptoethanol (0,05M in tridest. H ₂ O)
+	100µl	Ca-Lösung (0,02M CaCl ₂ in tridest. H ₂ O)
+	Aµl	Substrat (0,001M in DMSO)
+	780-Aµl	Trispuffer (0,1M Tris-HCl, pH 7,2)
+	20µl	Enzymprobe, m-Calpain aus Rinderherz
	1000µl	

Aμl	2	4	7	10	15	20	30	50
S [µM]	2	4	7	10	15	20	30	50

Tabelle 7: Volumina und Endkonzentrationen des Substrates im Test

Die Versuchsansätze werden kontinuierlich fünf Minuten lang am Fluoreszenzfotometer vermessen und der mittlere Anstieg des linearen Teils der Reaktionskurven in den Lineveaver-Burk-Plot einer Excel-Tabelle übertragen. Nachfolgende Berechnungen von Anstieg und Nullpunkt der Funktion 1/s : 1/v sowie das Zeichnen der Geraden erfolgen in Excel.



Diagramm 18: Ermittlung von K_m und v_{max} im Lineweaver-Burg-Plot am Beispiel des Umsatzes von Boc-Leu-Met-CAMC mit m-Calpain aus Rinderherz. Die lineare Gleichung hat die allg. Formel y=ax+b; K_M =-a/b; V_{max} =1/b

Ergebnis

SUBSTRAT	K _M [10 ⁻⁶ M]	V _{max} [10 ⁻⁶ M min ⁻¹]	K _{cat} [min ⁻¹]	K _{cat} / K _M [10 ³ min ⁻¹ M ⁻¹]	
Boc-Leu-Met-AMC	101,6	49,7	4,55	4,48	
Boc-Leu-Met-CAMC	80,6	48,5	4,44	5,51	
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	70,2	95,2	8,72	12,40	

Tabelle 8: K_M, V_{max}, K_{cat}=V_{max}/Enzym_i, K_{cat}/K_M für den Umsatz der Peptidsubstrate mit m-Calpain

 K_{M} = Michaelis-Konstante, Substratkonzentration bei der Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, Größenordnungen von 10⁻²–10⁻⁵mol/l, kleiner K_M-Wert bedeutet eine große Affinität zwischen Enzym und Substrat

V_{max}= maximale Reaktionsgeschwindigkeit

K_{cat}= maximale Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf die Enzymkonzentration

2.1.1.3 Hemmung von Calpain mit synthetischen Protease-Inhibitoren und endogenem Protein-Inhibitor Calpastatin

Enzyme haben wie alle Katalysatoren eine Substrat- und damit auch eine Reaktionsspezifität und können möglicherweise noch allosterisch beeinflußt werden. Diese Eigenschaften führen dazu, daß Enzyme auch ein bestimmtes Inhibitorenspektrum besitzen, das zur Charakterisierung genutzt wird.

1. Proteininhibitor Calpastatin

Methode

Für Calpain ist ein endogener Inhibitor, Calpastatin bekannt. Die Abnahme der Calpain-Aktivität bei steigender Inhibitorkonzentration wird anhand eines Testes der enzymatischen Aktivität von Calpain mit dem fluorogenen Peptidsubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC demonstriert.

+ 100μ CaCl₂ (0,05M in tridest. H₂O)

+ Aµl Calpastatin in Trispuffer (0,974g/l Protein)

- + 765-Aµl Trispuffer (0,05M Tris-HCl, pH 7,2)
- + 50µl Enzymprobe, m-Calpain aus Rinderherz (0,327g/l Protein=0,149µM)

+	10µl Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (0,002M in DMSO)	Start	
	1000]		

1000µl

Nach 10 Minuten (Thermoschüttler, 37°C) wird die Reaktion gestoppt und die Fluoreszenz vermessen.

Aμl	0	5	10	25	50	100	200
Calpastatin [µM]	0	0,018	0,036	0,090	0,18	0,36	0,72
Molares Verhältnis Calpastatin/Calpain	0	0,121	0,243	0,607	1,213	2,43	4,85

Tabelle 9: Mengen und Konzentrationen von Calpastatin für die Untersuchung der Inhibitorwirkung auf m-Calpain; MW Calpain 110000, MW Calpastatin 270000.
Calpastatin inaktiviert Calpain vollständig bei einem molaren Verhältnis Calpastatin: Calpain von ca. 1:4 (MW Calpain 110.000, MW Calpastatin 270.000) (10,11).



Diagramm 19: Abhängigkeit der Calpain-Aktivität von der Menge zugesetzten Calpastatins, Aktivität gemessen anhand des hydrolytischen Umsatzes des Peptidsubstrates Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC

2. Peptid-und Nichtpeptid-Inhibitoren

Methode

Isoliertes Calpain in Trispuffer (0,05M Tris HCl, pH 7,4, 0,005M EDTA, 0,005M Mercaptoethanol) wird einem Enzymtest mit fluorogenem Substrat und Proteaseinhibitoren im Fluoreszenzfotometer unterzogen:

	100µl	Enzymprobe (0,8mg/ml; 0,005M EDTA/EGTA im Puffer)
+	20µl	CaCl ₂ -Lösung (0,2M in A.dest)
+	Aµl	Inhibitor-Lösung (0,01M in DMSO) a)
+	Aµl	Inhibitor-Lösung (0,005M in DMSO) _{b)}
+	870-Aµl	Trispuffer (0,05M Tris-HCl, pH 7,2; Mercaptoethanol)

+	10µl	Boc-Leu-Met-AMC (0,002M in DMSO)	Start
	1000µl		

Aμl _{a)}	10	Aµl b)	20
Inhibitor [µM]	100		100

Tabelle 10: Mengen und Konzentrationen der Protease-Inhibitoren

Inkubation mit Inhibitor

5 min



Diagramm 20: Calpainaktivität mit Protease-Inhibitoren (100µM), Substrat Boc-Leu-Met-AMC (20µM); Kontrolle = 100%-Enzymaktivität;

2	NEM	7	E-64d, EST	12		Chymostatin
3	PCMPS	8	Calpain-Inhibitor I	13		Pepstatin
4	PMSF	9	Calpain-Inhibitor II	14		Calpeptin
5	Iodazetamid	10	ZLYCK	15	100%	CaCl ₂ , 2mM
6	E-64	11	ZAAPCK	16	0%	EDTA, 2mM

Tabelle 11: Zuordnung der	^r Inhibitoren zum	Diagramm 20
---------------------------	------------------------------	--------------------

Von den untersuchten Inhibitoren hemmen die Enzymaktivität zu 100%: Iodacetamid, E-64, Calpain-Inhibitor I, Calpain-Inhibitor II, ZLYCK, Chymostatin und Calpeptin. E-64d hemmt ca. 30% und Pepstatin ca. 50% der Enzymaktivität. Die anderen Inhibitoren NEM, PCMPS, PMSF, ZAAPCK hemmen nicht.

2.1.1.4 Elektrophoretischer Nachweis von m-Calpain

In der nativen Elektrophorese kann m-Calpain in den Formen kleine Untereinheit (30kD), große Untereinheit (80kD), Gesamtmolekül (110kD) sowie als Aggregate von Untereinheiten auftreten, während man in der SDS-Elektrophorese nur zwei Hauptbanden bei MW von ca. 80kD und 30kD erwarten kann. Wegen Autolyse kann man auch kleinere Moleküle immunologisch (siehe S.35) und enzymatisch (siehe S.34) nachweisen.



Abbildung 9: Nativelektrophorese von isoliertem m-Calpain

MW Molekulargewichtsmarker (RSA-Aggregate)

1 Bandenspektrum nach dem 2.Separationsschritt (siehe Reinigung m-Calpain); 7,5% Gel, Silberfärbung Abbildung 10: SDS-Elektrophorese von isoliertem m-Calpain

MW Molekulargewichtsmarker

1 Bandenspektrum nach dem 2. Separationsschritt (siehe Reinigung m-Calpain); 10% Gel, Coomassiefärbung

2.1.1.5 Nachweis der Aktivität einer Ca²⁺-abhängigen cytosolischen Thiolprotease in der Nativelektrophorese – Zymogramm

Die Aktivität von m-Calpain läßt sich in einer speziellen Form der Nativelektrophorese, dem Zymogramm nachweisen. Für die Darstellung wird ein 7,5% iges Gel benutzt mit einem Zusatz von 0,1% Casein. Nach der Elektrophorese erfolgt die Inkubation mit 4mM CaCl₂ in 20mM Trispuffer, pH 7,4 über Nacht bei 4°C. Das Gel wird mit Coomassie-Brillant Blue-Lösung angefärbt. Als Kontrolle und zur Verdeutlichung der Ca²⁺-abhängigen Proteolyse wird Papain mitinkubiert.



Abbildung 11: Zymogramm von isoliertem m-Calpain,

0,1% Casein im Nativelektrophoresegel, Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant Blue 5%iges Sammelgel, 7,5%iges Trenngel

- 1 m-Calpain ~7,5µg Protein
- 2 m-Calpain ~15µg Protein
- 3 m-Calpain ~30µg Protein
- 4 Kontrolle: Papain 1,5U

Ergebnis

Papain und Calpain reagieren mit Casein unterschiedlich. Papain entfaltet seine Proteaseaktivität während der Wanderung, m-Calpain reagiert erst, nachdem es mit ausreichend Ca²⁺ versorgt wird, also nach der Wanderung während der Inkubation. Dabei entstehen die scharf abgesetzten Banden. Es sind bei näherer Betrachtung sogar noch niedermolekulare aktive Banden zu erkennen (Bahn 2 und 3).

2.1.1.6 Immunologischer Nachweis von m-Calpain im Westernblot

Nach einer Elektrophorese (nativ oder SDS) kann m-Calpain aufgrund seiner Antigen-Wirkung mit anti-m-Calpain-Antiserum nachgewiesen werden (spezifischer Nachweis). Dazu werden im semidry Westernblot die aufgetrennten Banden der Elektrophorese mittels elektrischem Potential auf eine geeignete Membran (Nitrocellulose, PVDF) übertragen. An diese binden sich die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen und behalten dabei ihre Antigeneigenschaften, nach einer nativen Elektrophorese auch die enzymatische Aktivität. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber einer Detektion direkt im Elektrophoresegel besteht darin, daß die Enzyme sich auf der Oberfläche der Membran befinden und nicht diffundieren, und z.B. Antikörpern oder Substraten mit hoher Molekülmasse direkt zugänglich sind.

- 1. Nachweis mit Maus-anti-m-Calpain (monoklonales Antiserum) nach SDS-Elektrophorese
- 2. Nachweis mit Kaninchen-anti-m-Calpain (polyklonales Antiserum) nach SDS-Elektrophorese





Abbildung 12: m-Calpain im Westernblot, monoklonales Maus-Antiserum 1E8

MW Molekulargewichtsmarker

1 m-Calpain in reduzierendem SDS-Puffer (3min 95°C),

2 m-Calpain in SDS-Puffer ohne Erhitzen; monoklonaler Antikörper 1E8, POD-Konjugat, Abb. mit freundlicher Genehmigung von Dr.I.Lachmann Abbildung 13: m-Calpain im Westernblot, polyklonales Kaninchen-Antiserum

m-Calpain in reduzierendem SDS-Puffer (3min 95°C), Elektrophoresegel 7,5%, IgG-Fraktion von Kaninchen-anti-m-Calpain Antiserum, POD-Konjugat

2.1.1.7 Vergleichende Untersuchungen zwischen m-Calpain und Proteasomen

Die Darstellung der calciumabhängigen cytosolischen Protease *in vivo* ist gut beschrieben und durch Antikörpertests und molekularbiologische Untersuchungen gesichert. Wesentlich schwieriger gestaltet sich dagegen der Beweis der enzymatischen Aktivität *in vivo*. Es ist nötig, diese von Proteasomen, lysosomalen Proteasen und eventuell vorhandenen, nicht beschriebenen Proteasen abzugrenzen.

Ein erster Schritt ist die vergleichende Charakterisierung von Calpain und Proteasomen *in vitro*. Es ist von Dahlmann et al.(5) beschrieben und eigene Voruntersuchungen haben ergeben, daß die multikatalytischen Proteasomen verschiedene Substrate unterschiedlich umsetzen, d.h. an unterschiedlichen katalytischen Orten spalten. Die folgenden Versuche beziehen sich nur auf das Substrat Boc-Leu-Met-AMC. Ein Vergleich der Calciumabhängigkeit der proteolytischen Aktivität und die Wirkung von Inhibitoren wird dargestellt.

1. Calciumabhängigkeit der Proteolyse durch Proteasomen und Vergleich zu m-Calpain

Methode

Aktive Proteasomen (siehe S.11 f.) in Trispuffer (0,05M Tris HCl, pH 7,4, 0,005M EDTA, 0,005M Mercaptoethanol) werden einem Enzymtest mit fluorogenem Substrat im Fluoreszenzfotometer bei steigender Ca-Konzentration unterzogen.

- 10µl Boc-Leu-Met-AMC (0,002M in DMSO)
- + $A\mu$ Ca-Lösung (0,01M CaCl₂ in tridest. H₂O) a)
- + oder Aµl Ca-Lösung (0,1M CaCl₂ in tridest. H₂O) b)
- + 940-Aµl Trispuffer (0,1M Tris-HCl, pH 7,2; Mercaptoethanol)

+	50µl	Enzymprobe, Proteasom aus Rinderherz	Start
	1000µl		

Aμl _{a)}	1	5	10	50	Aμl _{b)}	10	20	50	100
Ca _i [µM]	10	50	100	500		1000	2000	5000	104

Tabelle 12: Mengen und Konzentrationen von $CaCl_2$ für die Untersuchung der Ca^{2+} -Abhängigkeit

Ergebnis

Dahlmann et al. finden, daß bei anderen Proteasesubstraten die Proteolyse durch Proteasomen calciumabhängig sein kann (5). Diese Aussage hat uns veranlaßt, auch bei diesem Enzym eine Abhängigkeit zwischen Calciumkonzentration und Substratumsatz zu untersuchen.

Im Bereich der Calciumkonzentration von 0mM bis 5mM hydrolysieren Proteasomen Boc-Leu-Met-AMC mit der gleichhohen Umsatzrate. Calciumionen beeinflussen demnach den Umsatz dieses Substrates nicht. Bei einem Überschuß an EDTA ab ca. 2mM ist der Umsatz von Boc-Leu-Met-AMC deutlich erniedrigt (siehe S.37: Diagramm 21).



Diagramm 21: Abhängigkeit der Proteasomen- und der Calpain-Aktivität von der Ca²⁺-Konzentration, Substrat Boc-Leu-Met-AMC;

2. Einfluß von ausgewählten Protease-Inhibitoren auf Proteasomen und Vergleich zu m-Calpain (Inhibitoren siehe S. 20 Tabelle 4)

Methode

Aktive Proteasomen (siehe S. 11 f.) in Trispuffer (0,05M Tris HCl, pH 7,4, 0,005M EDTA, 0,005M Mercaptoethanol) werden einem Enzymtest mit fluorogenem Substrat und Proteaseinhibitoren im Fluoreszenzfotometer unterzogen:

	50µl	Enzymprobe (0,005M EDTA/EGTA im Puffer), Proteasomen
+	Aμl	Inhibitor-Lösung (0,01M in DMSO) a)
+ oder	Aμl	Inhibitor-Lösung (0,005M in DMSO) b)
+ 940	0-Aµl	Trispuffer (0,1M Tris-HCl, pH 7,2; Mercaptoethanol)

		Inkubation mit Inhibitor	5 min
+	10µl	Boc-Leu-Met-AMC (0,002M in DMSO)	Start
	1000µl		

Aμl a)	10	Aµl b)	20
Inhibitor _i [µM]	100		100

Tabelle 13: Mengen und Konzentrationen der Protease-Inhibitoren



Diagramm 22: Proteolytische Aktivität von Proteasomen unter dem Einfluß von Protease-Inhibitoren, Substrat Boc-Leu-Met-AMC; Kontrolle = 100%;

2	NEM	7	E-64d, EST	12	Chymostatin
3	PCMPS	8	Calpain-Inhibitor I	13	Pepstatin
4	PMSF	9	Calpain-Inhibitor II	14	Calpeptin
5	Iodacetamid	10	ZLYCK	15	CaCl ₂ , 2mM
6	E-64	11	ZAAPCK	16	EDTA, 2mM

Tabelle 14: Zuord	nung der Inhibitore	n zum Diagramm :	22, 23
-------------------	---------------------	------------------	--------



Diagramm 23: Vergleich der Inhibitorwirkung auf Proteasomen und m-Calpain, Substrat Boc-Leu-Met-AMC; Kontrolle = 100%; Calpain, Proteasomen

Proteasomen sind mit Proteaseinhibitoren weniger effektiv zu hemmen als Calpain. Dieses Ergebnis ist zu erwarten, da die Proteasomen eine multikatalytische Protease darstellen. Man kann annehmen, daß das Substrat Boc-Leu-Met-AMC an mindestens zwei unterschiedlichen katalytischen Zentren umgesetzt wird. Bei den Proteasomen hemmen mit 100% E-64d und Calpeptin, bei Calpain Iodacetamid, E-64, Calpain-Inhibitor I, Calpain-Inhibitor II, ZLYCK, Chymostatin und Calpeptin. E-64d hemmt nur 30% der Aktivität.

2.1.2 Untersuchungen an Rinder-Linsenepithelzellen

2.1.2.1 Immunologischer Nachweis von Calpain aus Linsenepithelzellen im Westernblot

Methode

Von zwei kleinen Kulturflaschen, deren Boden dicht mit Linsenepithelzellen bewachsen ist, wird das Kulturmedium gegen Trispufferlösung getauscht (0,02M Tris/HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 4mM EDTA, 5mM Mercaptoethanol). Die Zellen werden mit einem Gummischaber abgelöst. Alle weiteren Vorgänge erfolgen bei 0-4°C. Die Zellensuspension wird 5 Minuten bei 1000g auf 2ml konzentriert. Es wird 1mM E-64 zugesetzt und die Zellen durch mehrfaches Frieren und Tauen in Methanol/Trockeneis aufgeschlossen. Danach erfolgt eine Zentrifugation von 7 Minuten bei 1000g. Der Überstand wird eine Stunde bei 100000g zentrifugiert und es entsteht "Überstand 2"; während das Sediment einige Minuten in 1,5ml Trispuffer mit 1% Triton X-100 inkubiert wird. Es wird dann 30 Minuten bei 20000g zentrifugiert. Die entstandenen drei Fraktionen "Überstand 2" = Cytosol mit gelösten Proteinen, "Überstand 1" = detergenzlösliche Bestandteile (Membranproteine) und Sediment = nicht detergenzlösliche Bestandteile der Zellen, werden durch einen Westernblot nach SDS-Elektrophorese ausgewertet.



Abbildung 14: Westernblot von m-Calpain aus Rinderherz und Calpain aus Linsenepithelzellen vom Rind, Calpain in reduzierendem SDS-Puffer (3min 95°C), Elektrophoresegel 7,5%, IgG-Fraktion von Kaninchen-anti-m-Calpain Antiserum, POD-Konjugat

Links: (Abbildung 13 S. 35) m-Calpain aus Rinderherz

- Rechts: 1 Kontrollprotein, m-Calpain aus Rinderherz
 - 2 Sediment = Sediment nach Detergenzextraktion und 7min 1000g (Cytoskelett, Kernproteine)
 - **3** Überstand 1 = detergenzlösliche Proteine (Membranproteine)
 - 4 Überstand 2 = lösliche Bestandteile nach 1h 100000g (Cytosol)

Die Kontrolle (1), m-Calpain (Abbildung 14 rechts), und m-Calpain einer anderen Präparation (Abbildung 14 links) stimmen weitgehend überein. Auf beiden Blots erscheinen die große Untereinheit mit mehreren Banden und die kleine Untereinheit mit zwei Banden. Auf dem Blot links erkennt man noch eine einzelne Bande unterhalb 70kD. Diese ist in der Kontrolle rechts nicht vorhanden. Bei den Bahnen der Fraktionen von Linsenepithelzellen zeigt nur das Sediment (2) eine Färbung. Es erscheint unterhalb der 80K-Untereinheit der Kontrolle (1), scheinbar in Höhe der einzelnen Bande der linken Abbildung. In den Überständen (Bahnen 3 und 4) sind keine Banden gefärbt. Damit ist ein Calpain-Antigen zumindest in der detergenzlöslichen Sediments (Cytoskelett) Fraktion des nicht von Linsenepithelzellen nachgewiesen. Es entspricht in seinem Molekulargewicht weder der 80K noch der 30K-Untereinheit, sondern bewegt sich im Bereich unterhalb 70kD.

2.1.2.2 Detektion proteolytischer Aktivität in Linsenepithelzellen vom Rind mit Hilfe fluorogener Peptidsubstrate

Für die Testung der Calpainaktivität *in vitro* sind eine Reihe von Peptidsubstraten beschrieben, deren Verwendbarkeit *in vivo* untersucht wird (1, 24). Der Unterschied der Untersuchungen an lebenden Zellen zu denen in vitro besteht darin, daß man nicht über ein isoliertes Enzym verfügt, an dem die Reaktionen bis hin zu molaren Verhältnissen gut zu verfolgen sind. Es soll geklärt werden, welche dieser Substrate die intakte Zellmembran passieren können, welche Techniken es gibt, die Reaktionen zu quantifizieren, mit welchen Nebenreaktionen durch andere Proteasen man rechnen muß und wie diese Nebenreaktionen spezifiziert und abgegrenzt werden können.

Die Untersuchungsobjekte, Rinderlinsenepithelzellen (siehe S. 13), adhärieren auf Glasoberflächen. Diese Eigenschaft wird für die Inkubation während des Meßzeitraumes in einer POC-Kammer, Objektkammer für die Inversmikroskopie, genutzt. Die Untersuchungen werden an einem Laser-Raster-Mikroskop auf der Basis eines $\lambda_{\text{Excitation}} = 365 \text{nm}$ Inversmikroskops durchgeführt mit (einzelne Ar-Laser-Emissionslinie) und $\lambda_{\text{Emission}}$ >397nm. Am Mikroskop werden Bildsequenzen mit Abtastraten von 4 oder 8 Sekunden pro Einzelbild, der Auflösung 512 x 512 Pixel und einem Bildabstand von 30 oder 60 Sekunden erzeugt. Von 10 abgebildeten Zellen wird die Helligkeit einer definierten Fläche einem Grauwert zugeordnet. Innerhalb der Bildsequenz entstehen je Fläche eine Zeitabhängigkeit, die als Kurve oder Tabelle dargestellt werden kann.



Schema 3: Meßeinrichtung eines inversen Laser-Raster-Mikroskops (LSM)

1. Substrate

Boc-Leu-Met-CAMC Boc-Leu-Leu-Met-AMC Boc-Met-Met-AMC Boc-Leu-Met-AMC Boc-Val-Leu-Leu-AMC Boc-Norleu-Met-AMC Boc-Leu-Met-Rhodamin Suc-Ala-Phe-Leu-AMC Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC Z-Val-Leu-Leu-CAMC Abkürzungen

BLMM-Cl BLLMM BMMM BLMM BVLLM BNMM BLM-Rhodamin SAPLM SLLVYM SLLVYM SLYM



Diagramm 24¹: Fluoreszenzentwicklung durch hydrolytische Freisetzung von Fluorophoren aus untersuchten Peptidsubstraten in Linsenepithelzellen (siehe S.44, Abbildung 16)

Fluoreszenzanstieg	Fluoreszenzanstieg	Kein
linear	logarithmisch abklingend	Fluoreszenzanstieg
Boc-Leu-Met-CAMC	Boc-Leu-Leu-Met-AMC Boc-Met-Met-AMC Boc-Leu-Met-AMC Boc-Val-Leu-Leu-AMC Boc-Norleu-Met-AMC	Boc-Leu-Met-Rhodamin Suc-Arg-Phe-Leu-AMC Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC Suc-Leu-Tyr-AMC Z-Val-Leu-Leu-CAMC

 $^{^1}$ Die Wiedergabe der Linie von Z-VLLM-Cl auf einem Computermonitor ist hellgrün, auf einem Ausdruck weiß

Die *in vivo* untersuchten Substrate lassen sich in 3 Gruppen unterteilen: 1. solche, die nicht hydrolysiert werden, 2. spontan hydrolysierte Substrate mit logarithmischem Abklingen der intrazellulären Fluoreszenz, 3. spontan hydrolysierte Substrate mit linear ansteigender Fluoreszenz innerhalb des Meßzeitraumes.

Zu den nicht umgesetzten Substraten gehört Suc-Leu-Val-Tyr-AMC, welches in den beschriebenen *in vitro* Untersuchungen ein wirkungsvolles Substrat für Calpain und Proteasom darstellt (siehe S. 27 f.). Es muß angenommen werden, daß die succinylierten Peptide die Zellmembran der Linsenepithelzellen nicht passieren. Weiterhin kann gefolgert werden, daß keine Ektoproteasen auf der Oberfläche von Linsenepithelzellen existieren, die dieses Substrat hydrolysieren.

Die Aussage steht im Gegensatz zu Karlsson et al. (178) bei humanen Linsenepithelzellen.

Die Substrate der Form Boc-Peptidyl-AMC werden spontan intrazellulär proteolytisch gespalten. Sie sind an N-und C-Terminus mit hydrophoben Gruppen versehen und dadurch offensichtlich membranpermeabel. Der logarithmisch abklingende Anstieg erklärt sich aus dem Diffusionsvermögen von AMC, welches die Zellmembran ebenfalls passieren kann und die Zellen verläßt. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um den Umsatz der Zellen quantitativ zu bestimmen (siehe S. 44 ff.).

Boc-Leu-Met-CAMC weist einen linearen Fluoreszenzanstieg im LSM auf (Rosser et al., 12). Nach Untersuchungen der Autoren wird das Substrat über das Chloratom der CAMC-Gruppe durch Vermittlung der Glutathiontransferase an Glutathion gebunden. Erst in einem nächsten Schritt wird die CAMC-Gruppe vom restlichen Peptid abgespalten. Das so gebildete nicht membranpermeable Fluorophor akkumuliert in der Zelle.

2.1.2.3 Nachweis des Umsatzes von Boc-Leu-Met-AMC und Boc-Leu-Met-CAMC bei hoher mikroskopischer Auflösung in Linsenepithelzellen

Eine mikroskopische Lokalisation der Hydrolyse von Peptidsubstraten kann möglicherweise bei einem Vergleich mit einem immunologischen Nachweis von Calpain in Zellen etwas darüber aussagen, ob der Ort der Substrathydrolyse mit dem nachzuweisenden Antigen übereinstimmt. Dabei wird angenommen, daß bei der Inkubation der Zellen mit genügend hoher Konzentration an fluorogenem Substrat die Empfindlichkeit des LSM ausreicht, freiwerdendes AMC an den Orten der Proteolyse bei hoher mikroskopischer Auflösung nachzuweisen.

Methode

Linsenzellen werden auf Glasobjektträgern in eine POC-Kammer eingespannt und mit HBS pH 7,4 inkubiert. Für die Untersuchung am LSM wird dem Inkubationsmedium 40 μ M Boc-Leu-Met-AMC bzw. Boc-Leu-Met-CAMC hinzugefügt. Die unmittelbar anschließende Untersuchung erfolgt bei einer primären Objektivvergrößerung von 100x, einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und einer Abtastgeschwindigkeit von 16 Sekunden je Bild.



Es ist möglich, Orte des proteolytischen Umsatzes mikroskopisch genau zu lokalisieren. Dabei sind sehr helle kompakte Areale um den Zellkern zu erkennen. Dies sind sehr wahrscheinlich die Orte der größten proteolytischen Aktivität. Peripher erkennt man Punkte und Punktreihen bzw. kurze stäbchenförmige Abschnitte. Diese sind häufig strahlenförmig vom Kern zur Peripherie gerichtet.

Eine allgemeine einfache Aufhellung der Zellen wurde bei dieser Detektion nicht festgestellt.

2.1.2.4 Einfluß von Inhibitoren auf die Hydrolyse von Peptidsubstraten in Linsenepithelzellen

Wie in den oben (siehe S. 30 f.) beschriebenen Untersuchungen *in vitro* soll mit bekannten synthetischen Inhibitoren *in vivo* die Hemmung von Calpain gezeigt werden. Die folgenden Tests erfordern Substanzen, welche die Zellmembran passieren können bzw. den Ausschluß der proteolytischen Wirkung an der Außenseite der Zellmembran anzeigen, sofern sie diese nicht passieren können.

Methode

Vorbereitung der Untersuchungsobjekte: 1ml Zellsuspension mit 152.000 Zellen/ml werden auf Glasträger eingesät und minimal 4 Stunden im CO₂-Brutschrank kultiviert. Die bewachsenen Glasträger werden unmittelbar vor der Messung in eine POC-Kammer eingespannt und mit 1ml HBS pH 7,4 (Angaben in mM: NaCl 140, CaCl₂ 2, KCl 4, MgCl₂ 2, HEPES 10, Glucose 10 in Tridest H₂O) überschichtet.

Folgende Meßbedingungen werden eingehalten: die Objekttemperierung im Meßzeitraum beträgt T=37°C; die Messung am Laser Raster Mikroskop erfolgt bei $\lambda_{\text{Exzitation}}$ =365nm, $\lambda_{\text{Emission}}$ ≥397nm; die HPLC-Auftrennung und Identifikation der Fluoreszenz von AMC im abgenommenen Medium wird an einer RP-18-Säule bei $\lambda_{\text{Exzitation}}$ =340nm, $\lambda_{\text{Emission}}$ ≥440nm durchgeführt. Kontrollmessungen erfolgen mit 20µl DMSO ohne Inhibitor. Angegeben sind die Endkonzentrationen im Medium.

Die Mediumprobe für die Untersuchung mit Hilfe der HPLC wird nach Ablauf der 20minütigen Inkubation, also nach 22,5min Inkubation mit Peptidsubstrat abgenommen und unmittelbar auf hydrolytisch freigesetztes AMC untersucht. Das restliche Medium wird eingefroren und steht für Kontrollmessungen zur Verfügung.

Inkubation	Inhibitor [µM]	Ca [mM]	Substrat [µM]	Meßpunkt =
[min]	+ 2% DMSO			Bild-Nr.
7,5	100	2		
2,5	100	2		1-5
2,5	100	2	20	6-10
20	100	2	20	C _{end(AMC)} , HPLC

Tabelle 26: Meßschema am LSM; Aufnahmefrequenz 2 Bilder/min; Inkubationsmedium HBSpH 7,4; für die Substratzugabe wurde in der Pause zwischen Bild 5 und 6 Medium abgesaugt,konzentriertesSubstratbeigemischtundindieMeßzellezurückgegeben.



Abbildung 16: Bildsequenz von Diagramm 25, S.45 (Kontrollreaktion ohne Inhibitor); Auflösung 512x512 Pixel, 256 Graustufen, Rasterzeit = 8sec/Bild, Zugabe von Substrat unmittelbar nach Bild 5 (von links nach rechts und oben nach unten); in der Bildsequenz werden per Computerprogramm Helligkeitsdifferenzen in 9 ausgewählten Zellen ausgewertet



Diagramm 25: Spontane intrazelluläre Fluoreszenzentwicklung nach Inkubation mit 20µM Peptidsubstrat BLMM; Kontrollreaktion *ohne Inhibitor*; Mittelwert und Standardabweichung von 9 Einzelmessungen einer Bildsequenz im LSM (siehe S. 44, Abbildung 16)



Diagramm 26: HPLC-Fluoreszenz-Kontrolle der Hydrolyse von 20µM BLMM *ohne Inhibitor*, Reaktionszeit der Hydrolyse durch die Zellen = 22,5min, Fläche bei der Laufzeit t=5min: AMC, Fläche bei t=7min: BLMM, 1 Flächeneinheit $\approx 0.25 \times 10^{-12}$ mol AMC bzw. $\approx 8.81 \times 10^{-12}$ mol BLMM



Diagramm 27: HPLC-Fluoreszenz-Kontolle von 20µM BLMM ohne Hydrolyse,

Bei der Hydrolyse von Boc-Leu-Met-AMC in Abwesenheit von Inhibitoren entstehen innerhalb von 25 Minuten 141,2 Flächeneinheiten AMC, das entspricht $35,3 \times 10^{-12}$ mol/10µl Injektion = $3,53 \times 10^{-9}$ mol/ml

(100 Flächeneinheiten $\approx 25 \times 10^{-12}$ mol AMC, siehe S.24 f.).

Inhibitor	Freigesetztes	Freigesetztes	Detektierbares
	AMC [10 ⁻¹² mol]	AMC [%]	BLMM [10 ⁻¹² mol]
Kontrolle ohne Zellen	0,075	0,2	200
Kontrolle ohne Inhibitor	35,29	100	32,6
Calpain-Inhibitor I	1,18	3,3	78,4
Calpain-Inhibitor II	5,23	14,8	81,2
Calpeptin	0,18	0,5	60,9
E-64	33,73	95,6	35,5
E-64d, EST	0,87	2,4	123,1
p-Chlormercuribenzoat	3,56	10,1	83,2
Pepstatin	13,33	37,2	61,6
Z-Leu-Tyr-Chlor-	0,37	1	109,7
methylketon			

Tabelle 17: Hydrolytische Freisetzung von AMC durch Linsenepithelzellen unter dem Einfluß von Protease-Inhibitoren nach 22,5 Minuten Inkubation mit dem Peptidsubstrat BLMM



Diagramm 28: Prozentuale Freisetzung von AMC in Gegenwart von Inhibitoren bei der Hydrolyse von BLMM durch Linsenepithelzellen

BLMM wird durch die untersuchten Protease-Inhibitoren mit Ausnahme von E-64 gehemmt. E-64 ist ein sehr guter Inhibitor *in vitro*, der offensichtlich nicht membranpermeabel ist. Im Gegensatz dazu steht das Resultat mit EST, E-64d, ein in seiner Struktur und Wirkung ähnliches Molekül, welches Membranen passieren kann. Da die Umsatzrate bei E-64 nahezu identisch mit der des Kontrollversuches ist, kann geschlossen werden, daß an der Außenseite der Zellmembran keine Ektoprotease existiert, die BLMM spaltet (siehe auch den Umsatz von SLLVYM S.39 ff.).

2.1.2.5 Beeinflussung der Konzentration frei verfügbarer Calciumionen in Linsenepithelzellen

Im Vorfeld der Beschreibung einer cytosolischen calciumabhängigen Protease ist es erforderlich zu untersuchen, auf welche Weise der Ca²⁺-Haushalt *in vivo* auf definierte extrazelluläre Reize reagiert und ob die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration gesteuert werden kann.

Ionophoren wie Ionomycin und Calcimycin gestatten es, die Membranen der Zelle selektiv für Metallionen, speziell für Ca²⁺ zu permeabilisieren (siehe S.26). Diese Eigenschaft wird genutzt, um die Ca²⁺-Konzentration intrazellulär einzustellen, mit dem Ziel, eine Ca²⁺-stimulierbare Proteolyse *in vivo* zu beeinflussen und nachzuweisen.

1. Charakterisieren des nicht durch lonophoren gestörten intrazellulären Calciumhaushaltes

Methode

Vorbereitung der Untersuchungsobjekte: 1ml Zellsuspension wird auf Glasträger eingesät und minimal 4 Stunden im CO_2 -Brutschrank kultiviert.² Danach werden die bewachsenen Glasträger bei 37°C 30min mit Fluo-3 1µM/FuraRed 2µM und 3µl/ml Pluronic (20% in DMSO) in HBS(14), anschließend 60min in HBS ohne Farbstoff inkubiert. Unmittelbar vor der Messung spannt man die Glasträger in POC-Kammern und überschichtet mit 1ml HBS pH 7,4.

Folgende Meßbedingungen werden eingehalten: die Objekttemperierung im Meßzeitraum beträgt T=37°C; die Messung am Laser Raster Mikroskop erfolgt bei $\lambda_{\text{Exzitation}}$ =488nm, $\lambda_{\text{Emission}}$ =515-545nm für Fluo-3 und ≥590nm für FuraRed.

Inkubationszeit	Ca [mM]	EDTA [mM]	Meßpunkt = Bild Nr
[11111]			DIIU-INI.
7,5	2		
2,5	2		1-5
2,5		2	6-10
2,5	2		11-15
2,5		2	16-20

Tabelle 38: Schema der Untersuchung der intrazellulären Calciumionenkonzentration in Linsenepithelzellen; Meßfrequenz: 2 Bilder/min; extrazelluläres Milieu: HBS pH 7,4 + Ca²⁺ oder EDTA, das Medium wird nach jeweils 5 Bildern ausgewechselt

Ergebnis

Siehe Diagramm 29 Seite 48: Die Linsenepithelzellen reagieren auf Calciumentzug durch EDTA sowie auch auf nachfolgende Ca²⁺-Zufuhr im externen Milieu jeweils mit einer kurzzeitigen Ca²⁺-Erhöhung intrazellulär. Nach ca. 2,5 Minuten hat die Fluoreszenz, d.h. die intrazelluläre freie Ca²⁺-Konzentration, wieder Ausgangsniveau erreicht.

2. Charakterisieren des intrazellulären Calciumhaushaltes, entkoppelt durch das lonophor lonomycin

Methode

Der Versuchsablauf ist identisch zum vorhergehenden Abschnitt, bis auf die Tatsache, daß die HBS-Pufferlösung neben EDTA oder Ca²⁺-Ionen 30 μ M Ionomycin enthält (siehe Diagramm 30).

² Angaben A. Thate

Nach Ionomycin-Einfluß scheinen die Zellen nicht mehr in der Lage zu sein, den intrazellulären Calciumhaushalt zu regulieren. Dies ist deutlich an dem völlig veränderten Einschwingverhalten der Kurve bei gleichzeitiger Inkubation von Ca²⁺ und Ionomycin im Vergleich zu Diagramm 1 zu sehen. Die Zellen haben offensichtlich keine Möglichkeit mehr, von intrazellulären Stores Ca²⁺-Ionen abzurufen oder sich gegen ein Übermaß an einströmenden Ca²⁺-Ionen zu verschließen. Es besteht damit die Möglichkeit, die intrazelluläre Calciumionenkonzentration auf das Niveau der vorgegebenen extrazellulären Konzentration mit Hilfe von Ionomycin einzustellen. Etwa 2,5min nach dem Wechsel der Calciumkonzentration des umgebenden Mediums ist die Konzentration innerhalb der Zellen stabil. Diese Latenzzeit wird bei nachfolgenden Versuchen berücksichtigt.



Diagramm 29: Änderung der Ca²⁺-abhängigen Fluoreszenz intrazellulär nach sprunghafter Änderung der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration, Mittelwert und Standardabweichung über 10 einzelne Zellen gemessen



Diagramm 30: Einfluß des lonophors lonomycin auf die Änderung der Ca²⁺-abhängigen Fluoreszenz intrazellulär nach sprunghafter Änderung der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration, Mittelwert und Standardabweichung über 10 Einzelzellmessungen;

Die Latenzzeit zwischen sprunghafter Änderung der Calciumionenkonzentration und intrazellulärem Einschwingen wird bei nachfolgenden Versuchen berücksichtigt.

2.1.2.6 Calciumabhängigkeit der Hydrolyse von Peptidsubstraten in Linsenepithelzellen

Die Calciumkonzentration kann intrazellulär mit Hilfe von Ionomycin auf das Niveau an Ca^{2+} -Ionen im Inkubationsmedium eingestellt werden (siehe S.47 f.). Darauf aufbauend wird die calciumabhängige Proteolyse in Linsenepithelzellen untersucht.

3. Proteolyse in Linsenepithelzellen ohne Einfluß von lonomycin

Methode

Vorbereitung der Untersuchungsobjekte: 1ml Zellsuspension mit 115.000 Zellen/ml werden auf Glasträger eingesät und minimal 4 Stunden im CO_2 -Brutschrank kultiviert.³ Die bewachsenen Glasträger werden unmittelbar vor der Messung in eine POC-Kammer eingespannt und mit 1ml HBS pH 7,4 überschichtet.

Folgende Standardmeßbedingungen werden eingehalten: die Objekttemperierung im Meßzeitraum beträgt T=37°C; die Messung am Laser-Raster-Mikroskop erfolgt bei $\lambda_{Exzitation}$ =365nm, $\lambda_{Emission}$ ≥397nm; die HPLC-Auftrennung einer Mediumprobe wird unter Verwendung einer RP-18-Säule durchgeführt und AMC wird durch Fluoreszenz bei $\lambda_{Exzitation}$ =340nm, $\lambda_{Emission}$ ≥440nm identifiziert.

Inkubation [min]	Ionomycin [µM]	Ca _i [mM]		Substrat [µM]	Meßpunkt = Bild-Nr.
2,5			2		
2,5	0		2		1-5
2,5	0		2	20	6-10
2,5	0		2	20	11-15
20	0		2	20	Cend(AMC), HPLC

Tabelle 19: Meßschema zur Untersuchung der Calciumionen-Abhängigkeit der Hydrolyse von BLMM in Linsenepithelzellen; Meßfrequenz = 0,5 min pro Bild; extrazelluläres Milieu: HBS pH 7,4, Zusätze ; das Medium wird nach Bild 5 ausgewechselt, nach Bild 10 zur Kontrolle des Spüleinflusses abgesaugt und wieder zurückgegeben; $C_{end(AMC)}$ =Bestimmung der Konzentration von proteolytisch freigesetztem AMC nach 25 Minuten nkubation



Diagramm 31: Intrazelluläre Fluoreszenzentwicklung durch Hydrolyse des Peptidsubstrates BLMM; *Kontrollreaktion ohne lonomycin*; Mittelwert und Standardabweichung von 9 Einzelmessungen am Laser Raster Mikroskop (siehe Beispiel S. 44 Abbildung 16)

³ Angaben A. Thate

Von den Peptidsubstraten, die im Abschnitt 2.1.2.2 (siehe S. 40 f.) getestet worden sind, wird Boc-Leu-Met-AMC für die Versuche ausgewählt. Das Substrat wird von Calpain hydrolysiert, und der freigesetzte fluoreszierende AMC-Rest ermöglicht nach einer Probenauftrennung durch die HPLC die Quantifizierung der Proteolyse (siehe S. 25). Es ist in ausreichender Menge verfügbar, da es selbst synthetisiert worden ist (siehe S.14 ff.).



Diagramm 32: HPLC-Trennung und Identifikation der Fluoreszenz von 20 µM Boc-Leu-Met-AMC in Tris-HCl pH 7,4; *Kontrollreaktion ohne Zellen*, Doppelbestimmung, RP-18, ACN/H₂O 3/1, 1ml/min



Diagramm 33: HPLC-Trennung und Identifikation der Fluoreszenz im Überstand nach 25 min Inkubation von Linsenepithelzellen mit 20 µM Boc-Leu-Met-AMC; *Kontrollreaktion ohne lonomycin*; Zellzahl 115000 ml⁻¹, 1 ml Zellsuspension (siehe auch S. 25 Diagramme 14, 15, S. 45 Diagramme 26, 27), Doppelbestimmung

4. Proteolyse in Linsenepithelzellen unter Einwirkung von lonomycin

Methode

Die Messung erfolgt identisch zur Methode in Punkt 1 (siehe S. 49) mit dem Zusatz von Ionomycin bei einer Calciumkonzentration von 2mM bzw. 0mM (2mM EDTA) im Inkubationsmedium.

Inkubation [min]	Ionomycin [µM]	Ca oder [mM]	EDTA	Substrat [µM]	Meßpunkt = Bild-Nr.
2,5			2		
2,5	30		2		1-5
2,5	30		2	20	6-10
2,5	30		2	20	11-15
20	30		2	20	C _{end(AMC)} , HPLC

Tabelle 20: Meßschema zur Untersuchung der Calciumionen-Abhängigkeit der Hydrolyse von BLMM in Linsenepithelzellen; Meßfrequenz = 0,5 min pro Bild; extrazelluläres Milieu: HBS pH 7,4; Zusätze (siehe Tabelle)



Diagramm 34: Intrazelluläre Fluoreszenzentwicklung durch Proteolyse des Peptidsubstrates BLMM; Reaktion in Gegenwart von 30µM Ionomycin und 2mM EDTA; Mittelwert und Standardabweichung von 9 Einzelmessungen am LSM



Diagramm 35: Intrazelluläre Fluoreszenzentwicklung durch Proteolyse des Peptidsubstrates BLMM; Reaktion mit 30µM Ionomycin und 2mM Ca²⁺; Mittelwert und Standardabweichung von 9 Einzelmessungen am LSM



Diagramm 36: relative Fluoreszenzentwicklung als Maß der proteolytischen Aktivität in Linsenepithelzellen, bestimmt aus der durch die HPLC detektierten Fluoreszenz von AMC nach einer Inkubationszeit von 25 min mit dem Substrat BLMM

Der Kontrollversuch der Proteolyse ohne Ionomycin zeigt den erwarteten spontanen intrazellulären Umsatz mit logarithmischem Verlauf (siehe auch S. 49 Diagramm 31). Dies wird durch die HPLC-Bestimmung des freigesetzten AMC-Restes bestätigt (Diagramm 32, 33). Wird die Ca2+-Konzentration durch EDTA und intrazellulär auf Minimum abgesenkt. Ionomycin ein reagieren die Linsenepithelzellen mit einem höheren Umsatz des Substrates innerhalb der ersten 5 Minuten (Diagramm 34) im Vergleich zum Kontrollversuch (Diagramm 31). Die intrazelluläre Ca2+-Konzentration von 2 mM (Inkubation mit Ionomycin und 2mM Ca²⁺ in HBS) führt dagegen überraschend zu einer Hemmung der Proteolyse (Diagramm 35).

Bei der "Langzeitinkubation" von 25 Minuten mit BLMM, Ionomycin und Ca²⁺ werden die Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Ionomycin deutlich (>90%) in ihrer hydrolytischen Aktivität gehemmt (Diagramm 36). Dies bestätigt die Untersuchungsergebnisse am LSM. Die Inkubation mit BLMM, Ionomycin und EDTA führt zu einer 50%igen Hydrolyserate und ist damit um den Faktor 5 höher als in Gegenwart von Ca²⁺. Sie ist allerdings auch um 50% niedriger als bei der Kontrolle ohne Ionomycin.

5. Einfluß des Peptidsubstrates Boc-Leu-Met-AMC auf die durch lonomycin entkoppelte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in Linsenepithelzellen und Vergleich der proteolytischen Umsätze bei hoher und niedriger Ca²⁺-Konzentration

Methode

Der Versuchsablauf ist identisch zum vorhergehenden Abschnitt. Es wird zur HBS-Pufferlösung 30 μ M Ionomycin, EGTA oder Ca²⁺-Ionen das Peptidsubstrat gegeben (siehe Diagramm 34, 35). Nach der Messung am LSM werden die Zellen noch 17,5 Minuten weiterinkubiert. Danach wird das Medium abgenommen und eine Probe von 20 μ l in der HPLC auf freigesetztes AMC untersucht (siehe dazu auch S. 25, 44 f.)

Inkubationszeit	Ionomycin	Ca ²⁺	$Ca^{2+} \ oder$	EGTA	Peptidsubstrat	Meßpunkt
[min]	[µM]	[mM]	[mM]		BLMM [µM]	(Bild-Nr.)
2		2				1-5
2,5	30			2		6-10
2,5	30			2	20	11-15
17,5	30			2	20	Cend(AMC)
						HPLC

Tabelle 21: Schema zur Untersuchung des Einflusses des Peptidsubstrates BLMM auf die intrazelluläre Calciumionenkonzentration in Linsenepithelzellen; Meßfrequenz: 2 Bilder/min; extrazelluläres Milieu: HBS pH 7,4, das Medium wird nach Bild 5 ausgewechselt, nach Bild 10 wird das Substrat BLMM zugemischt und 20 Minuten inkubiert

Ergebnis

Nach 2,5 Minuten Inkubation mit Ionomycin haben die Linsenepithelzellen in Abhängigkeit von der Calciumionenkonzentration im Inkubationsmedium eine hohe oder niedrige intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration. Diese wird vom Peptidsubstrat Boc-Leu-Met-AMC nicht in nennenswerter Weise beeinflußt. Die Auswertung des hydrolytischen Abbaus vom Peptidsubstrat erbringt folgendes Resultat: Bei einer hohen Ca²⁺-Konzentration in Linsenepithelzellen ist die hydrolytische AMC-Freisetzung nur ca. 20% im Vergleich zum Umsatz bei niedriger Ca²⁺-Konzentration. Dieses Ergebnis ist die Ausgangsposition für die Untersuchungen im nachfolgenden Abschnitt.



Diagramm 37: Einfluß des Peptidsubstrates BLMM auf die Calciumionenkonzentration in Linsenepithelzellen. Die Zellen wurden dazu wie im vorhergehenden Abschnitt behandelt. Die Einschwingphase für eine konstante intrazelluläre Calciumionenkonzentration bei lonomycininkubation von 2,5 Minuten wird abgewartet (siehe Diagramme 29, 30), danach wird das Peptidsubstrat zugemischt. Diese Zugabe beeinflußt die durch lonomycin gestörte Calciumionenkonzentration nicht nennenswert. Mittelwert von Messungen an 10 Zellen im LSM



Diagramm 38: Auswertung der hydrolytischen Freisetzung von AMC nach 20 Minuten Inkubation der Linsenepithelzellen mit 30µM Ionomycin, 2mM EGTA oder Ca²⁺ und dem **Peptidsubstrat Boc-Leu-Met-AMC in HBS pH 7,4.** Die Konzentration von 2mM Ca²⁺ wirkt inhibierend auf die Zellen im Vergleich zum Calciumionenentzug durch EGTA.

2.1.2.7 Kombination von Zeitabhängigkeit und Calciumabhängigkeit der Hydrolyse von Peptidsubstraten in Linsenepithelzellen

Nach der statischen Messung der Calciumabhängigkeit soll in diesem Versuch gezeigt werden, ob sich der Einfluß von Ca²⁺ und EGTA unter der Einwirkung von Ionomycin auf Linsenepithelzellen dynamisch ändert. Weiterhin soll geklärt werden, ob die Reaktion der Zellen auf EDTA oder EGTA unterschiedlich ausfällt.

1. Verlauf des Substratumsatzes innerhalb eines Meßzeitraumes von 30 Minuten bei einer Vorinkubation mit Ionomycin und Ca²⁺ oder EGTA von 2,5 Minuten

Ziel dieses Versuches ist die Bestätigung der Ergebnisse des Versuches 2. (siehe S. 50) und die Darstellung der Zeitabhängigkeit des proteolytischen Umsatzes von BLMM.

Methode

Vorbereitung der Untersuchungsobjekte: 1ml Zellsuspension mit 100.000 Zellen/ml werden in Kunststoffpetrischalen eingesät und minimal 4 Stunden im CO_2 -Brutschrank kultiviert. Das Medium der bewachsenen Inkubationsbehälter wird vor der Messung gegen 1ml HBS pH 7,4 ausgetauscht.

Die Standardmeßbedingungen (siehe S. 49) werden eingehalten.

Inkubation [min]	Ionomycin [µM]	Ca oder [mM]	EGTA	Substrat [µM]	Probeentnahme nach t [min]
2,5	30		2		
30	30		2	20	$3^{1}/_{2}$, 7, 15, 23, 30

Tabelle 22: Meßschema zur Untersuchung des Verlaufes der Hydrolyse von BLMM in Linsenepithelzellen; extrazelluläres Milieu: HBS pH 7,4; Zusätze; eine Mediumprobe von 20µl wird nach den angegebenen Zeiten entnommen und nach Auftrennung durch die HPLC wird freigesetztes AMC durch Messung der Fluoreszenz quantifiziert.



Diagramm 39: Verlauf der intrazellulären Proteolyse von 20 μ M BLMM unter dem Einfluß von 30 μ M lonomycin und 2mM Ca²⁺ oder 2mM EGTA; eingezeichnete Geraden sind lineare Trendlinien

Der Einsatz von EGTA statt EDTA bringt unter den Versuchsbedingungen ebenfalls zu jedem untersuchten Meßzeitpunkt eine deutlich erhöhte Proteolyserate gegenüber jener bei hoher intrazellulärer Calciumionenkonzentration. 2mM EGTA im Inkubationsmedium führen zu einer vergleichbar hohen Proteolyserate, wie die Kontrolle ohne Ionomycin. Weiterhin ist über den Zeitraum von 30 Minuten bei keiner Messung ein Abfall der proteolytischen Aktivität zu beobachten. Die Proteolyse von BLMM verläuft offensichtlich linear.

2. Substratumsatz nach unterschiedlich langer Vorinkubation mit Ionomycin und Ca²⁺ oder EDTA ohne Proteasesubstrat

Ziel dieses Versuches ist der Nachweis, ob eine Vorinkubation der Linsenepithelzellen ohne Proteasesubstrat aber mit Ionomycin und EDTA oder Ca²⁺ zur Hemmung oder Aktivierung einer nachfolgenden Proteolyse von BLMM führt.

Methode

Vorbereitung der Untersuchungsobjekte: 1ml Zellsuspension mit 80.000 Zellen/ml werden auf Glasträger eingesät und minimal 4 Stunden im CO₂-Brutschrank kultiviert. Die bewachsenen Glasträger werden unmittelbar vor der Messung in eine POC-Kammer eingespannt und mit 1ml HBS pH 7,4 überschichtet. Die Standardmeßbedingungen (siehe S. 49) werden eingehalten.

Inkubation [min]	Ionomycin [µM]	Ca oder EDTA [mM]	Substrat [µM]	Meßpunkt = Bild- Nr.
2,5 (10)	30	2		
2,5	30	2		1-5
2,5	30	2	20	6-10
20	30	2	20	C _{end(AMC)} , HPLC





Diagramm 40, 41: Proteolytische Freisetzung von AMC bei der Inkubation von Linsenepithelzellen mit BLMM nach 2,5 oder 10 Minuten Vorinkubation mit 30μ M Ionomycin und 2mM Ca²⁺ oder 2mM EDTA.

Ergebnis

Der proteolytische Abbau von Boc-Leu-Met-AMC *in vivo* wird durch 2mM Ca²⁺ gehemmt verglichen mit EDTA (17% Umsatz bei 2,5min und 7,2% Umsatz bei 10min Vorinkubation mit Ca²⁺; siehe auch S.50 ff.).

10 Minuten Inkubation mit Ca²⁺ oder EDTA ohne Proteasesubstrat führen zu einem Rückgang der Freisetzung von AMC durch Hydrolyse um etwa den gleichen Prozentsatz von ca. 60%.

3. Substratumsatz nach unterschiedlich langen Vorinkubationszeiten mit lonomycin und EDTA ohne Proteasesubstrat

Ziel dieses Experimentes ist die Verifizierung des vorhergehenden Versuches. Dabei soll die Veränderung der proteolytischen Aktivität nach wachsender Vorinkubationszeit mit Ionomycin und EDTA ohne Proteasesubstrat näher betrachtet werden.

Methode

Vorbereitung der Untersuchungsobjekte: 1ml Zellsuspension mit 26.500 Zellen/ml werden auf Glasträger eingesät und minimal 4 Stunden im CO₂-Brutschrank kultiviert. Die bewachsenen Glasträger werden unmittelbar vor der Messung in eine POC-Kammer eingespannt und mit 1ml HBS pH 7,4 überschichtet.

Inkubation	Ionomycin	EDTA	Substrat	Meßpunkt = Bild-
[min]	[µM]	[mM]	[µM]	Nr.
0; 0,5; 1; 2;	30	2		
5; 10				
20	30	2	20	C _{end(AMC)} , HPLC

Die Standardmeßbedingungen (siehe S. 49) werden eingehalten.

Tabelle 24: Schema für die Untersuchung des Substratumsatzes von BLMM nach ansteigenden Vorinkubationzeiten mit Ionomycin und EDTA ohne Proteasesubstrat; extrazelluläres Milieu:



HBS pH 7,4

Diagramm 42: Untersuchung des Substratumsatzes von BLMM nach ansteigenden Vorinkubationzeiten mit Ionomycin und EDTA ohne Proteasesubstrat; Kontrolle t=0 mit 100%; extrazelluläres Milieu: HBS pH 7,4; 20 Minuten Inkubation der Linsenepithelzellen mit Substrat und anschließende Quantifizierung des Umsatzes durch die HPLC

Ergebnis

Dieses Experiment stützt die Ergebnisse von Experiment 2. (siehe S. 55). Die Proteolyserate von BLMM steigt bis ca. 5 Minuten Vorinkubation bei Calciumionenentzug, ist dann aber nach 10 Minuten wieder gefallen.

4. Substratumsatz in Gegenwart von lonomycin und mit kurzzeitigem Wechsel von Ca 2* und EDTA

Bei der Inkubation der Linsenepithelzellen mit Ionomycin und hoher Calciumkonzentration kommt es zu einer Hemmung der Proteolyse von BLMM. Diese Hemmung bleibt bestehen, wenn man die Inkubationszeiten verändert, aber auch, wenn eine Vorinkubation ohne Proteasesubstrat eingeschoben wird. Ziel dieses Versuches ist zu zeigen, daß die Protease nach Hemmung mit Ca²⁺ wieder aktiviert werden kann bzw. daß nach Aktivierung durch Calciumentzug (EDTA) bei einer nachfolgenden Ca²⁺-Zufuhr erneut eine Hemmung eintritt.

Methode

Vorbereitete Linsenepithelzellen (152.500 Zellen/ml, 1ml Zellsuspension auf Glasträger eingesät; bewachsene Glasträger werden unmittelbar vor der Messung mit 1ml HBS pH 7,4 überschichtet; Standardmeßbedingungen siehe S. 49 werden eingehalten.) werden wie folgt untersucht:

Kontrolle	10min		Ca^{2+}	
	20min		Ca^{2+}	BLMM
Ca ohne Wechsel	10min	Ionomycin +	Ca ²⁺	
	20min	Ionomycin +	Ca^{2+}	BLMM
EDTA ohne Wechsel	10min	Ionomycin +	EDTA	
	20min	Ionomycin +	EDTA	BLMM
Ca-EDTA-CA	7,5min	Ionomycin +	Ca^{2+}	
	2,5min	Ionomycin +	EDTA	
	20min	Ionomycin +	Ca^{2+}	BLMM
EDTA-Ca-EDTA	7,5min	Ionomycin +	EDTA	
	2,5min	Ionomycin +	Ca^{2+}	
	20min	Ionomycin +	EDTA	BLMM

Tabelle 25: Inkubationsschema für die Untersuchung der proteolytischen Aktivität nach einem kurzzeitigen Wechsel der Calciumionenkonzentration in Linsenepithelzellen; 30µM Ionomycin, 2mM Ca²⁺, 2mM EDTA, 20µM BLMM, in HBS pH 7,4 als Inkubationsmedium



Diagramm 43: Freisetzung von AMC bei der Inkubation von Linsenepithelzellen mit BLMM bei 10 Minuten Vorinkubation, davon 7,5 Minuten mit 30µM Ionomycin + 2mM Ca²⁺ oder 2mM EDTA, dann 2,5 Minuten Wechsel der Ionenkonzentration; nachfolgend 20 Minuten Inkubation mit Ausgangsionenkonzentration und Substrat BLMM; Auswertung von HPLC-Messungen

Ergebnis

Es zeigt sich, daß die höchste hydrolytische Aktivität gegenüber BLMM von den Zellen ausgeht, die nur mit EDTA und Ionomycin inkubiert waren. Ein Wechsel der Verhältnisse des Calciumangebotes, d.h. eine einmalige Anhebung der intrazellulären Calciumkonzentration führt zu einer Abnahme der proteolytischen Aktivität. Umgekehrt führt eine kurzzeitige Erniedrigung der intrazellulären Calciumionenkonzentration zu einem deutlichen Anstieg der proteolytischen Aktivität.

Bei diesem wie auch in den vorhergehenden Versuchen zeigt sich, daß eine proteolytische Aktivität gegenüber BLMM spontan aktiv ist. Ihr Wirkoptimum liegt offensichtlich bei einer sehr niedrigen cytosolischen Calciumionenkonzentration, was aus den Aktivitäten ohne Ionomycin (Kontrollen) und Ionomycin+EDTA/EGTA geschlossen werden kann. Unphysiologisch hohe cytosolische Konzentrationen von 2mM Ca²⁺ führen dagegen zu einer Hemmung der Protease. Sie läßt sich offensichtlich auch durch einen Wechsel der cytosolischen Calciumionenkonzentration beeinflussen.

Die Versuche von 2.1.2.5 und 2.1.2.6 zusammengefaßt belegen, daß bei hoher cytosolischer Calciumkonzentration die beobachtete hydrolytische Aktivität gegen das Calpainsubstrat weniger als 20% verglichen mit der gleichlangen Einwirkung einer niedrigen Calciumkonzentration beträgt (Diagramm 36-39). Dies bedeutet, daß in Linsenepithelzellen offensichtlich eine durch Calciumionen zu hemmende proteolytische Aktivität existiert. Eine solche Aktivität ist bisher nicht bekannt.

Die Tatsache, daß beide Aktivitäten, bei viel und bei wenig Calciumionen nach langer *Vorinkubation ohne Substrat* (Diagramm 38, 39) prozentual den gleichen Betrag im Vergleich zur kurzen Inkubation abgenommen haben, deutet darauf hin, daß bei dieser Proteolyse noch von Calciumionen unabhängige Prinzipien wirken könnten. Die proteolytische Aktivität hat bei diesem Versuch eine Halbwertszeit.

Obwohl die Protease durch hohe Calciumionenkonzentration im Cytosol gehemmt wird, gibt es Hinweise dafür, daß es sich dennoch um Calpain handeln könnte: es werden Calpainsubstrate umgesetzt, der Umsatz wird durch bekannte Calpaininhibitoren gehemmt, die Aktivität befindet sich im Cytosol (Inhibitortest E-64, Umsatz von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC), sie ist calciumabhängig und wahrscheinlich über Calciumionen steuerbar und es gibt scheinbar bei Streß (Mangel an verfügbarem Substrat und gestörtem Ionenmilieu) eine Abnahme der Aktivität. Autoproteolyse, in vitro nachgewiesen, kommt dafür als eine Ursache in Betracht. Selbst die Hemmung von Calpain bei hoher Calciumionenkonzentration ist unter Berücksichtigung der Wirkung von Calpastatin, dem endogenen Inhibitor, erklärbar (siehe S. 30).

2.2 Untersuchungen zur Struktur von Calpain

2.2.1 Hochauflösende Darstellung von Calpain mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (Atomic force microscopy)

2.2.1.1 Kurze Einführung

Für eine hochauflösende Darstellung von Calpain und Cytoskelett bis in den Bereich der Auflösung einzelner Moleküle ist die Rasterkraftmikroskopie mit freundlicher Unterstützung von U.Bakowski angewendet worden.

Rasterkraftmikroskopie: Es handelt sich hierbei um ein nichtoptisches Meßverfahren, bei dem das in X-Y-Richtung zeilenförmig bewegte Objekt von einem Cantilever, ein schwingender Hebel mit sehr harter, möglichst einatomarer Spitze rasterförmig in Z-Richtung abgetastet wird. Im Kontakt-Modus mit ca. 10⁻⁸N Auflagekraft können die Höhe (vertikale Auslenkung) und die Reibung (Torsion) gemessen werden. Die Torsion des Cantilever resultiert aus der kontinuierlichen X-Y-Bewegung des Objektes in Verbindung mit einer materialspezifischen Haftreibung an der Tastspitze.

Objektträger für die Rasterkraftmikroskopie: In den beschriebenen Versuchen kommen Scheiben aus Reinstsilicium und Deckgläschen zum Einsatz. Die Siliciumplättchen haben eine sehr geringe Oberflächenrauhigkeit.

Der Randwinkel für Wasser ist ein Maß der Benetzbarkeit von festen Oberflächen. Es ist eine Möglichkeit, die Hydrophobizität fester Oberflächen auszudrücken.

Sehr hydrophil sind Winkel von <30° (z.B. reines Gold, hydrophilisiertes Silicium), sehr hydrophob dagegen Werte >90° (z.B. Oberflächen mit adsorbierten Alkanen; nach Abspalten von sich spontan bildenden Oxiden an Oberflächen - meist durch HF).

Die für die AFM-Mikroskopie verwendeten Silicium-Plättchen besitzen einen Randwinkel von ca. 40° - statistisch überwiegen die hydrophilen Eigenschaften. Diese werden durch OH-Gruppen vermittelt, welche sich nach spontaner Oxidation an der Siliciumoberfläche ausbilden.

2.2.1.2 Dimensionen eines Einzelmoleküls

Methode

Chromatographisch gereinigtes m-Calpain (siehe S. 8 ff.) wird mit einem NaCl-Gradienten nochmals über eine Resource Q-Säule (HPLC) eluiert und so von anderen Bestandteilen der Probe abgetrennt. m-Calpain adsorbiert aus verdünnter Pufferlösung an Silicium-Objektträger (hochreines Si) innerhalb weniger Sekunden und kann nach wenigen Minuten Lufttrocknung am Rasterkraftmikroskop untersucht werden.



Abbildung 17: Darstellung von isoliertem m-Calpain aus Rinderherz im AFM

- 1 Calpain, adsorbiert an hochreines Silicium, 10x10µm²
- 2 Ausschnitt von oben links, 2,5x2,5µm²
- 3 Ausschnitt von oben rechts ca.1x1µm², Meßgrafik und Dimensionen eines Einzelpartikels

Kapitel 2: Untersuchungsmethoden und Ergebnisse



Abbildung 18: Darstellung einzelner m-Calpainpartikel und Größenmessung

1, 2 Darstellungen von Calpain-Einzelpartikeln als Relief

3 Ausschnitt ca. 0,2x0,2µm², Meßgrafik und Dimensionen einer Domäne

Ergebnis

Calpain-Partikel adhärieren sehr gut an Siliciumoberflächen. Die Lösungen, aus denen heraus die Adsorption erfolgt, sind verdünne Fraktionen aus der HPLC-Reinigung. Verdünnen ist notwendig, damit Moleküle einzeln sichtbar werden.

Die Ausdehnung eines Calpainpartikels beträgt ca. 40nm. Es ist bohnenförmig mit 2-4 kugelartigen Abschnitten von ca. 20nm Durchmesser.

2.2.1.3 Selbstorganisation des Calpain

Zu Beginn einer AFM-Sitzung fiel das Mikroskop aus, so daß zu einem späteren Zeitpunkt (nach einer Woche) die Messung fortgesetzt werden konnte. Die lufttrockenen Proben wurden in dieser Zeit bei -20° C aufbewahrt. Einige Aufnahmen konnten vor dem Ausfall angefertigt werden und mit denen, die später entstanden verglichen werden.

Methode

Auf Siliciumobjektträgern adsorbierte luftgetrocknete m-Calpainproben werden eine Woche bei –20°C aufbewahrt und anschließend am AFM ausgewertet.



Kapitel 2: Untersuchungsmethoden und Ergebnisse



Abbildung 20: Selbstorganisation von m-Calpain auf Siliciumträger 1 Meßgrafik und Dimensionen an einer fadenförmigen Aggregation von Calpain, 15x15µm² 2 Ausschnitt von *oben*, 7,5x7,5µm²

3 Ausschnitt von unten links, 4x4µm²

Ergebnis

m-Calpainpartikel, an Siliciumoberflächen adsorbiert, luftgetrocknet und bei –20°C aufbewahrt, sind nach einer Woche nicht mehr gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt. Es bilden sich helical windende Fäden aus, die lateral adhärieren und offensichtlich als Filamentbündel erscheinen.

2.2.2 Immuncytochemie

2.2.2.1 Immuncytochemischer Nachweis von m-Calpain in Zellen

Der immuncytochemische Nachweis ist eine sehr spezifische "Färbe"-Methode, die sich auf die Beziehung Antigen-Antikörper begründet. Für die Untersuchung stehen polyklonale und monoklonale Seren zur Verfügung. Dem Vorteil der Monospezifität (Erkennung nur eines speziellen Epitopes) und geringer Kreuzreaktivität der monoklonalen Seren stehen als Nachteile gegenüber: hoher Erzeugungs-oder Beschaffungsaufwand, meist sehr gefrierlabil (wichtig für eine verlustarme Lagerung), meist nicht präzipitierend, Ausfall der Immunreaktion, wenn das Epitop maskiert ist. Daraus ergibt sich, daß polyklonale Seren, obwohl nicht monospezifisch bei bestimmten Fragestellungen besser geeignet sind, als monoklonale Seren: sie präzipitieren ihr Antigen, die Immunreaktion wird durch den Ausfall eines Epitopes kaum berührt, sie sind meist preiswert. Für beide Seren können Kreuzreaktionen und unspezifische Reaktionen anhand geeigneter Kontrollversuche ausgeschlossen werden.

In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen werden Zellen zuerst mit Antiserum gegen m-Calpain und danach und mit FITC-Sekundärantiserum inkubiert (Einfachmarkierung). Für bestimmte Fragestellungen erfolgt hernach die Inkubation mit einem zweiten, gegen ein anderes Antigen gerichtetes Antiserum und nachfolgend geeignetem Sekundärantiserum mit anderem Fluoreszenzfarbstoff (Doppelmarkierung). Dabei können zwei unterschiedliche Antigene in einem Objekt sichtbar gemacht werden.

Anders als beim immunologischen Nachweis des extrahierten Antigens (siehe S.35), ist für Zellen oder Gewebe eine Fixierung meist unumgänglich. Eine Beeinträchtigung der Antigenität des Untersuchungsobjektes ist möglich.

Methode:

Versuchsschema : LEC werden nach 5 Minuten Fixieren mit 2% Paraformaldehyd bei 4°C in PBS gespült, das Fixanz mit Glycin abgesättigt, die Zellmembran mit 6-12µg/ml Digitonin perforiert und unspezifische Bindungen durch 0,1% RSA in PBS gehemmt. Es erfolgt die Inkubation mit anti-m-Calpain-Antiserum über Nacht bei 4°C (unverdünnt bis 1:100 verdünnt mit PBS, je nach Anfärbung in Vorversuchen), Spülen mit PBS, 2 Stunden Inkubation mit FITC-Konjugat (Verdünnung 1:50 bis 1:100 mit PBS, nach Angaben des Herstellers und Vorversuchen) bei Raumtemperatur, weiteres Spülen mit PBS und Einbetten mit Aqua-Poly/Mount. 1.1. Kaninchen-anti-m-Calpain, polyklonales Antiserum



Abbildung 21:

Linsenepithelzellen, angefärbt mit Kaninchen-anti-m-Calpain, anti-Kaninchen-FITC, Laser-Scanning-Mikroskop, prim. Vergrösserung 100x, Bildauflösung 1024x1024 1.2. Maus-anti-m-Calpain (1E8), monoklonales Antiserum



Abbildung 22: Linsenepithelzellen, angefärbt mit Maus-antim-Calpain (1E8), anti-Maus-FITC, Laser-Scanning-Mikroskop, prim. Vergrößerung 100x, Bildauflösung 1024x1024, Meßbalken 10µm

Ergebnis

Die Darstellung von Calpain in Linsenepithelzellen vom Rind mit Kaninchenanti-Rinder-m-Calpain-Antiserum (m-Calpain vom Herzmuskel) sowie mit 1E8 (monoklonales Maus-anti-Rinder-m-Calpain-Antiserum, m-Calpain vom Herzmuskel) führt unabhängig voneinander zu fädigen Strukturen. Diese haben Ähnlichkeit mit bekannten Anteilen vom Cytoskelett. In den weiteren Abschnitten werden die Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Tubulin-Anteile des Cytoskelettes mit den Anfärbungen von 1E8 parallel untersucht. Weiterhin wird die Spezifität der Immunantwort dargestellt.

2.2.2.2 Nachweis der Spezifität des monoklonalen Anti-m-Calpain-Antiserums 1E8

Die Spezifität des immunologischen Nachweises von m-Calpain im Westernblot ist beschrieben worden (siehe S.21). Für die gesicherte Darstellung der cytologischen Ergebnisse ist es notwendig, den Nachweis der spezifischen Immunantwort von anti-m-Calpain-Antiserum direkt in oder an Zellen zu führen. Hierbei liegt die Annahme zugrunde, daß eine immuncytochemische Markierung durch vorherige Inkubation des Antiserums mit extrahiertem Antigen abgeschwächt werden kann.

Im Vorfeld ist es notwendig, die Reaktivität des Antigens, selbst ein proteolytisches Enzym, gegenüber dem Antiserum zu untersuchen. Es muß angenommen werden (unveröffentlichte Hinweise von I. Lachmann, Universität Leipzig), daß aktives m-Calpain bei geeigneten Bedingungen die Antigen-Antikörper-Reaktion auf ein nicht detektierbares Maß reduzieren kann. Dies bedeutet, der Nachweis von m-Calpain in Zellen kann abgeschwächt werden, a) weil tatsächlich das zugemischte Antigen in Konkurrenz zum zellgebundenen tritt oder b) weil die Antikörper nach Proteolyse durch m-Calpain kein Antigen mehr detektieren. Noch schlechter zu interpretieren sind c) unspezifische Reaktionen infolge einer Modifizierung des Antikörpers durch das Enzym. Hierbei kann man aber damit rechnen, daß die Zellen ein anderes Färbemuster präsentieren.

1. Vorversuch: Nachweis der Aktivität von m-Calpain unter Inkubationsbedingungen für die Immuncytochemie

Die Versuchsidee besteht darin, den Umsatz von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, einem sehr guten Substrat für m-Calpain, durch m-Calpain bei optimalen Bedingungen mit dem Umsatz bei Bedingungen für die Immuncytochemie zu vergleichen. Die 0%-Reaktion ist ein Versuchsansatz mit EDTA statt CaCl₂.

Als optimal wurden aus den biochemischen Untersuchungen übernommen: 0.05M Trispuffer pН 7.2. 2mM Ca²⁺. 5mM Mercaptoethanol, 37°C. PBS Immuncytochemische Inkubationsbedingungen sind: kein pН 7,4, Mercaptoethanol, kein Ca²⁺, 4°C. Dieser Versuch verlief bei Raumtemperatur.

Kontrolle	Kontrolle	Immuncytochemische
100%-Reaktion	0%-Reaktion	Inkubation
Ca ²⁺ -Lösung		
	EDTA-Lösung	
Trispuffer	Trispuffer	
		PBS
Substrat	Substrat	Substrat
Enzymprobe	Enzymprobe	Enzymprobe

Tabelle 26: Ansätze für die Untersuchung des Einflusses von m-Calpain auf anti-m-Calpain-Antiserum 1E8 bei Bedingungen für die Immuncytochemie
10µl]	EDTA-Lösung (0,2M EDTA in tridest. H2O)	
•	oder Ca ²⁺ -Lösung (0,2M CaCl ₂ in tridest. H ₂ O)	
+	920µl Trispuffer (0,05M Tris-HCl pH 7,2; 5mM Mercaptoethar	ıol)
	oder	
	930µl PBS pH 7,4	
+	20µl Substrat (2mM Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in DMSO)	
+	50µl Enzymprobe, m-Calpain aus Rinderherz	Start

1000µl

Methode

Die Versuchsansätze werden kontinuierlich 5 Minuten lang am Fluoreszenzfotometer bei $\lambda_{Exzitation}$ =340nm und $\lambda_{Emission}$ =440nm vermessen und der mittlere Anstieg des linearen Teils der Reaktionskurven ausgewertet.

Ergebnis

Unter den Bedingungen der Immuncytochemie bei Raumtemperatur wird Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC mit ca. 0,5% zur Kontrolle umgesetzt.

Dieser Wert liegt bei der Inkubationstemperatur der Zellen für Primärantiseren von 4°C sehr wahrscheinlich noch niedriger.



Diagramm 44: Vergleich der Proteolyse von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC unter Bedingungen des optimalen Enzymumsatzes in vitro und der immuncytochemischen Inkubation bei Raumtemperatur

2. Nachweis der Spezifität von 1E8 immuncytochemisch an Linsenepithelzellen

Nach dem Nachweis, daß die enzymatische Aktivität von m-Calpain unter immuncytochemischen Inkubationsbedingungen gering ist, wird folgender Versuch durchgeführt:

Methode

LEC werden nach Fixieren mit 2% Paraformaldehyd in PBS gespült, das Fixanz mit Glycin abgesättigt, die Zellmembran mit 10µg/ml Digitonin perforiert und unspezifische Bindungen durch RSA gehemmt. Es erfolgt die Inkubation mit anti-m-Calpain-Antiserum 1E8 (1:20 verdünnt mit PBS) bzw. mit m-Calpain (3,3mg/ml), welches fünf Minuten mit anti-m-Calpain-Antiserum 1E8 (Verdünnungsverhältnisse siehe Tabelle 27) inkubiert wird, über Nacht bei 4°C , Spülen mit PBS, 2 Stunden Inkubation mit FITC-Konjugat (Verdünnung 1:75 mit PBS) bei Raumtemperatur, weiteres Spülen mit PBS und Einbetten mit Aqua-Poly/Mount.

	1E8	1E8 + m-Calpain
Verdünnung mit PBS	1:20	1:20 + 1:20
Verdünnung mit PBS		1:20 + 1:5

Tabelle 27: Verdünnungsschema für die Inkubation mit anti-m-Calpain-Antiserum 1E8 und für die Gemische von 1E8 + m-Calpain

Ergebnisse

Es werden die Fluoreszenzaufnahmen und die zugehörenden Histogramme⁴ dargestellt. Die Verdünnung von m-Calpain mit PBS ist in Klammern angegeben.

In den Fluoreszenzabbildungen und Histogrammen ist deutlich die Abnahme heller Bildpunkte von der Kontrollreaktion mit 1E8 (Abb.25, 26) zu den Reaktionen 1E8 vorinkubiert mit m-Calpain (Abb.27, 28; 29, 30) zu erkennen. Die Fluoreszenz nimmt mit steigender m-Calpain-Konzentration ab. M-Calpain hemmt spezifisch die Reaktion von monoklonalem anti-m-Calpain-Antiserum 1E8 in Linsenepithelzellen.



Abbildung 23, 24: Immunofluoreszenz ohne Primärantiserum (links) und Histogramm (rechts)

⁴ Histogramm: Jedem Bildpunkt (1024x1024) der Fluoreszenzaufnahme wird ein Grauwert (dunkel \rightarrow hell: 0...256) zugeordnet. Die Helligkeitsverteilung (Anzahl der Bildpunkte, die einen bestimmten Grauwert besitzen) wird in einem Diagramm dargestellt.



Abbildung 25, 26: Immunofluoreszenz mit anti-m-Calpain-Antiserum Primärinkubation (links) und Histogramm (rechts), Meßbalken=25µm.



Abbildung 27, 28: Immunofluoreszenz mit m-Calpain (1:20) vorinkubiertem anti-m-Calpain-Antiserum (1:20) als Primärantiserum (links) und Histogramm (rechts), Meßbalken=25µm.



Abbildung 29, 30: Immunofluoreszenz mit m-Calpain (1:5) vorinkubiertem anti-m-Calpain-Antiserum (1:20) als Primärantiserum (links) und Histogramm (rechts), Meßbalken=25µm.

2.2.2.3 Immuncytochemische Darstellung von Calpain nach Inkubation mit Detergenz

Untersuchte Linsenepithelzellen zeigen nach Anfärbung mit anti-m-Calpain-Antiserum und FITC-Konjugat deutliche Fluoreszenz, die bei hoher Auflösung (40-100fache Objektivvergrößerung) als "Filamente" erscheint. Gegensätzlich dazu wird bei der Extraktion von m-Calpain aus Rinderherz davon ausgegangen, daß das Enzym frei gelöst im Cytosol vorkommt.

In Linsenepithelzellen soll gezeigt werden, ob es möglich ist, einen löslichen cytosolischen Anteil der immuncytochemischen Färbung von dem an Filamenten gebundenen abzutrennen.

Methode

Linsenepithelzellen werden a) vor dem Fixieren 1-2 Minuten mit 1%iger Triton-X-100 Lösung in HBS inkubiert und b) mit einer Kontrollinkubation, erst Fixieren und nachfolgend 1-2 Minuten Triton-X-100, verglichen.

Weiterhin wird folgende Standardmethode durchgeführt: Linsenepithelzellen werden nach Fixieren in PBS gespült, das Fixanz mit Glycin abgesättigt, mit 10µg/ml Digitonin inkubiert und unspezifische Bindungen durch 0,1% RSA gehemmt. Es erfolgt die Inkubation mit anti-m-Calpain-Antiserum über Nacht bei 4°C (1/50 verdünnt mit PBS), Spülen mit PBS, 2 Stunden Inkubation mit FITC-Konjugat (Verdünnung 1/50 mit PBS) bei Raumtemperatur, weiteres Spülen mit PBS und Einbetten in Aqua Poly/Mount.

Ergebnis

Es ist nicht möglich, eine Fluoreszenzabschwächung nach Detergenzinkubation herbeizuführen. 1E8 bindet an nicht detergenzlösliche, im Cytosol offensichtlich nicht frei bewegliche Bestandteile von Linsenepithelzellen.



Abbildung 31: Linsenepithelzellen fixiert mit 2% Paraformaldehyd in HBS, danach inkubiert mit 1% Triton-X-100 in HBS; Färbung: 1E8 (monoklonal Maus-anti-m-Calpain)+anti-Maus-FITC; Objektivvergrößerung 40x; Meßbalken=25µm.



Abbildung 32: Linsenepithelzellen mit 1% Triton-X-100 in HBS inkubiert, danach fixiert mit 2% Paraformaldehyd in HBS; Färbung und Vergrößerung wie Abbildung 31; Meßbalken=25µm.

2.2.2.4 Immuncytochemischer Ausschluß von m-Calpain auf der Zelloberfläche

Untersuchungen der Calpain-Lokalisation mit fluorogenen Peptidsubstraten können gestützt werden durch einen immuncytochemischen Nachweis. Speziell die Detektion des Proteins auf der Zelloberfläche (in das umgebende Medium gerichtete Seite der Zellmembran) ist interessant für eine Interpretation der Ergebnisse mit Substraten und Abbauprodukten (siehe S.39 ff.).

Methode

Die immunologische Färberoutine wurde nach einer Reihe von Versuchen wie folgt abgewandelt:

Als erstes werden die Zellen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Kaninchen-antim-Calpain-Antiserum (IgG-Fraktion, 3,3mg Protein, 1mg/ml HSA; Verdünnung 1/10 mit PBS) inkubiert. Erst danach wird mit Paraformaldehyd fixiert und mit Digitonin die Membran perforiert.

Die weiteren Schritte sind identisch mit der Standardmethode: LEC werden nach Fixieren in PBS gespült, das Fixanz mit Glycin abgesättigt, mit 10µg/ml Digitonin inkubiert und unspezifische Bindungen durch 0,1%RSA gehemmt. Für die Kontrollreaktion erfolgt die Inkubation mit Primärantiserum 1 Stunde bei Raumtemperatur, Spülen mit PBS, 1-2 Stunden Inkubation mit Sekundärantiserum (Verdünnung 1:75 mit PBS) bei Raumtemperatur, weiteres Spülen mit PBS und Einbetten in Aqua Poly/Mount.



Abbildung 33: Linsenepithelzellen, angefärbt mit Kaninchen-anti-m-Calpain-Antiserum/anti-Kaninchen-FITC, Antigendetektion auf der Zelloberfläche;

1 mit primärem Antiserum vor der Fixierung inkubiert

2 Kontrollreaktion mit primärem Antiserum inkubiert nach Fixierung und 10µg/ml Digitonin in PBS; Objektivvergrößerung 40x (Bildauflösung 512x512), Meßbalken=50µm

Ergebnis:

Auf der Oberfläche von Linsenepithelzellen ist eine Proteinkomponente, die von Kaninchen-anti-m-Calpain-Antiserum erkannt wird, nicht nachweisbar.

2.2.2.5 Vergleich von Bestandteilen des Cytoskelettes⁵ und Calpain nach immuncytochemischer Färbung in Linsenepithelzellen

Calpain ist in den vorangegangenen Versuchen in Linsenepithelzellen als filamentöses Geflecht in Erscheinung getreten (siehe S. 64 f.). Weiterhin ist gezeigt worden, daß es durch Inkubation mit Detergenz nicht abgelöst werden kann und scheinbar auch keine löslichen cytosolischen Anteile existieren (siehe S. 70).

In diesem Versuch soll ein rein optischer Vergleich der Mikro-, Intermediär- und Tubulinfilamente mit Calpain durchgeführt werden.

Methode

Standardmethode: LEC werden nach Fixieren in PBS gespült, das Fixanz mit Glycin abgesättigt, mit 10 μ g/ml Digitonin inkubiert und unspezifische Bindungen durch 0,1% RSA gehemmt. Es erfolgt die Inkubation mit Primärantiserum über Nacht bei 4°C, Spülen mit PBS, 1-2 Stunden Inkubation mit Sekundärantiseren (Verdünnung mit PBS) bei Raumtemperatur, weiteres Spülen mit PBS und Einbetten in Aqua Poly/Mount.

Primärantiseren:

- a) Phalloin⁶-Rhodamin (0,4µg/ml) (Darstellung von F-Aktin, Mikrofilamente)
- b) Maus-anti-Vimentin (1:20) + Anti-Maus-Biotin (1:200) + Streptavidin-Texas Red (1:100) (Darstellung von Vimentin, Intermediärfilamente)
- c) anti-m-Calpain-Antiserum (1E8) (1:10) + FITC-Konjugat (1:75)

	Calpain	Mikrofilamente	Intermediärfilamente
Antiserum			
Primär	1E8		Maus-anti-Vimentin
1. Konjugat	Anti-Maus-FITC	RH-Phalloin	Anti-Maus-Biotin
2. Konjugat			Streptavidin-Texas Red

Tabelle 28: Inkubationsmedien für die Darstellung von Calpain und den Cytoskelett-Anteilen Aktin und Vimentin

⁵ Cytoskelett: "Im Cytoplasma eukaryotischer Zellen befindet sich ein dreidimensionales Gerüst von Filamenten (langen Fasern), das man als Cytoskelett bezeichnet. Die Filamente werden nach ihrem Durchmesser in drei Gruppen eingeteilt: Mikrofilamente (ca.8nm), Intermediärfilamente (ca.10nm) und Mikrotubuli (ca.25nm). Alle Filamente sind Polymere aus charakteristischen Proteinbausteinen."(20)

⁶ Phalloidin: Gift des grünen Knollenblätterpilzes. Es bindet an *F-Aktin* (filamentöses=polymerisiertes Aktin) und verhindert dessen Depolymerisation zu *G-Aktin* (globuläres Aktin, Monomer) (13). In der Cytochemie wird es z.B. FITC-gelabelt als Nachweisreagenz für F-Aktin, anstelle eines spezifischen Antiserums eingesetzt.



Abbildung 34, 35: Mikrofilamente in Linsenepithelzellen; F-Aktin angefärbt mit RH-Phalloin, Objektivvergrößerung 100x (Auflösung 1024x1024), Meßbalken=10µm



Abbildung 36, 37: Intermediärfilamente in Linsenepithelzellen; Vimentin angefärbt mit Mausanti-Vimentin/anti-Maus-Biotin/Streptavidin-Texas Red, Objektivvergrößerung 100x (Auflösung 1024x1024), Meßbalken=10µm

Ergebnis

Der Vergleich der Darstellung von Calpain und den Bestandteilen des Cytoskelettes anhand der ausgewählten typischen Fluoreszenzbilder von Linsenepithelzellen läßt keinen Rückschluß auf eine Identität mit einem einzelnen Filamenttyp zu. Es finden sich beim Calpainnachweis die Elemente von Mikrofasern ("stress fibers"-langgestreckte parallelaufende Fasern sowie in Abb.35 über Kreuz verbundene Fasern). Mikrotubuli (die Fasern gehen von einem Organisationszentrum, dem Centrosom aus, welches in Kernnähe liegt; hier ist mit der höchsten Konzentration der Fasern zu rechnen) und Intermediärfilamenten (Vimentin bildet ein ausgedehntes Netzwerk vom Zellkern bis zur Zellmembran) (21, 22, 23).



Abbildung 38, 39: Mikrotubuli in Linsenepithelzellen, Mikrotubuli angefärbt mit Maus-anti-α-Tubulin/FITC-Konjugat, Primärvergrößerung 250x (Abb.38) und 500x (Abb.39); Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Iwig.



Abbildung 40, 41: Calpain in Linsenepithelzellen; Calpain angefärbt mit Maus-anti-m-Calpain 1E8/anti-Maus-FITC, Objektivvergrößerung 100x (Auflösung 1024x1024), Meßbalken=10µm

Möglicherweise werden Anteile aller Cytoskelettfilamente beim Nachweis von Calpain miterfaßt (siehe auch Abbildungen S.65).

2.2.2.6 Vergleich von Bestandteilen des Cytoskelettes mit Calpain nach immuncytochemischer Doppelmarkierung in Linsenepithelzellen

Mit Hilfe der Doppelmarkierung, d.h. der unterschiedlichen Anfärbung zweier Objekte in einer Zelle, wird versucht, Calpain von den Anteilen des Cytoskeletts zu diskriminieren. Das Ziel besteht darin zu zeigen, ob die Calpainfärbung Cytoskelettanteile vollständig miterfaßt, d.h. Calpain auf oder an Teilen des Cytoskelettes in Linsenepithelzellen bevorzugt assoziiert ist.

Methode

Standardmethode: LEC werden nach Fixieren in PBS gespült, das Fixanz mit Glycin abgesättigt, mit 10 μ g/ml Digitonin inkubiert und unspezifische Bindungen durch 0,1%RSA gehemmt. Es erfolgt die Primärinkubation mit 1E8 (1:10...1:50 mit PBS) über Nacht bei 4°C, Spülen mit PBS, 1-2 Stunden Inkubation mit Kaninchenanti-Maus-FITC (1:75 mit PBS) bei Raumtemperatur, weiteres Spülen mit PBS. Die nachfolgende zweite Inkubation für die Doppelmarkierung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr.M.Iwig und A.Thate:

- d) Phalloin-Rhodamin $(0, 4\mu g/ml)$ (Darstellung von F-Aktin, Mikrofilamente)
- e) Maus-anti-Vimentin (1:20) + Anti-Maus-Biotin (1:200) + Streptavidin-Texas Red (1:100) (Darstellung von Vimentin, Intermediärfilamente)
- f) Maus-anti-Tubulin (1:20) + Anti-Maus-Biotin (1:200) + Streptavidin-Texas Red (1:100) (Darstellung von Tubulin, Mikrotubuli)

Erzeugung und Auswertung der Fluoreszenzbilder mit der Zeiss-Software für LSM.

Ergebnis

Auf nachfolgenden Seiten Beispiele Vergleichen den sind von des Calpainnachweises mit je einem Anteil des Cytoskelettes dargestellt. Bei den (farbige Darstellung) sind 3 Doppelfluoreszenzen Farbvarianten möglich: 1. Rot - Fluoreszenzfarbe des Cytoskelettanteils, 2. Grün - Fluoreszenzfarbe von Calpain, 3. Gelb Fluoreszenzfarbenaddition (additive Farbmischung rot+grün=gelb). Es sind tatsächlich jeweils auch alle drei Farbanteile vorhanden. Zur Ergänzung werden die einzelnen Farbkanäle (rot und grün) als Graustufen dargestellt.7

Per Computer ist eine Subtraktion der Farbkanäle voneinander vorgenommen worden. Es fällt auf, daß die entstandenen Differenzbilder immer dunkler sind als die Ausgangsbilder und daß bestimmte Bereiche im Vergleich zum einzelnen Farbkanal fehlen. Dies bedeutet, in unterschiedlichen Farbkanälen sind z.T. gleiche Strukturen markiert.

⁷ Bei der primären Bildentstehung am Laser-Scanning-Mikroskop werden beide Fluoreszenzdetektoren (=Farbkanäle) einzeln und unabhängig voneinander optimal in Helligkeit und Kontrast (256 Graustufen, keine Über-und Untersteuerung auf der gesamten Bildfläche) abgestimmt. Es sind hier nur qualitative Aussagen möglich.



Abbildung 42: Vergleich von Calpain und Mikrofilamenten in der Immunfluoreszenz

1 Doppelfluoreszenz Calpain grün, Actin rot

- 4 Fluoreszenzdifferenz Calpain-Actin
- 5 Fluoreszenzdifferenz Actin-Calpain

Objektivvergrößerung 100x (Auflösung 1024x1024),

Der Nachweis Calpain und F-Aktin bringt sehr klare Ergebnisse. Großen Anteil daran haben die unterschiedlichen Färbetechniken: F-Actin wird mit einem sehr spezifischen Pilzgift-Konjugat (RH-Phalloin) und Calpain mit monoklonalem Antiserum/FITC-Konjugat dargestellt. Für eine Auswertung sind hier die doppelt markierten Bildanteile besonders von Bedeutung. Diese finden sich als Auslöschungen auf den Differenzbildern im Vergleich zu den Einzelfluoreszenzen.



Abbildung 43: Vergleich von Calpain und Intermediärfilamenten in der Immunfluoreszenz

6 Doppelfluoreszenz Calpain grün, Vimentin rot

- 7 Fluoreszenz Calpain
- 8 Fluoreszenz Vimentin
- 9 Fluoreszenzdifferenz Calpain-Vimentin
- 10 Fluoreszenzdifferenz Vimentin-Calpain

Objektivvergrößerung 100x (Auflösung 1024x1024), Meßbalken=10µm



Zur Darstellung von Calpain und Intermediärfilamenten werden jeweils monoklonale Maus-Antiseren verwendet. Für die nachfolgende Anfärbung kann eine Kreuzreaktion nicht ausgeschlossen werden. Beide Male wird ein anti-Maus-Konjugat verwendet. Hier sind vor allem die Unterschiede der Fluoreszenzmarkierungen hervorzuheben. Es existieren Bereiche, in denen beide dargestellt werden, Proteinen gleichzeitig wie auch von Calpain oder Intermediärfilamenten einzeln bevorzugte Bereiche.



Abbildung 44: Vergleich von Calpain und Mikrotubuli in der Immunfluoreszenz

11 Doppelfluoreszenz Calpain grün, Tubulin rot

- 12 Fluoreszenz Calpain
- 13 Fluoreszenz Tubulin
- 14 Fluoreszenzdifferenz Calpain-Tubulin
- 15 Fluoreszenzdifferenz Tubulin-Calpain

Objektivvergrößerung 40x (Auflösung 1024x1024), Meßbalken=25µm



Unterschiede zwischen den Darstellungen von Calpain und Mikrotubuli treten erst in den Differenzbildern hervor. Während Calpain den Bereich im Bild um und im Zellkern scheinbar allein einnimmt, sind Mikrotubuli außerhalb des Zellkernes zu finden.

Bei dieser Darstellung werden Calpain und Mikrotubuli jeweils von monoklonale Maus-Antiseren detektiert. Unterschieden in den Fluoreszenzbildern ist deshalb größere Bedeutung beizumessen.

Kapitel 3: Einordnung der Ergebnisse – Diskussion

3.1 Wie sicher ist der Calpain-Nachweis?

3.1.1 m-Calpain, isoliert aus Herzmuskelhomogenat vom Rind mittels Säulenchromatographie

Die calciumabhängige Proteaseaktivität aus dem Homogenat von Rinderherzmuskel ist nach einem Trennschritt über DEAE-Ionenaustauscher detektierbar (4,33,174). Azocasein oder Peptidsubstrate werden in Anwesenheit von 2mM CaCl₂ hydrolysiert. Weiterhin ist nach einer Gelelektrophorese das charakteristische Bandenmuster der 30K- und der 80K-Untereinheiten zu sehen (siehe S. 9).

Die in der Literatur beschriebene Wirkung eines endogenen Inhibitors (Calpastatin) wird von uns ebenfalls festgestellt. Calpastatin hemmt Calpain in Anwesenheit von 2mM CaCl₂ (siehe S. 18, 30 f.). Das Protein ist in der Elektrophorese und bei der Protein-Bestimmung nach Lowry nachweisbar (10,74,33).

3.1.2 Calpain-Enzymaktivität in vitro

Aus Rinderherz gewonnenes Calpain entwickelt bei neutralem pH proteolytische Aktivität gegen Casein, Azocasein und eine Reihe untersuchter Peptidsubstrate. Es werden Peptidsubstrate bevorzugt, welche in P₂-Stellung hydrophobe Aminosäurereste (Tyr, Met, Leu, Val) oder Arginyl aufweisen (1,26,33). Die verwendeten Substrate Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Boc-Leu-Met-AMC, Boc-Leu-Met-CAMC entsprechen diesen Voraussetzungen und werden hydrolysiert (siehe S. 29 f.).

Eine halbmaximale Enzymaktivierung erfährt die Protease bei ca. 0,5mM CaCl₂ (siehe S. 27, Diagramm 16). Nach Definition handelt es sich hierbei um m-Calpain (33). Entzug von Calciumionen führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität in vitro.

Mercaptoethanol wirkt aktivierend (siehe S. 28, Diagramm 17). Dies ist ebenfalls ein Kriterium für Calpain als eine Cystein- oder Thiolprotease (4,33).

Folgende untersuchte Proteaseinhibitoren hemmen wirksam: *Calpastatin*, Iodazetamid, E-64, Calpain-Inhibitor I, Calpain-Inhibitor II, ZLYCK, Chymostatin, Calpeptin. Andere Proteaseinhibitoren hemmend nicht: NEM (alkyliert SH-Gruppen und hemmt Endonucleasen), PCMPS (hemmt SH-Enzyme und Proteinasen), PMSF (hemmt Serinproteasen), ZAAPCK (hemmt Peptidasen) (siehe S. 30 f.).

Im Zymogramm unterscheiden sich Papain und m-Calpain in ihrer Wirkung deutlich. Während durch Papain das Substrat Casein kontinuierlich im Verlauf der elektrophoretischen Trennung abgebaut wird, kann m-Calpain erst bei einer nachfolgenden Inkubation mit 2mM Ca²⁺ seine enzymatische Aktivität entfalten. Papain zieht eine helle Spur, m-Calpain hydrolysiert nur distinkte Bereiche in Form von Banden. Diese liegen in unterschiedlicher Höhe – aktives m-Calpain wird hier in zwei Molekülformen nachgewiesen, die unterschiedliche Molekulargewichte besitzen (siehe S. 34 Abbildung 11).

3.1.3 Calpain in der Elektrophorese und im Westernblot

In der SDS-Elektrophorese erscheint das isolierte m-Calpain als zwei Banden im Bereich 80kD und 30kD, was den beiden Untereinheiten entspricht (siehe S. 33 Abbildung 9) (27,38,39).

Die Nativelektrophorese läßt ebenfalls 2 Banden erkennen, hier im Bereich >65kD und um 130kD. Es wird sich vermutlich um die 80K-Untereinheit und das Gesamtmolekül mit MW 110kD oder ein Dimeres von 80K handeln (Abbildung 10).

Im Westernblot mit Kaninchen-anti-m-Calpain-Antiserum nach SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen werden die Bereiche 80K und 30K deutlich dargestellt. Während 30K zwei scharfe Linie ausbildet, sind bei der großen Untereinheit mindestens vier ineinander übergehende Banden zu erkennen (siehe S. 35 Abbildung 13). Diese sind wahrscheinlich Autolyseprodukte. Weiterhin ist eine schwache Bande unterhalb 70kD zu erkennen, die nicht zugeordnet werden kann. Mit monoklonalem Antiserum wird im Westernblot nach SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen die 80K-Untereinheit und eine leichtere Form detektiert, dagegen ist unter nichtreduzierenden Bedingungen nur eine Bande bei 80kD zu sehen (siehe S.35). Die Spezifität des verwendeten 1E8 monoklonalen Maus-anti-m-Calpain-Antiserums ist nachgewiesen (siehe S. 21 f.).

3.1.4 Calpain in Linsenepithelzellen

Zum Nachweis von Calpain und zur Charakterisierung einer calciumabhängigen proteolytischen Aktivität in Linsenepithelzellen wurden Untersuchungen mit fluorogenen Peptidsubstraten und immuncytochemische Untersuchungen mit polyklonalen und monoklonalen Antiseren durchgeführt. Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert.

3.1.4.1 Nachweis des Antigens im Westernblot

Calpain aus Augenlinsen wurde von mehreren Arbeitsgruppen immunologisch nachgewiesen (128,180,184,185). In unseren Versuchen war es möglich, Calpain aus den kultivierten Linsenepithelzellen vom Rind als eine Bande aus dem nicht detergenzlöslichen Sediment bei 1000g (Cytoskelett) im Westernblot zu registrieren. Möglicherweise war die Sensitivität der Methode zu niedrig, um im Cytosol (Überstand nach einstündiger Zentrifugation bei 100000g) oder in der Membranfraktion (Detergenzextrakt) Calpain zu detektieren. Andere Arbeitsgruppen fanden Calpain aus dem Homogenat von Augenlinsen in ähnlich präparierten Fraktionen.

Das Molekül erscheint bei unserer Präparation als eine Bande unterhalb 70kD und im Vergleich zur 80K-Untereinheit deutlich leichter. Möglicherweise ist dies auf die Präparation zurückzuführen. Allerdings war bei einer Präparation von m-Calpain aus Herzmuskel ebenfalls eine schwache Bande unterhalb 70kD im Westernblot zu erkennen. Bei einer Präparation humaner Linsenepithelzellen hatte das gefundene Protein ebenfalls das gleiche Molekulargewicht (mündliche Mitteilung Dr.I.Willhardt). Dies legt die Wahrscheinlichkeit nahe, daß es sich hierbei nicht um einen Artefakt, sondern um eine real vorkommende Form von Calpain handelt.

3.1.4.2 Untersuchung zur Enzymaktivität in der Zelle

Nach Yoshida et al. (180) findet man in Linsenepithelzellen vom Rind m-Calpain. Diese Tatsache ermöglicht einen direkten Vergleich der enzymatischen Aktivität des isolierten Enzyms aus dem Herzen vom Rind mit den Ergebnissen der Untersuchungen an Linsenepithelzellen, ebenfalls vom Rind.

1. Auswahl geeigneter Peptidsubstrate

Eine erste Barriere für Peptidsubstrate ist die Zellmembran: Succinylierte Peptidsubstrate werden nicht umgesetzt, da sie offensichtlich diese Begrenzung nicht überwinden (siehe S. 39 f.). Dies ist etwas überraschend, weil von anderen Arbeitsgruppen z.B. Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC für die Fluoreszenzuntersuchung mit Zellen anderer Herkunft erfolgreich eingesetzt wird (34,178). Von den getesteten hydrophoben Boc-geschützten Peptidsubstraten wird die Mehrzahl hydrolytisch gespalten.

Der mangelnde Umsatz von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, dem Standardpeptidsubstrat eigener in vitro-Untersuchungen mit m-Calpain, ist ein Indikator für das Fehlen einer calpainartigen Ektoprotease bei Linsenepithelzellen.

Das Substrat Boc-Leu-Met-CAMC (12,34) weist in Versuchen die höchste Fluoreszenzausbeute und eine in der Zelle akkumulierende Fluoreszenz auf. Dies ist für die Fluoreszenzmikroskopie von großem Vorteil. Bei in vitro-Untersuchungen hat dieses Substrat allerdings eine nicht unerhebliche Autolyserate, so daß hier nur wenige Ergebnisse dargestellt werden können. Substrate wie Boc-Met-Met-AMC, Boc-Leu-Met-AMC und Boc-Leu-Leu-Met-AMC werden in vitro vergleichbar oder schneller von m-Calpain umgesetzt als Boc-Leu-Met-CAMC. Fluoreszenmikroskopische Untersuchungen mit diesen Substraten in vivo sind aber nur qualitativ möglich, da das Fluorophor AMC membranpermeabel ist. Es ist zu beobachten, daß die Fluoreszenz in der Zelle nach einem kurzen linearen Anstieg konstant bleibt. Die Zellumgebung wird innerhalb des Meßzeitraumes von fünf Minuten unter den beschriebenen Meßbedingungen aufgehellt und die Konturen der Zellen verschwimmen. Dies deutet daraufhin, daß AMC kontinuierlich aus der Zelle in das umgebende Medium austritt.

Um dennoch quantitative Meßergebnisse zu erhalten, wird nach einer definierten Inkubationszeit das Medium abgenommen und Proben in einer Doppelbestimmung mittels HPLC und Verwendung eines Fluoreszenzmonitors ausgewertet. Das Medium kann bei –20°C aufbewahrt werden und steht für Kontrollen über einen längeren Zeitraum zur Verfügung. Eine weitere Hydrolyse des Substrates wird unter diesen Bedingungen nicht beobachtet (siehe S. 44 ff.).

Für die weiteren Versuche wurde das Peptidsubstrat Boc-Leu-Met-AMC ausgewählt. Es wird in vitro und in vivo mit einer ausreichend hohen Rate hydrolysiert und es steht zudem in genügender Menge und Reinheit zur Verfügung (siehe S. 14 ff.).



Diagramm 21: Abhängigkeit der Proteasomen- und der Calpain-Aktivität von der Ca²⁺-Konzentration, Substrat Boc-Leu-Met-AMC (siehe S.36 ff.), Erläuterung siehe Text

2. Differenzierung zwischen der Aktivität von m-Calpain und Proteasomen

Vergleichende Untersuchungen zwischen m-Calpain und Proteasomen in vitro (siehe S. 36 ff.) zeigen, daß Boc-Leu-Met-AMC von beiden Enzymen hydrolysiert wird. Gleiches trifft auch für Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC zu (5, 35). Dieses Problem besteht bis heute bei allen von uns untersuchten synthetischen Peptidsubstraten für Calpain.

In einer früheren Arbeit von Dahlmann et al., 1985 (5) wird die multikatalytische Protease (später Proteasom) mit diversen Peptidsubstraten untersucht. Dabei wird festgestellt, daß sich die Hydrolyse verschiedener Substrate immer unterscheidet und auch unterschiedlich beeinflußbar ist. Dies führte zu der Überlegung, die Calciumabhängigkeit des Umsatzes von Boc-Leu-Met-AMC zu untersuchen. Im Diagramm 21 (siehe auch S. 37) sind die Ergebnisse graphisch dargestellt:

In vitro gibt die Ca²⁺-Abhängigkeit der Calpainaktivität, rote Linie, die bekannte Sättigungskinetik wieder: Bei OmM Ca²⁺ beginnend und einem Maximum in Form eines Plateaus ab ca. 1mM Ca²⁺. Proteasomen, dunkelblaue Linie, zeigen im Bereich 0...5mM Ca²⁺ keine Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Calciumkonzentration. Nach Entzug von Calcium durch EDTA zeigt sich ein deutliches Minimum der Substrathydrolyse bei 2mM EDTA.

Für die Interpretation der Ergebnisse in vivo ergibt sich der Schluß, daß Proteasomen in Linsenepithelzellen an der Proteolyse von Boc-Leu-Met-AMC wahrscheinlich nicht oder unbedeutend beteiligt sind, wenn

1) in Linsenepithelzellen das Peptidsubstrat Boc-Leu-Met-AMC hydrolysiert wird bei

einer Konzentration von 2mM EDTA im Cytosol und/oder

2) die Proteasewirkung bei einem Überschuß von 2mM Ca²⁺ hemmbar ist.

Tatsächlich verhält sich die proteolytische Aktivität wie in 2) in den Linsenepithelzellen (siehe S.50 ff.). Die Plasmamembran wurde dazu mit Ionomycin für Calciumionen durchlässig gemacht und die Zellen danach während der Reaktion mit dem Peptidsubstrat mit 2mM Ca²⁺ oder 2mM EGTA oder EDTA im Versuchsmedium inkubiert. Durch Ca²⁺ stimulierte Linsenepithelzellen haben eine Proteolyserate von weniger als 20% im Vergleich zu denen mit Entzug von Ca²⁺ (siehe auch S.50 ff. Diagramme 34-43).

Eine indirekte Bestätigung dieses Ergebnisses geben Rosser et al. (12): Sie öffnen die Zellmembran von Hepatocyten mit 10 μ M Digitonin und beobachten ein "Ausströmen" der Fluoreszenz von CAMC. Eigentlich beobachten sie nicht nur ein Ausströmen der Fluoreszenz, sondern wahrscheinlich auch den sofortigen Abbruch der Hydrolyse von Boc-Leu-Met-CAMC. Der Grund dafür sind *2mM Ca*²⁺ im Inkubationsmedium, welches in die Zellen einströmt.

Coucell et al. (181) beschreiben ähnliche Ergebnisse: Sie finden eine erhöhte proteolytische Aktivität gegen Phosphodiesterase und Phosphodiesteraseinhibitorprotein nach Inkubation von Dictyostelium discoideum-Zellen mit EGTA und dem Ionophor A23187 (Calcimycin), um die intrazelluläre Calciumionenkonzentration zu erniedrigen. Die Aktivität ist nicht mit lysosomotropen Agentien beeinflußbar und "der Phosphodiesteraseabbau erfordert zelluläre Energie" (siehe dazu auch S. 89 f.).

Es scheint paradox, daß ausgerechnet von Calpain bei sehr niedriger Ca²⁺⁻ Konzentration bzw. Calciummangel in Zellen (besser im Cytosol), hervorgerufen durch EDTA/EGTA im Inkubationsmedium, eine proteolytische Enzymaktivität ausgehen könnte. Daß EDTA/EGTA durchaus bei Ionomycin-vergifteten Zellen zum Calciumentzug führt, ist gesichert und wurde nochmals überprüft (siehe S.47 f.) (37).

An diesem Punkt angelangt sind zwei gedankliche Richtungen möglich: 1. Wir haben es hier mit einer durch Ca²⁺ hemmbaren Protease zu tun. 2. Sollte die Wirkung von Calpain ausgehen, so ist dessen Aktivierung in vivo scheinbar entgegengesetzt zu in vitro.

Die durch in vitro-Versuche belegte Tatsache, daß Calpain durch Calpastatin gehemmt wird bei für die Enzymaktivität ausreichender Calciumionenkonzentration (siehe S. 30) spricht für Calpain als wirksame Protease. Es stellt sich dann aber automatisch die Frage, wie Calpain aktiviert wird, da es offensichtlich aktiv ist bei geringer Calciumionenkonzentration (wahrscheinlich weniger als 1 μ M im Cytosol). Dies ergibt sich aus dem spontanen Umsatz von Boc-Leu-Met-AMC und anderen Peptidsubstraten (siehe S.39 f.).

Die andere Argumentation für eine neue, durch Ca²⁺ hemmbare proteolytische Aktivität ist damit ebenfalls weiter möglich. Nachfolgend diskutierte Ergebnisse stammen von Versuchen, bei denen gezielt nach Calpain gesucht wurde.

3. Hemmung der Cysteinprotease mit synthetischen Inhibitoren

Als ein wichtiges Kriterium der katalytischen Spezifität und seiner Identifizierung gelten Inhibitionsversuche. Es geht wie im Abschnitt vorher darum zu entscheiden, ob tatsächlich Calpain die Peptidsubstrat-Hydrolyse in Zellen katalysiert hat, da mit der Aktivität weiterer proteolytischer Enzyme (Proteasomen, lysosomale Proteasen, Caspasen) gerechnet werden muß. Membranpermeable Substrate können mit großer Wahrscheinlichkeit auch den Innenraum von Lysosomen erreichen. Folgende Inhibitoren hemmen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen mehr als 90% der Enzymaktivität: Calpain-Inhibitor I, Calpeptin, E-64d (EST), p-Chlormercuribenzoat und Z-Leu-Tyr-Chlormethylketon. Calpain-Inhibitor II hemmt ca. 85%, Pepstatin hemmt ca. 60% der Enzymaktivität (siehe S.46 Diagramm 28).

E-64, in vitro ein sehr potenter Inhibitor von Calpain hat keine Wirkung auf den Enzymumsatz der Linsenepithelzellen. Es bestätigt sich, daß E-64 nicht membranpermeabel ist. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß es keine Ektoproteasewirkung mit Calpainaktivität bei Linsenepithelzellen gibt (175).

Anhand der Wirkung der untersuchten Inhibitoren ist die Unterscheidung oben erwähnter Enzyme von Calpain bzw. einer durch Ca²⁺ hemmbaren Protease nicht möglich. Die Identifizierung der Proteaseaktivität konnte im Weiteren nicht direkt durchgeführt werden. Deshalb wurde versucht, Anhaltspunkte mit Hilfe einer hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie und über die immuncytochemische Detektion zu bekommen.

4. Nachweis der Hydrolyse von Calpainsubstraten in Linsenepithelzellen bei hoher mikroskopischer Auflösung

Wie schon kurz ausgeführt (siehe S. 42 f.) ist es möglich, mit Hilfe der untersuchten fluorogenen Peptidsubstrate Boc-Leu-Met-AMC und Boc-Leu-Met-CAMC die spontane Fluoreszenzentwicklung durch calciumabhängige intrazelluläre Hydrolyse hochauflösend im Fluoreszenzmikroskop (LSM) zu beobachten. Beide Substrate zeigen das gleiche Ergebnis. Es bilden sich im Verhältnis sehr hell fluoreszierende Areale direkt um den Zellkern. Diese sind offensichtlich Orte hoher enzymatischer Aktivität. Zellkerne sind deutlich ausgespart, hier existiert scheinbar sehr wenig enzymatische Aktivität. Z.T. durchziehen linienförmig aneinandergereihte Punkte oder kurze Striche eng begrenzt den Zellkern. Peripher findet man Bereiche mit strahlenförmigen vom Kern ausgehende Punktreihen und Stäbchen. Es sind keine kompletten Fäden wie die vom Cytoskelett zu sehen.

Eine unstrukturierte allgemeine Aufhellung, wie sie bei geringer optischer Auflösung um den Zellkern erscheint, war unter den gewählten Bedingungen nicht feststellbar.

Im Abschnitt 3.1.4.4 werden die Erscheinungsbilder von Calpain während des Umsatzes von fluorogenen Peptidsubstraten und nach immuncytochemischem Nachweis gegenübergestellt und diskutiert.

3.1.4.3 Immuncytochemischer Nachweis der Lokalisation von Calpain in Linsenepithelzellen

Calpain wird in Linsenepithelzellen mit der IgG-Fraktion polyklonaler Kaninchenanti-m-Calpain-Antiseren und mit dem monoklonalen Maus-anti-m-Calpain-Antiserum 1E8 untersucht. Die Antiseren wurden auf ihre Spezifität hin getestet (siehe SS. 21, 35, 66 ff.). Die Möglichkeit des Einflusses von Calpain als Protease auf Antiseren wurde untersucht und es konnte unter den gewählten Inkubationsbedingungen keine Proteaseaktivität festgestellt werden (siehe S. 66 f.).

Auf der Oberfläche von Linsenepithelzellen können keine Antigene nachgewiesen werden, was bestätigt, daß Calpain keine Ektoprotease ist (siehe S. 41 f., 71).

Polyklonales und monoklonales Antiserum zeigen in Linsenepithelzellen die gleichen Bilder bei hoher Auflösung (siehe S. 64 f. Abbildungen 21, 22). Es werden fädige Strukturen sichtbar, die dem Cytoskelett oder Anteilen davon ähneln. Eine undifferenzierte allgemeine Aufhellung, wie sie von Murachi in PK15-Zellen beschrieben wird, kann nicht nachvollzogen werden (26). Sofern die Auflösung ausreichend ist (Objektivvergrößerung ca. 40x...100x) sind die fädigen Strukturen in normal kultivierten Linsenepithelzellen zu erkennen. Bei nachfolgenden Vergleichen mit den bekannten Anteilen des Cytoskelettes in Linsenepithelzellen, den Mikrofilamenten (Actin), Intermediärfilamenten (Vimentin) und Mikrotubuli werden immer zumindest Anteile dieser Filamente von anti-Calpain-Antiserum detektiert (siehe S. 72 ff., 75 ff.). Bestätigende Hinweise dazu geben z.B. auch Huttenlocher et al. (183), die finden, daß zellpermeable Calpaininhibitoren die β 1- und β 2-Integrin¹-gesteuerte Zellmigration hemmen und daß eine Ovar-Zelllinie vom Goldhamster mit geringer Expression von Calpain eine reduzierte Migrationsrate und vergleichbare morphologische Veränderungen wie durch Inhibitoren induziert aufweisen. Dies deutet ebenfalls auf einen engen Zusammenhang von Calpain und dem Cytoskelett hin (Weitere Hinweise siehe auch S. 3 "Intrazelluläre Lokalisation").

Ein Negativversuch, bei dem unfixierte Linsenepithelzellen mit Detergenzhaltigem Puffer inkubiert werden, soll klären, ob im Cytosol frei bewegliches Calpain existiert. Calpain sollte durch die Lyse der Zellmembran mit Hilfe eines Detergenz austreten können. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wird keine Fluoreszenabnahme festgestellt. Calpain ist demnach *nicht frei beweglich* im Cytosol (siehe S. 70). Weiterhin muß angenommen werden, daß keine bedeutenden Anteile von Calpain in der Zelle detergenzlöslich sind.

Die Vermutung, daß Calpain am Cytoskelett verankert ist, wird damit untermauert.

3.1.4.4 Vergleich der Lokalisation von Calpain in Linsenepithelzellen nach immuncytochemischer und Aktivitäts-Untersuchung

Das Antigen Calpain erscheint als ein Filamentgeflecht, das wahrscheinlich Anteile aller bekannten Cytoskelettfilamenttypen beinhaltet. Diese Filamente sind am dichtesten um den Zellkern angeordnet, sparen ihn aber nahezu aus. Er wird dadurch sichtbar (siehe S. 72 ff.). In den durchgeführten Versuchen sind die beobachteten Fäden bis hin zur peripheren Zellbegrenzung lückenlos. An der Peripherie findet man bei hoher mikroskopischer Auflösung auch kurze, scheinbar ungebundene Striche und Punkte.

Die Orte proteolytischer Aktivität erscheinen als kurze Striche oder Punkte, die z.T. auch auf Linien angeordnet sind. Die Linien sind allerdings immer unterbrochen. Sie verlaufen um den Zellkern herum oder auch strahlenförmig, ausgehend vom Zellkern.

Dies bedeutet, daß das Antigen Calpain nicht identisch ist mit der spontan gegen die Peptidsubstrate gerichteten Aktivität. Unter der Annahme, daß es sich bei der Aktivität um Calpain handelt, ist dies gleichbedeutend damit, daß nicht alle Calpainmoleküle enzymatisch aktiv sind. Weiterhin bedeutet es, daß Calpainmoleküle in der Zelle bei sehr niedriger cytosolischer Calciumionenkonzentration aktiv sind. Da dies nicht gleichbedeutend mit einem Abbau aller möglichen Substratproteine ist, kann angenommen werden, daß aktives Calpain im Cytosol nicht frei beweglich ist.

Eine hochauflösende mikroskopische Untersuchung der Calciumabhängigkeit der intrazellulären Proteolyse kann hier weiteren Aufschluß geben.

¹ Integrine: "Heterodimere Membran-durchspannende Proteine (MG. >200000), die bei Wirbeltieren meist als Zelloberflächen-Rezeptoren für Komponenten der extrazellulären Matrix bei Zell-Adhäsions- u. -Wanderungs-Prozessen mitwirken u. die Aminosäure-Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) erkennen. An der Innenseite der Plasmamembran sind sie mit Proteinen des Cytoskeletts verbunden (Beisp.: Hühner-Integrin, Fibronectin-Rezeptoren, Laminin-Rezeptoren)"(13).

[&]quot;Integrin-Rezeptoren…vermitteln die Verbindung und Übertragungskräfte zwischen der extrazellulären Matrix und dem Actin-Zytoskelett."(183)

3.1.5 Calpain im Rasterkraftmikroskop – ultrastrukturelle Darstellung

Die Frage, wie sich Calpain am Cytoskelett anheften kann, soll durch Versuche zur Aufklärung der Molekülstruktur und einem Vergleich mit vorhandenen Modellen geklärt werden.



- Abbildung 45: Modelle für heterodimere Calpainmoleküle (30K + 80K) und Aufnahme am Rasterkraftmikroskop
- Links A) Schematische Darstellung des Calpain von K.Suzuki, abgeleitet von molekularbiologischen Erkenntnissen

Rechts

B) Calpainmodell von T.Murachi, mit Berücksichtigung der möglichen räumlichen Anordnung und Struktur von 80K + 30K und deren Domänen (26) Calpain-Partikel, sehr wahrscheinlich 80K-Untereinheit, Aufnahme am Rasterkraftmikroskop, Meßskala 50nm, Vergrößerung ca. 600.000x

Das zweidimensionale Modell Murachi's (26) von 1989 kommt der Abbildung eines Calpain-Partikels bei 600.000facher Vergrößerung, wahrscheinlich der 80K-Untereinheit sehr nahe. Die C-terminale Domäne IV mit den EF-hand-motivs bildet rhombusförmige eine endständige Platte, der aufgrund der Form und Ladungsverteilung (im Modell) die Funktion eines Calciumrezeptors, Calciumspeichers oder eines Haftapparates zukommen kann. Es sind hier nur 4 EF-hand eingezeichnet. Heute ist bekannt, daß 6 EF-hand existieren, von denen aber "nicht alle aktiv" sein sollen (40).

Seit der Strukturaufklärung der cDNA von Calpain ist bekannt, daß das Molekül Bindungsorte ähnlich Calmodulin besitzt, die positiv geladene, komplexierbare Ionen binden (EF-hand-Struktur, bekannt als Ca²⁺-Komplexbildner, siehe auch S. 5 f.) (26,27,31).

3.2 Bindung des Calpain

3.2.1 Bindung des Calpain an Silicium-Objektträger

Erläuterungen zur Methode:

Die verwendeten Objektträger haben folgende Eigenschaft: Wasser benetzt die Oberfläche der Objektträger (Plättchen aus Reinstsilicium) mit einem kleinen Randwinkel². Dies ist eine typische Reaktion, die durch die Anziehung von Wassermolekülen aufgrund von Ladungswechselwirkungen mit einer Grenzfläche hervorgerufen werden.

Die Reinstsilicium-Plättchen besitzen einen Randwinkel von ca. 40° - sie sind weniger hydrophil als Gold (0-8°) oder hydroxylierte Oberflächen, aber auch nicht so hydrophob wie nach einer Modifizierung mit Methylgruppen (>90°) (18). Diese Eigenschaft ergibt sich aus der spontanen Oxidation einer nativen Silicium-oberfläche und der Ausbildung einer gewissen Anzahl Hydroxylgruppen.

Es zeigt sich, daß m-Calpain bei Raumtemperatur aus Trispuffer (0,02M, 0,005M Mercaptoethanol) ohne Ca²⁺ auf diesen Objektträgern innerhalb weniger Minuten adhäriert.

Assoziation des Calpain zu Filamenten an Silicium-Objektträger

Zwei Stunden nach Beginn der Adsorption von Calpain ist die Siliciumoberfläche völlig gleichmäßig mit Partikeln bedeckt.

Die Objektträger werden luftgetrocknet und eine Woche bei –20°C in einem geschlossenen Eppendorf-Gefäß aufbewahrt. Danach ist die gleichmäßige Verteilung der Partikel verschwunden. An dessen Stelle finden sich fädige Strukturen. Diese sind z.T. lateral assoziiert und bilden Bündel. Sie verfügen scheinbar über einen Richtungsvektor (siehe S. 62 f.).

Über eine Ausbildung von Calpain-Filamenten ist bis dato nichts bekannt. Es gibt Erkenntnisse über Aggregationen in Form von Dimeren (Hetero- und Homodimeren von CL und CS) (40).

Es ist aber bekannt, daß Wassermoleküle auf einer Siliciumoberfläche eine auf bestimmte Weise geordnete Molekülschicht ausbilden. Diese Schicht verringert ihre Stärke beim Trocknen an der Luft, verschwindet aber nicht vollständig, so daß gewisse hydrophile Bindungen (Wasserstoffbrücken) zur Feststoffoberfläche angenommen werden können. Die Dicke der Wasserschicht beträgt bei Raumtemperatur und normaler Luftfeuchtigkeit etwa 5nm (mündliche Mitteilung Dr.U.Bakowski)

Die Erscheinungen auf Reinstsilicium bei –20°C haben mit der normalen Umgebung von Calpain nur wenig zu tun. Die Bindungskräfte verhindern offensichtlich nicht, daß benachbarte Calpainmoleküle miteinander in Wechselwirkung treten können und in einem dünnen Wasserfilm eingebettet fädige Strukturen ausbilden, wenn ein ausreichend langer Zeitraum zur Verfügung steht.

² Randwinkel: siehe 2.2.2 Hochauflösende Darstellung von Calpain und Cytoskelett mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (Atomic force microscopy)

3.2.2 Bindung von Calpain und Calpastatin an DEAE-Cellulose

Calpainuntereinheiten (CL und CS) und Calpastatin gehen Bindungen ein, die mit Ionenaustauscher (DEAE) gelöst werden

Calpain wurde erstmals entdeckt, als Guroff 1964 (4) DEAE³-Cellulose als chromatographischen Schritt zur Trennung von Hirnhomogenat einsetzte. Heute ist bekannt, daß bei diesem Schritt Calpain von einem Inhibitorprotein getrennt wird. Dieses erscheint beim Elutionsvorgang vor dem Calpain (siehe S.8 ff., S.18 f.).

Interessanter Weise liegen die beiden Untereinheiten von Calpain nach diesem Trennschritt nicht in verschiedenen Fraktionen vor, was auf vergleichbare Ionisationszustände, p_{A} -Werte hindeutet.

Die Moleküle verfügen über unterschiedliche Molekulargewichte von 80kD und 30kD und große Unterschiede in der Domänenstruktur⁴. Sie besitzen bei neutralem pH im Elutionspuffer eine vergleichbare Zahl von negativen Ladungen, die sie in ihren EF⁵-hand konzentrieren. Bei der Elution an DEAE-Cellulose mit einem EDTA/EGTA-haltigen neutralen Puffer kann eine Bindung beider Untereinheiten aneinander aufgrund von Calciumionen ausgeschlossen werden. Weiterhin ist, da beide Proteine über mindestens 5 negativ geladene Zentren verfügen, eine Assoziation auf Grund ionischer Wechselwirkungen unwahrscheinlich.

Offensichtlich ist es so, daß die Untereinheiten wegen der vorhandenen gleichen Nettoladung gleichstark an DEAE binden und bei der Elution mit einem Kochsalzgradienten in den gleichen Fraktionen erscheinen. Begünstigend für eine hydrophobe Assoziation oder Reassoziation von Calpainuntereinheiten ist die hohe Salzkonzentration bei der Elution (siehe S. 8). Einen bestätigenden Hinweis auf die Annahme, daß die Untereinheiten wegen der EF-hand-motivs binden, geben Autrice et al. (179). Sie eluieren Calmodulin, ein Protein mit 4 EF-hand, von DEAE-Cellulose unter vergleichbaren Bedingungen.

Aus diesen Überlegungen heraus ergeben sich zwei Schlußfolgerungen:

Die Calpain-Untereinheiten binden an positiv geladene Ionen und wahrscheinlich können sie unabhängig voneinander binden. Für die Verhältnisse in Zellen unter physiologischen Bedingungen ergibt sich, da die Konzentration an freien Calciumionen im Cytosol gering ist (weniger als 1 μ M), daß Calpain sich sehr wahrscheinlich dort anlagert, wo Ca²⁺ höher konzentriert vorliegt, z.B. am Cytoskelett. Diese Annahme bestätigt sich in den cytochemischen Darstellungen von Calpain (siehe S. 64-74).

Weiterhin muß angenommen werden, daß enzymatisch aktives Calpain im Cytosol nicht frei beweglich ist, wofür es ebenfalls Hinweise gibt (siehe 3.1.4.4 S. 84).

³ DEAE: "1. Abk. für den in Polyhydroxy-Verb. eingeführten *elektropos.* O-2-Diethylaminoethyl-Rest in z.B. Cellulose. Die teils wasserlösl., teils quellbaren u. in Perlform im Handel befindlichen Prod. werden verwendet als Ionenaustauscher ... – 2. Diethylaminoethyl-Deriv. von Kieselgel für die HPLC u. Affinitätschromatographie."(13)

⁴ CL hat die Domänen I und III mit unbekannter Wirkung, II mit der Papain-Protease und IV mit 5 EF-hand

CS hat die Domänen IV´ mit 5 EF-hand und *V mit einem großen hydrophoben Abschnitt* (siehe Einleitung 2. Calpain - Molekülaufbau und aktuelle Ansichten zur Aktivität)

⁵ EF-hand-Strukturen haben eine optimale Geometrie speziell für eine Komplexbindung des Ca²⁺ (wie EDTA, EGTA). Sie wurde erstmals bei Calmodulin beschrieben.

3.2.3 Hinweise auf die Ablagerung von Ca²⁺ und Phosphat im Cytoskelett

Postulat: Die EF-hand-Struktur fungiert im Falle von m-Calpain als ein Haftmechanismus. Dessen Bindungskraft wird durch elektrische Felder zwischen positiv geladenen Ionen, z.B. Ca^{2+} , und negativen Proteinresten bei einer gleichzeitigen optimalen Komplexbindung des Ca^{2+} erzeugt. Daraus ergibt sich, daß Calpain bei Anwesenheit von Ca^{2+} mit großer Wahrscheinlichkeit an Calciumbindende Moleküle adhärieren kann. Ziele in der Zelle können Ca^{2+-} speichernde/präsentierende Moleküle, z.B. im Cytoskelett sein. Dies würde erklären, warum in der immuncytochemischen Darstellung des Calpains in Linsenepithelzellen immer Cytoskelettelemente zu sehen sind.

Für die Annahme, daß Calcium am Cytoskelett gebunden wird, sprechen einige neue Erkenntnisse über Calciumstores von Lange et al.(28) und Strzelecka-Gołaszewska et al.(32). Mikrovilli von HIT-Zellen und Ratten-Hepatocyten haben Calciumdepots. In Vesikeln, gebildet aus Mikrovilli durch sanfte Scherkräfte, wird ein passiver Flux von Ca²⁺, ATP und IP₃ aufgrund von Ionenkanälen erzeugt. Dabei deutet alles darauf hin, daß eine Ca²⁺-Einlagerung durch eine ATP-abhängige Ca²⁺-Bindung an intravesikuläre Komponenten stattfindet. F-Actin wird als ein möglicher Kandidat herausgestellt. ATP-G-Actin bindet mit hoher Affinität Ca²⁺. Nach der Polymerisation zu F-Actin ist die Austauschrate für Ca2+ um den Faktor 10³ erniedrigt. Die Calciumionen sind faktisch dem zellulären Stoffwechsel entzogen. Es werden mit Mg/Ca-F-Actin erfolgreich Einlagerungsexperimente für Calciumionen durchgeführt. Das Binden von Calcium wird durch Ultraschall beschleunigt. Phalloidin hemmt die Calciumaufnahme und führt bei Ultraschall sogar zu einer Abgabe (als Hemmung der Reassoziation gedeutet). Der Hemmeffekt von Phalloidin ist vergleichbar mit anderen F-Actin-Stabilisatoren wie z.B. Vanadat, Phosphat, AlF₄, BF₃ (28).

ADP-F-Actin kann in vitro anorganisches Phosphat binden, wenn Phosphat in millimolaren Konzentrationen vorliegt. Weiterhin ist die Abspaltrate des Phosphates von F-ADP-P-Actin relativ gering. Das Nucleotid bindet in der Spalte zwischen den beiden Domänen eines Actinmonomers. Es geht eine hochaffine Beziehung (K_{diss} im nanomolaren Bereich) mit einem divalenten Kation ein, in vivo eher mit Mg²⁺ als Ca²⁺. Zusätzlich existieren noch mehrere mittel-(K_{diss}=10-100µM für Ca²⁺ und Mg²⁺) und wenigaffine (K_{diss}=0,1mM-1mM für Ca²⁺ und Mg²⁺) Bindungsstellen für Kationen (32).

Aus diesen Darstellungen geht hervor, daß Calciumionen in einem Teil des Cytoskelettes abgelagert werden. Dabei kommt es örtlich zu relativ hohen Konzentrationen an Ca²⁺. Es ist also gar nicht undenkbar, daß m-Calpain in der Zelle, in der im Cytosol weniger als 1 μ M freies Ca²⁺ vorliegt, voll aktiv sein kann. Es muß sich nur in der Nähe der Calciumspeicherorte aufhalten.

In den immuncytochemischen Untersuchungen wurde immer der Nachweis von Cytoskelett erbracht, wenn Calpain gesucht wurde. Aus den letzten Überlegungen wird ersichtlich, daß die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von m-Calpain dort am höchsten ist, wo seine Calciumaffinität abgesättigt wird – z.B. am F-Actin, einem calciumspeichernden Ort und Teil des Cytoskelettes.

3.3. Intrazelluläre Calciumhomöostase und abgeleitete Schlußfolgerungen

Nach Carafoli (19)

Höhere Organismen speichern oder lagern Calcium in Knochen und Zähnen als Hydroxylapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ab. Menschen haben durchschnittlich 1250g Calcium, davon entfallen außer auf Knochen und Zähne noch wenige Gramm auf intrazelluläre und extrazelluläre Flüssigkeiten.

In extrazellulären Flüssigkeiten findet man ca. 3mM Calcium, davon sind 50% ionisiert. Intrazellulär sind gemessene Gesamtkonzentrationen bei Erythrozyten 20 μ M, Axone 200-400 μ M, Herzzellen 4mM, Leberzellen 1,6mM und Hirnzellen 1,5mM. Davon sind 0,1% oder weniger ionisiert. Im Cytosol sollen 0,1 μ M und weniger freie Ca²⁺-Ionen vorliegen.

Eine entscheidende Eigenschaft von Calciumionen ist die sehr geringe Löslichkeit bei Anwesenheit von Phosphationen. Niedrige intrazelluläre Calciumkonzentrationen machen es möglich, phosphathaltige Verbindungen als Energietransporter und Energietauscher zu nutzen. Es wird davon ausgegangen, daß in der Zelle immer ein Reservoir an freien Phosphationen für die ATP-Synthese vorliegen muß.

Intrazellulär findet man hoch Ca²⁺-affine Verbindungen in Membranen und im Cytosol. Zwei prinzipielle Möglichkeiten, um den Calciumhaushalt niedrig zu halten, werden beschrieben:

- 1. Hochaffine intrazelluläre Moleküle, die in großer Menge vorliegen, binden Calcium schnell (z.B. Phosphationen, Nucleinsäuren, zwitterionische Phospholipide, negativ geladene Phospholipide). Für die Zellmembranen wird eine Halbsättigung von 0,3mM Ca²⁺ angegeben.
- 2. Eine langsame, aber effiziente Möglichkeit, die Ca²⁺-Konzentration zu erniedrigen, bilden die membranständigen calciumexportierenden Proteine (Calciumpumpen). Diese befördern Calciumionen gegen das Konzentrationsgefälle zwischen Cytosol (niedrig) und extrazellulärer Flüssigkeit (hoch) aus der Zelle.

Ein niedriger Ca²⁺-Spiegel im Cytosol führt dazu, daß Calciumionen für die Signalweiterleitung benutzt werde können. In der Evolution wurden scheinbar vor allem Moleküle für die Transduktion bevorzugt, die Ca²⁺ besonders gut binden können.

Diskussion der Ansichten von Carafoli und Einbeziehen der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Über die Löslichkeit von Ca²⁺, Mg²⁺ und Phosphat

In Zellen laufen alle Stoffwechselvorgänge entsprechend physikalischen und chemischen Gesetzmäßigkeiten ab. Wenn auch noch nicht alle Vorgänge der Homöostase von Calcium geklärt sind, so ist sicher, daß hier Konzentrationsgleichgewichte vorliegen und nach dem Einfluß von Störfaktoren sich erneut Gleichgewichte einstellen, nicht losgelöst vom stady state in Zellen, Organen, im Gesamtorganismus und komplexeren Systemen.

In eucaryotischen Zellen findet man zwei Salze, deren Ionen im Stoffwechsel Bedeutung haben:

- 1. Calciumphosphat
- 2. Trimagnesiumphosphat

Die Anionen dieser schwerlöslichen Salze, Phosphationen stellen einen Pool dar, der für die Bildung von z.B. ATP aus ADP benötigt wird. Sie sind auch in anderen Lipiden, Kohlehydraten, Eiweißen und nicht zuletzt in Nucleotiden, den finden. Calciumionen spielen Nucleinsäuren zu eine Rolle bei der Signaltransduktion, aber auch bei der Aktivierung von Calpain. Magnesium und Calcium sind z.B. an der Ausbildung von F-Actin, einem Teil des Cytoskelettes beteiligt.

Das Löslichkeitsprodukt L von Ca₃(PO₄)₂ in Wasser beträgt bei 25°C 10⁻²⁵mol⁵l⁻⁵. Es können sich unter stöchiometrischen Verhältnissen maximal ca. 4μ M Calciumphosphat in Wasser lösen.

$$L_{mn} = \left(\frac{Lm}{m^{m}*n^{n}}\right)^{\frac{1}{m+n}} = \text{molare Löslichkeit}$$
$$L_{Ca_{3}(PO_{4})_{2}} = \left(\frac{10^{-25}}{3^{3}*2^{2}}\right)^{\frac{1}{3+2}} = 3,92*10^{-6} \text{ M} = 3,92 \mu \text{M}$$

Steigt die gelöste Konzentration einer Ionenart über diesen Wert, so sinkt die des Partnerions. Für die Zelle bedeutet dies: Ist zuviel freies Phosphat im Cytosol vorhanden, strebt das gelöste Ca²⁺ gegen Null. Gleichzeitig wird wegen der Gleichgewichtslage sehr wahrscheinlich die Phosphorylierungsreaktion aufgrund vorhandener Kinasen und die Bildung von Nucleotidphosphaten z.B. ATP aus ADP + P stimuliert.

Ist Ca²⁺ im Überschuß vorhanden, so fehlt zwangsläufig freies Phosphat. Die Kinasen in der Zelle bewirken die Dephosphorylierung zugänglicher phosphorylierter Verbindungen. Das Gleichgewicht von ATP \square ADP+P ist in Richtung ADP+P gedrängt und ATP zerfällt infolge von Kinasewirkung (ATP reagiert stark exergon Δ G°= - 33kJmol⁻¹).

Über die angenommene Förderung von Ca²⁺ aus der Zelle gegen einen Calciumgradienten

Es gibt einen klar nachweisbaren Gradienten von freien Ca²⁺-Ionen zwischen Cytosol (<1 μ M) und extrazellulärem Raum (>1mM) (19). Die Gründe für die Ungleichverteilung sind in der Möglichkeit der Ionen, sich zu lösen zu finden (siehe oben).

Membranen sind ungleich an Innen-und Außenseite. Innen sind sie negativ geladen, man findet negativ geladene (saure) Phospholipide (20). Diese könnten Ca²⁺ binden oder zumindest hier konzentrieren, möglicherweise in einer unlöslichen Form.

In Zellmembranen wurde ein Gehalt von 0.3mM Ca²⁺ kalkuliert (19). Es ist nicht davon auszugehen, daß die Calciumionen gleichmäßig verteilt sind, sondern diese werden sich dort konzentrieren, wo sie auf negative Ladungen treffen. Dabei spielen saure Phospholipide und calciumbindende Proteine eine Rolle. Weiterhin ist zu den 0.3mM Ca²⁺ in der Zellmembran zu sagen: Bezieht man den Calciumgehalt auf das der Membran statt auf das Volumen der Zelle. Volumen SO sind Calciumkonzentrationen größer als 1mM durchaus erklärbar. Wie beim Cytoskelett ist auch an der Innenseite der Zellmembran mit einer hohen Calciumkonzentration zu rechnen. Diese könnte auch zu einer Konzentrierung von Calpain und anderen calciumbindenden Molekülen führen.

Wenn an der Innenseite der Zellmembran aufgrund der Ungleichverteilung von Phospholipiden und Proteinen die Calciumionenkonzentration viel höher sein kann als im Cytoplasma, und dieses Ungleichgewicht stabil ist, so wird z.B. eine Calciumpumpe keinen großen Gradienten zu überwinden haben. Es ist denkbar, daß die Transportfunktion eher der eines Ionophors gleicht, evtl. mit der Einschränkung, daß für die Funktion eine Strukturveränderung, ausgelöst durch einen Phosphat-Rest nötig ist, durch welche Ca²⁺ binden kann. Eine solche Deformation würde zur Bevorzugung einer Richtung der Reaktion führen, vergleichbar mit einer Diode, die den Sromfluß in eine Richtung hemmt, weil in einer der beiden möglichen Stromrichtungen die Ladungsträger am PN-Übergang⁶ verarmen.

Sehr interessant ist die Tatsache, daß die Ca²⁺-ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums in der Lage ist, bei Umkehrung des Ca²⁺-Gradienten ATP zu bilden (42). Dies deutet darauf hin, daß derartige Pumpen tatsächlich wie Katalysatoren betrachtet werden müssen, welche lipophil sind und die ATP-Bildung aufgrund eines Ionengradienten oder elektrischer Felder und der intrazellulären Gleichgewichtslage von ATP und ADP+P katalysieren.

⁶ PN-Übergang: Grenze der positiv und negativ leitenden Siliciumschicht in Halbleitern. 91

3.4 Vergleich eigener Ergebnisse mit den Befunden von Suzuki und Sorimachi (40)

1. Wichtige Diskussionspunkte zur Problematik der Aktivierung von Calpain aus der Arbeit von Suzuki und Sorimachi

1. Die Proteasedomäne II (Teil der 80K-Untereinheit) könnte möglicherweise auch ohne Calcium aktiv sein. Calcium wäre dann nur für die Strukturbildung und/oder -erhaltung notwendig, nicht für die enzymatische Aktivität. Dem widerspricht, daß ein Calcium-unabhängiges aktives Calpain noch nicht beobachtet wurde, weder nach Autolyse noch nach einer proteolytischen Einwirkung anderer Enzyme.

Bei einem Expressionsexperiment konnte aber gezeigt werden, daß ein genetisch verändertes Calpain aus E.coli ohne Ca^{2+} 44% der ursprünglichen Aktivität hat, d.h. die Domäne II (Protease) ist nötig für die Protease-Aktivität, und die Domäne IV (EF-hands) nicht.

2. Die kleine Untereinheit 30K (CS) hat nach neueren Röntgenuntersuchungen fünf EF-hand-Motive. Die fünfte EF-hand bindet nicht Ca²⁺, sondern in vitro ein zweites Molekül zu einem Homodimer. Daraus wird folgendes Modell abgeleitet: Die Domänen IV und IV` interagieren miteinander.

3. In Übereinstimmung mit diesem Modell gehen nach Abspalten von 8-10 Aminosäureresten vom C-Terminus beider Untereinheiten die Aktivität und die Fähigkeit zur Dimerbildung verloren. Bei Untersuchungen mit exprimierten Mutanten geht nach der Entfernung von 22-25 Aminosäureresten der Domäne VI´ die Möglichkeit der Rekonstitution zu aktivem Calpain verloren. Daraus wird geschlossen, daß das fünfte EF-hand-Motiv für die Bildung von Homodimeren und Heterodimeren verantwortlich ist.

4. Die für halbmaximale Aktivität von Calpain erforderliche Ca²⁺-Konzentration in vitro reicht bei μ -Calpain von 5...50 μ M und bei m-Calpain von 200-1000 μ M Ca²⁺. Trotzdem scheinen beide Calpaine bei der physiologischen Ca²⁺-Konzentration von 100...300nM aktiv zu sein.

5. Scheinbar reicht Ca²⁺ allein für die Aktivierung in vivo nicht aus. Und in der Tat sind Aktivatoren beschrieben, die die Calciumempfindlichkeit erhöhen. In letzter Zeit wurden Aktivator-Proteine beschrieben, unabhängig für μ -und m-Calpain, die die Ca²⁺-Sensitivität um den Faktor 10 und mehr erhöhen. Es existiert eine calciumabhängige Bindung an Membranen.

6. Phospholipide, besonders saure Phospholipide reduzieren stark die notwendige Calciumkonzentration für eine Autolyse und somit auch für die Aktivität. In ihrer Gegenwart wird μ -Calpain scheinbar voll aktiv bei mikromolarer und geringerer Calciumkonzentration, m-Calpain dagegen nicht.

7. Andere Aktivatoren, u.a. auch DNA wurden beschrieben. Die Wirkungsweise von DNA ist jedoch unklar.

8. Autolyse erhöht die Calciumempfindlichkeit von Calpain. Ein Problem ist, daß die Autolyse eine höhere Initialkonzentration an Ca²⁺ als physiologisch beschrieben erfordert. Eine vorgeschlagene Calpainkaskade klingt interessant, ist aber unvereinbar mit neueren Ergebnissen. Argumente bleiben bestehen, die anzweifeln lassen, ob die Autolyse für die Erhöhung der Calciumsensitivität in vivo überhaupt nötig ist. Molinari et al. berichten über die Hydrolyse von Ca²⁺-ATPase und Bande 3-

Protein, wenn Calpain intakt bleibt.⁷ Zusammenfassend meinen die Autoren, daß eine vorherige Autolyse nicht notwendig zu sein scheint für die Proteaseaktivität.

9. Untersuchungen der Dissoziation und Reassoziation von Calpain haben gezeigt, daß das Protein in Gegenwart von Ca²⁺ dissoziiert und CL (80K) die volle Enzymaktivität behält. Das gleiche Ergebnis erhält man bei der Expression von CL ohne Co-Expression von 30K.

10.Die Untereinheiten CL und CS, und demzufolge auch die Domänen IV und IV sind instabil und tendieren zur Aggregatbildung (Homodimere, Heterodimere). Sie sind nach Dimerbildung stabil. Die exakte Ca²⁺-Konzentration für eine Dissoziation in vivo ist bisher nicht bestimmt worden.

11.Die Dissoziation von Calpain in CL und CS könnte eine Konsequenz der Autolyse sein. Wenn aber dissoziiertes CL voll aktiv ist, so ist eine Autolyse keine Vorbedingung für die Aktivierung.

12.Das heißt, eine Autolyse ist wichtig für die Aktivierung in Form der Dissoziation, aber sie ist nicht ausreichend. Eine wirkliche Aktivierung erfordert die Dissoziation in die Untereinheiten. Daraus ergibt sich ein neues Modell der Aktivierung; es kombiniert die Membranaktivierung mit der Dissoziation.

13.Beim "Dissoziationsmodell" ist die Frage nach der Calciumkonzentration zumindest für m-Calpain ungeklärt.

14. Dissoziierte CL oder CS wurden in vivo nicht identifiziert.

15.Folgende Widersprüche in den Ergebnissen werden dargelegt:

- Beide Untereinheiten (CL und CS) von μ und m-Calpain werden in Gegenwart von Ca²⁺ mit monoklonalen Antiseren, die gegen nur eine Untereinheit gerichtet sind, kopräzipitiert.
- Röntgenstrukturuntersuchungen der Domäne IV´ zeigen eine Dimerbildung sowohl mit als auch ohne Ca²⁺.
- Aber: Calpain dissoziiert in Gegenwart von Ca²⁺.

2. Eigene Auffassungen und kritische Diskussion der beschriebenen Ergebnisse

1. Die wichtigste unbeantwortete Frage ist noch immer, wie es bei den Calciumkonzentrationen von unter $1\mu M$ in vivo zu einer Aktivität von Calpain, speziell m-Calpain kommen kann. Alle alten und neuen Modelle haben die Erklärung dieses Phänomens zum Ziel, so auch die diskutierte Arbeit von Suzuki et al (40).

2. In Punkt "3." wird beschrieben, daß eine Aktivierung von Calpain nach bisherigen Modellen in vivo kaum vorstellbar ist. Die Ca²⁺-Konzentrationen für eine Aktivierung in vitro unterscheiden sich von denen in vivo um die Faktoren 10^{1} - 10^{2} bei μ -Calpain und mehr als 10^{3} bei m-Calpain.

⁷ Bande 3-Protein: (Anionen-Austausch-Protein). In großer Zahl vertretenes integrales Erythrocyten-Membranprotein vom MG. 90000–100000 (Glykoprotein, einzelne Polypeptid-Kette, Sequenz bekannt), so benannt nach seiner elektrophoretischen Beweglichkeit, das über Ankyrin u. Spectrin mit dem Membranskelett (s. Cytoskelett) verbunden sein kann, aber auch mit bestimmten anderen Proteinen Wechselwirkungen eingeht und außerdem einen Anionen-Transportkanal besitzt, durch den Hydrogencarbonat- gegen Chlorid-Ionen ausgetauscht werden (Antiport) (13).

In Punkt "4." äußert Suzuki die Annahme und Befunde aus der hier vorgelegten Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, daß Calpain bei physiologischer Konzentration von Ca²⁺ aktiv ist.

Alle Arbeiten, die Calpain mittels eines oder mehrerer Inhibitoren in vivo "nachweisen", gehen stillschweigend von dieser Tatsache aus.

Dabei sind nur 2 Fragen offen:

- nach einem eindeutigen synthetischen Calpaininhibitor und
- nach der Aktivität bei physiologischen Calciumkonzentrationen im Cytosol.

Es ist wichtig zu berücksichtigen, daß sich die Aussagen über den Calciumgehalt in Zellen immer auf das Cytosol beziehen. Und sie treffen zu für ein Calpain, welches sich frei im Cytosol bewegen kann. Eine Möglichkeit, daß Konzentrationsunter-schiede des Ca²⁺ innerhalb des Cytosols vorliegen können, wird nicht diskutiert.

Im Abschnitt über die Calciumhomöostase (siehe S. 89 ff.) wird dargelegt, daß sich im Cytosol einer Zelle weitaus mehr Ca²⁺ befinden kann, als das nachweisbare gelöste Ion. Ca²⁺ unterliegt einem Lösungsgleichgewicht mit Phosphationen und wahrscheinlich auch mit Phosphat-haltigen Verbindungen; darauf deuten die aktivierenden Eigenschaften vieler "Phosphat-haltiger" organischer Verbindungen auf Calpain hin (s.u.).

Daraus kann folgende Aktivitäts-Modellvorstellung hergeleitet werden:

- Ein in der Zelle freibewegliches Calpain ist unwahrscheinlich, da Versuche mit Calpain-Inhibitoren in vivo darauf hin deuten, daß es bei cytosolischen Calciumkonzentrationen aktiv ist.
- Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen im Vergleich zu in vitro-Versuchen für ein *nicht* freibewegliches, weil am Cytoskelett adhäriertes Calpain (siehe SS. 42 f., 64 ff.). Dies bedeutet, Calpain haftet am Cytoskelett, weil es hier Calciumionen vorfindet. Zwangsläufig wird es hier aktiv, da die lokale Konzentration von Ca²⁺ stabil und ausreichend hoch ist.

3. Dieses Modell steht im Einklang mit der Aussage, daß ein calciumunabhängiges Calpain bis heute nicht gefunden wurden (siehe Punkt 1., S.92).

4. Für eine gewisse Unabhängigkeit der EF-hand-Domäne IV von der Protease-Domäne II sprechen die Befunde mit E.coli (40). Diese Ergebnisse passen gut in eigene ultrastrukturelle Befunde mit AFM. Dabei wird angenommen, daß eine funktionelle Unterteilung des Moleküls in einen Calciumionen-abhängigen Haftapparat und eine Protease besteht. Die in ihrer Funktion unaufgeklärte Domäne III könnte dabei einen Spacer bilden.

5. Das Membran-Aktivierungsmodell von Suzuki geht von einer, wenn auch temporären Bindung des Calpain an eine Membran aus. Dabei sollen die zwei Untereinheiten dissoziieren und an Calciumsensivität gewinnen.

Die von Suzuki aufgezählten Befunde in Punkt "7." lassen eine Dissoziation in vivo überhaupt fraglich erscheinen. CL und CS wurden in vivo dissoziiert nicht nachgewiesen. Außerdem werden die Untereinheiten CL und CS in Gegenwart von Ca²⁺ mit monoklonalen Antiseren immer kopräzipitiert. Die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse sprechen ebenfalls gegen eine Dissoziation.

6. Unter den Aktivatoren sind Proteine und Phosphat-haltige Verbindungen erwähnt. Speziell saure Phospholipide und DNA werden genannt (siehe S. 92: Punkt 6, 7). Entsprechend unseren Modellvorstellungen binden die Phosphat-haltigen Verbindungen Ca^{2+} . Dieses ist eine Initialreaktion für die Anlagerung von Phosphatsalzen mit divalenten Kationen, da diese extrem schwer löslich sind. Die Konzentration von Ca^{2+} wird hier im Verhältnis zum Cytosol hoch und durch die Dissoziationskonstante auch beständig, so daß eine vollständige Aktivierung von m-Calpain in vivo ohne Aktivator in der Nähe der Moleküle denkbar ist.

7. Der Zusammenhang zwischen EDTA, sauren Phospholipiden, DNA und anderen Phosphat-haltigen Verbindungen als Aktivatoren ist wahrscheinlich in der Möglichkeit zu finden, Ca²⁺ zu konzentrieren durch koordinative Bindungen und andere, weniger affine Anlagerungen. Ca²⁺ wird möglicherweise in der Zelle von Phosphationen in diese Bindungen gedrängt. Organische Phosphatverbindungen würden dann "Kristallisationskeime" für Calcium- und Phosphationen bilden.

8. Die Frage nach der Notwendigkeit einer Autolyse des Calpain für dessen Aktivierung wird nach dem eben diskutierten Modell hinfällig. Selbst m-Calpain braucht für seine Aktivierung keinen extra-Mechanismus. Auch Suzuki et al. folgern, daß die Autolyse nicht der aktivitätssteigernde Schritt ist. Zum gleichen Ergebnis kommen Molinari et al., die nachweisen, daß die Aktivität von μ -Calpain an Erythrozyten-Membranen nicht an eine Autolyse gebunden ist (79).

9. Eine andere interessante Entdeckung für die Aktivierung von Calpain in vivo finden Arora et al. 1996. Sie weisen nach, daß ohne einen Anstieg der Calciumkonzentration im Cytosol während einer Anoxie die Calpainaktivität sich verdoppelt. Dies war nicht an einen Anstieg der Calpain-mRNA oder eine Erniedrigung der Calpastatin-mRNA gebunden (34).

Es liegt hier der Verdacht nahe, daß die Anoxie in betroffenen Hepatocyten mit einer Erniedrigung des intrazellulären pH einhergeht. Dabei werden wahrscheinlich die sonst schwerlöslichen Calcium- und Magnesiumsalze des Phosphats partiell löslich. Ein Anstieg der Konzentration freier Calcium-und Phosphationen im Cytosol ist die Folge. Diese wiederum könnten die Calpainaktivität begünstigen.

10.In dem vorgestellten Modell ist die Frage nach dem endogenen Inhibitorprotein Calpastatin völlig offen. Calpastatin inhibiert sehr spezifisch in vitro bei Calciumkonzentrationen, die Calpain aktivieren. Seine Wirkung in vivo und Beziehungen zu anderen Proteinen sind noch unklar.



3.5 Aktivierungsschema von m-Calpain an Mikrofilamenten

Schema 4: Aktivierungsmechanismus für m-Calpain an Mikrofilamenten in Linsenepithelzellen: m-Calpain ist in Lösung nicht aktiv wegen Calciummangel; ATP-G-Actin assoziiert zu ADP/P-F-Actin unter Einlagerung divalenter Ionen (Mg²⁺, Ca²⁺), wobei Phosphat sehr langsam abgespalten wird oder – zu einer Bindung von weiterem Ca²⁺ und/oder Mg²⁺ führt, welches dann "ausfällt". An diese hochkonzentrierte unlösliche Calciumschicht bindet der Calpain-Calpastatinkomplex und wird automatisch aktiv.

Bei dieser Darstellung wird berücksichtigt:

- 1. Actinfilamente sind offensichtlich kein Substrat für Calpain (23).
- 2. Actin-bindende Proteine sind Substrate des Calpain (29).
- 3. Linsenepithelzellen besitzen im Cytosol weniger als 1µM gelöste Calciumionen.
- Calpain ist in Linsenepithelzellen aktiv trotz cytosolischer Konzentration des Ca²⁺ von weniger als 1µM
- 5. Calciumionen können in Mikrofilamenten scheinbar in großer Menge gespeichert werden (28).
- 6. Die Speicherung erfolgt in einer unlöslichen Form d.h. Calciumionen werden dem System entzogen.
- 7. Eine Form ist sehr wahrscheinlich Calciumphosphat. In allen eucaryotischen Zellen ist ATP ein wichtiges Handlingprinzip für Energie. Es muß Phosphat als Pool in der Zelle vorhanden sein. In Gegenwart von Phosphationen ist die Löslichkeit von Ca²⁺ in Wasser sehr begrenzt (3,92µM bei stoichiometrischer Konzentration von Ca²⁺ und (PO₄)³⁻). Dieser Wert kommt dem gelösten Ca²⁺ im Cytosol schon recht nahe. Trotz der Möglichkeit, Ca²⁺ und (PO₄)³⁻ in einem großen Pool zur Verfügung zu haben, ist die tatsächlich verfügbare Ionenkonzentration gering und regelt sich automatisch über eine Löslichkeitskonstante.
- 8. Die 30K-Untereinheit von Calpain ist ein Chaperonin, sie besitzt eine hydrophobe Domäne (V) und ist wahrscheinlich über diese an die 80K-Untereinheit gekoppelt. Die Verbindung der Untereinheiten über EF-hand-motivs ist unwahrscheinlich, da nCL-1 und nCL-2 keine Bindung mit 30K eingehen, sehr wohl aber über EF-hand verfügen (27).

Literatur

- 1. SASAKI; T.; KIKUCHI; T.; YUMOTO; N.; YOSIMURA; 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.* 259 (1984), 12489-12494
- 2. KIRSCHKE, H., WIEDERanders, B.: Azocasein. Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Proteinasen In: Kongress und Tagungsberichte der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) (1984), 27-28
- 3. LOWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.F.: Protein mesurement with folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951), 265-275
- 4. GUROFF; G.: A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* 239 (1964), 149-155
- 5. DAHLMANN; B.; KUEHN; L.; RUTSCHMANN; M.; REINAUER; H.: Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle. *Biochem. J.* 228 (1985), 161-170
- 6. RASER; K.J.; POSNER; A.; WANG; K.K.W.: Casein zymography: A method to study μ-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 319 (1995), 211-216
- MELLGREN; R.L.: Canine Cardiac Calcium-dependent proteases: resolution of two forms with different requirements for Calcium. *FEBS Letters* 109 (1980), 129-133
- 8. SUZUKI; K.; TSUJI; S.; KUBOTA; S.; KIMURA; Y.; IMAHORI; K.: Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J. Biochem.* 90 (1981), 275-278
- 9. MURAKAMI; T.; HATANAKA; M.; MURACHI; T.: The cytosol of human erythrocytes contains a highly Ca²⁺-sensitive thiol protease (Calpain I) and its specific inhibitor protein (Calpastatin). *J. Biochem.* 90 (1981), 1809-1816
- 10. WAXMAN; L.; KREBS; E.G.: Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 253 (1978), 5888-5891
- 11. MURACHI; T.: Intracellular Ca²⁺ protease and its inhibitor protein: Calpain and calpastatin. *Calcium and Cell Function, Ed. W.Y. Cheung, Academic Press,Inc.* IV (1983), S. 377-410
- 12. ROSSER; B.G.; POWERS; S.P.; GORES; G.J.: Calpain activity increases in hepatocytes following additon of ATP demonstration of a novel fluorescent approach. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 23593-23600
- 13. FALBE; J.; REGITZ; M.: *CD Römpp Chemie Lexikon auf CD-ROM*, Version 1.0, 9.Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York (1995)
- 14. GLANZ; D.; GLÄSSER; D.; LENNARZ; B.; NGUYEN; N.; IWIG; M.: Low concentrations of cis-Linoleic acid induces intracellular Calcium rise and cell damage in bovine lens epithelial cells. *Nova Acta Leopoldina* 299 (1997), 113-120
- 15. JAHREIS; G.; SMALLA; K.; FITTKAU; S.: Synthese von substratanalogen Peptidchlormethylketonen als potentielle irreversible Enzyminhibitoren. *J. f. prakt. Chemie* 326 (1984), 41-47
- 16. HOFFMANN; E.: Katalyse und Enzyme. In: *Enzyme und Bioenergetik* Akademie-Verlag Berlin (1979), S. 11-12

- 17. WAGNER, U., LACHMANN, I., HÄDGE, D. und K. DRÖBLER: Development and characterization of monoclonal antibodies specific for two different exoproteases of Aeromonas salmonicida. *Journal of Fish Diseases* 20 (1997), 223-235.
- 18. BAKOWSKY; U.: Herstellung, Funktionalisierung und physikochemische Charakterisierung von substratgestützten Oberflächen *Dissertation* (1997), MLU-Halle Institut für Pharmazie
- 19. CARAFOLI, E.: Intracellular Calcium homeostasis Ann. Rev. Biochem. 56 (1987), 395-433
- 20. KOOLMAN, J., RÖHM, K.-H.: Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1994), S. 188, 202
- 21. WEHNER, R., GEHRING, W.: *Zoologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 22.Auflage (1990), S. 18-24
- 22. IWIG, M.: Alteration of the Cytoskeleton of Lens Epithelial Cells and its Effects on DNA-, RNA- and Proteinsynthesis. *Nova Acta Leopoldina* 299 (1997), 185-198
- 23. DARNELL, J., LODISH, H., BALTIMORE, D.: Molekular Cell Biology, Scientific American Books, Inc., second Edition (1990), S. 815-902, 881-884
- 24. ISHIJIMA, S., WITMAN, G.B.: Demembranation and Reactivation of Mammalian Spermatozoa from Golden Hamster and Ram. *Methods in Enzymology*, 196 (1991), 417-428
- 25. SUZUKI; K.; OHNO; S.; EMORI; Y.; IMAJOH; S.; KAWASAKI; H.: Calcium-activated neutral protease (CANP) and its biological and medical implications. *Clin. Biochem. Med.* 5 (1987), 43-65
- 26. MURACHI; T.: Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem. Internat.* 18 (1989), 263-294
- 27. SUZUKI; K.; SORIMACHI; H.; YOSHIZAWA; T.; KINBARA; K.; ISHIURA; S.: Calpain: Novel family members, activation, and physiological function. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376 (1995), 523-529
- 28. LANGE; K.; BRANDT; U.: Calcium storage and release properties of F-actin: evidence for the involvement of F-actin in cellular calcium signaling. *FEBS Letters* 395 (1996), 137-142
- 29. ANDERSON; M.; SJÖSTRAND; J.; KARLSSON; J.-O.: Calpain in the human lens: Relations to the membranes and possible in cataract formation. *Ophthalmic. Res.* 28 (1996), 51-54
- 30. COOPER, J.A.: Actin filament assembly and organisation in vitro ; In: *The Cytoskeletton A Practical Approach, Carraway, K.L., Carraway, C.A.C.*, Oxford University Press (1992), S. 47-71
- 31. AZUMA; M.; FUKIAGE; C.; DAVID; SHEARER, L.L.; T.R.: Activation of calpain in lens: A review and proposed mechanism. *Exp. Eye Res.* 64 (1997), 529-538
- 32. STRZELECKA-GOŁASZEWSKA, H., WOŽNIAK, A., HULT, T., LINDBERG, U.: Effects of the type of divalent cation, Ca²⁺ or Mg²⁺, bound at the high-affinity site and of the ionic composition of the solution on the structure of F-actin. *Biochem. J.* 316 (1996), 713-721
- 33. BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D., WOESSNER, J.F.: Handbook of Proteolytic Enzymes on CD, Academic Press (1998) Abschnitt 218-220

- 34. ARORA; A.S.; DE-GROEN; P.; EMORI; Y.; GORES; G.J.: A cascade of degradative hydrolase activity contributes to hepatocyte necrosis during anoxia. *Am. J. Physiol.* 270 (1996), G238-G245
- 35. WOO; K.M.; CHUNG; W.J.; HA; D.B.; GOLDBERG; A.L.; CHUNG, C.H.: Protease Ti from Escherichia coli requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides. *J. Biol. Chem.* 264 (1989), 2088-2091
- 36. MURRAY; E.J.B.; TRAM; K.K.-T.; MURRAY; S.S.; LEE; D.B.N.: Parathyroid hormone-induced retraction of MC3T3-E1 osteoblastic cells is attenuated by the calpain inhibitor N-Ac-Leu-Leu-Norleucinal. *Metabolism* 44 (1995), 141-144
- 37. LIU; C.; HERMANN; T.E.: Characterization of Ionomycin as a Calcium Ionophore. *J. Biol. Chem* 253 (1978), 5892-5894
- 38. SORIMACHI; H.; ISHIURA; S.; SUZUKI; K.: Structure and physiological function of calpains. *Biochem.J.* 328 (1997), 721-732
- 39. KINBARA; K.; SORIMACHI; H.; ISHIURA; S.; SUZUKI; K.: Skeletal muscle-specific calpain, p94. Structure and physiological function. *Biochem. Pharmacol.* 56 (1998), 415-420
- 40. SUZUKI; K.; SORIMACHI; H.: A novel aspect of calpain activation. *FEBS Letters* 433 (1998), 1-4
- 41. IKURA; M.: Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *TIBS* 21 (1996), 14-17
- 42. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 13.Auflage (1988), S. 297-312
- 43. MEYER; W.L.; FISCHER; E.H.; KREBS; E.G.: Activation of muscle phoshorylase b kinase by Ca²⁺. *Biochemistry* 3 (1964), 1033-1039
- 44. INOUE; M.; KISHIMOTO; A.; TAKAI; Y.; NISHIZUKA; Y.: Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.* 252 (1977), 7610-7616
- 45. ISHIURA; S.; MUROFUSHI; H.; SUZUKI; K.; IMAHORI; K.: Studies of a calciumactivated neutral protease from chicken skeletal muscle I. Purification and characterization. *J.. Biochem.* 84 (1978), 225-230
- 46. SUZUKI; K.: Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed. Biochim. Acta* 50 (1991), 483-484
- 47. MOLINARI; M.; MAKI; M; CARAFOLI; E.: Purification of m-calpain by a novel affinity chromatography approach. New insights into the mechanism of the interaction of the protease with targets.. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 14576-14581
- 48. ANAGLI; J.; VILEI; E.M.; MOLINARI; M.; CALDERARA; S.; CARAFOLI; E.: Purification of active calpain by affinity chromatography on an immobilized peptide inhibitor. *Eur. J. Biochem.* 241 (1996), 948-954
- 49. MEYER; S.L.; Bozyczko-COYNE; D.; MALLYA; S.K.; SPAIS; C.M.; BIHOVSKY; R.; KAWOOYA; J.K.; LANG; D.M.; SCOTT; R.W.; SIMAN; R.: Biologically active monomeric and heterodimeric recombinant human calpain I produced using the baculovirus expression system. *Biochem. J.* 314 (1996), 511-519

- 50. SUZUKI; K.; SORIMACHI; H.; YOSHIZAWA; T.; KINBARA; K.; ISHIURA; .: Calpain: Novel family members, activation, and physiological function. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376 (1995), 523-529
- 51. SAIDO; T.C.; SORIMACHI; H.; SUZUKI; K.: Calpain: New perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 9 (1994), 814-822
- 52. SORIMACHI; H.; KINBARA; K.; KIMURA; S.; TAKAHASHI; M.; ISHIURA; S.; SASAGAWA; N.; SORIMACHI; N.; SHIMADA; H.; TAGAWA; K.; MARUYAMA; K.; SUZUKI; K.: Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 31158-31162
- 53. SORIMACHI; H.: Calpain p94 and limb-girdle muscular dystrophy. *ICOP Newsletter* (1996), 1-2
- 54. GLÄSSER; D.: Enzymologische und enzymimmunologische Untersuchungen zur Zelldifferenzierung in Augenlinsen. *Nova Acta Leopoldina* 36 (1971), Nr. 197, 11-152
- 55. FENTEANY; G.; Stanaert; R.F.; LANE; W.S.; CHOI; S.; COREY; E.J.; SCHREIBER; S.L.: Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268 (1995), 726-731
- 56. CHU-PING, Ma; SLAUGHTER; C.A.; DEMARTINO; G.N.: Purification and charactrization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain). *Biochim. Biophys. Acta* 1119 (1992), 303-311
- 57. MELLGREN; R.L.: Specificities of cell permeant peptidyl inhibitors for the proteinase activities of □-calpain and the 20 S proteasome. J. Biol. Chem. 272 (1997), 29899-29903
- 58. MORI; S.; TANAKA; K.; OMURA; S.; SAITO; Y.: Degradation process of ligandstimulated platelet-derived growth factor β-receptor involves ubiquitinproteasome proteolytic pathway. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 29447-29452
- 59. TAWA; N.E.JR.; ODESSEY; R.; GOLDBERG; A.L.: Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J. Clin. Invest.* 100 (1997), 197-203
- 60. FIGUEIREDO-PEREIRA; M.E.; BERG; K.A.; WILK; S.: A new inhibitor of the chymotrypsin-LIKE activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *J. Neurochem.* 63 (1994), 1578-1581
- 61. COUX; O.; TANAKA; K.; GOLDBERG; A.L.: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996), 801-847
- 62. RIVETT; A.J.: Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.* 291 (1993), 1-10
- 63. WENZEL; T.; BAUMEISTER; W.: Thermoplasma acidophilum proteasomes degrade partially unfolded and ubiquitin-associated proteins. *FEBS Letters* 326 (1993), 215-218
- 64. DRISCOLL; J.; GOLDBERG; A.L.: The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J. Biol. Chem.* 265 (1990), 4789-4792

- 65. TSUBUKI; S.; SAITO; Y.; TOMIOKA; M.; ITO; H.; KAWASSHIMA; S.: Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of dileucine and tri-leucine. *J. Biochem.* 119 (1996), 572-576
- 66. GOLDBERG; A.L.; ROCK; K.L.: Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357 (1992), 375-379
- 67. HILT; W.; WOLF; D.H.: Proteasomes: destruction as a programme. *TIBS* 21 (1996), 96-102
- 68. CHEN; F.; LU; Y.; KUHN; D.C.; MAKI; M.; SHI; X.; SUN; S.C.; DEMERS; L.M.: Calpain contributes to silica-induced I kappa B-alpha degradation and nuclear factor-kappa B activation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2 (1997), 383-388
- 69. DAYTON; W.R.; GOLL; D.E.; ZEECE; M.G.; ROBSON; R.M.: A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 15 (1976), 2150-2158
- 70. DAYTON; W.R.; REVILLE; W.J.; GOLL; D.E.; STROMER; M.H.: A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 15 (1976), 2159-2167
- 71. KAR; N.C.; PEARSON; C.M.: A calcium-activated neutral protease in normal and dystrophic human muscle. *Clin Chim Acta* 73(2) (1976), 293-297
- 72. SIMS; J.M.; PATZER B.; KUMUDAVALLI-REDDY; M.; MARTIN; A.F.; RABINOWITZ; M.; ZAK; R.: The pathways of protein synthesis and degradation in normal heart and during development and regression of cardiac hypertrophy. *Recent. Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.* 12 (1976), 19-28
- 73. REDDY; M.K.; ETLINGER; J.D.; RABINOWITZ; M.; FISCHMAN; D.A.; ZAK; R.: Removal of Z-lines and alpha-actinin from isolated myofibrils by a calcium-activated neutral protease. *J. Biol. Chem.* 11 (1975), 4278-4284
- 74. NISHIURA; I.; TANAKA; K.; YAMATO; S.: The Occurrence of an inhibitor of Ca²⁺⁻ dependent neutral protease in rat liver. *J. Biochem.* 84 (1978), 1657-1659
- 75. NELSON; W.J.; TRAUB; P.: Fractionation of the detergent-resistant filamentous network of Ehrlich ascites tumour cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 23 (1981), 250-257
- 76. ISHIZAKI; Y.; KUROKAWA; M.; TAKAHASHI; K.: A calcium-dependent protease associated with the neutral cytoskeleton. Purification and partial characterisation. *Eur. J. Biochem.* 146 (1985), 331-337
- 77. LAMPI; K.J.; DAVID; L.L.; SHEARER; T.R.: Association of calpain with insoluble pellet of rat lens. *Exp. Eye Res.* 55 (1992), 369-375
- 78. EMORI; SAIGO, Y.; K.: Calpain localization changes in coordination with actinrelated cytoskeletal changes during early embryonic development of Drosophila. *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 25137-142
- 79. MOLINARI; M.; ANAGLI; J.; CARAFOLI; E.: Ca²⁺-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 27992-27995
- 80. SUZUKI; K.; TSUJI; S.; KUBOTA; S.; KIMURA; Y.; IMAHORI; K.J.: Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes ist sensitivity to Ca²⁺ ions. *Biochem. (Tokyo)* 1 (1981), 275-278
- 81. SUZUKI; K.; TSUJI; S.; ISHIURA; S.; KIMURA; Y.; KUBOTA; S.; IMAHORI; K.: Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle. *J. Biochem.* 90 (1981), 1787-1793

- 82. DEMARTINO; G.N.; BLUMENTHAL; D.K.: Identification and partial purification of a factor that stimulates calcium-dependent proteases. *Biochemistry* 21 (1982), 4297-4303
- 83. KISHIMOTO; A.; KAJIKAWA; N.; SHIOTA; M.; NISHIZUKA; Y.: Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.* 258 (1983), 1156-1164
- 84. PONTREMOLI; S.; MELLONI; E.; SALAMINO; F.; SPARATORE; B.; MICHETTI; M.; HORECKER; B.L.: Cytosolic Ca²⁺-dependent neutral proteinases from rabbit liver: activation of the proenzymes by Ca²⁺ and substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 1(1984), 53-56
- 85. PONTREMOLI; S.; MELLONI; E.; MICHETTI; M.; SPARATORE; B.; SALAMINO; F.; SILIPRANDI; N.; HORECKER; B.L.: Isovalerylcarnitine is a specific Activator of Calpain of human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 148 (1987), 1189-1195
- 86. KURODA; T.; MIKAWA; K.; MISHIMA; H.; KISHIMOTO; A.: H1 histone stimulates limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calpain II. *J. Biochem.* 110 (1991), 364-368
- 87. MELLGREN; R.L.; SONG; K.; MERICLE; M.T.: m-Calpain requires DNA for activity on nuclear proteins at low calcium concentration. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 653-57
- 88. ARTHUR; J.S.C.; CRAWFORD; C.: Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1293 (1996), 201-206
- 89. CONG; J.; GOLL; D.E.; PETERSON; A.M.; KAPPRELL; H.-P.: The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (□-calpain and m-calpain). J. Biol. Chem. 264 (1989), 10096-10103
- 90. MOLINARI; M.; ANAGLI; J.; CARAFOLI ; E.: Ca²⁺-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 27992-995
- 91. SUGITA; H.; ISHIURA; S.; SUZUKI; K.; IMAHORI; K.: Ca-activated neutral protease and its inhibitors: in vitro effect on intact myofibrils. *Muscle Nerve* 4 (1980), 335-339
- SORIMACHI; H.; KINBARA; K.; KIMURA; S.; TAKAHASHI; M.; ISHIURA; S.; SASAGAWA; N.; SORIMACHI; N.; SHIMADA; H.; TAGAWA; K.; MARUYAMA; K.; SUZUKI; K.: Musclespecific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 31158-162
- 93. BECKMANN; J.S.; BUSHBY; K.M.: Advances in the molecular genetics of the limb-girdle type of autosomal recessive progressive muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* 5 (1996), 389-393
- 94. POWERS; J.M.; YOUNG; G.F.; BASS; E.B. JR.; REED; F.E. JR.: Atypical nemaline myopathy with temporomandibular ankylosis. *Neurology* 9 (1980), 971-975
- 95. SHOWALTER; C.J.; ENGEL; A.G.: Acute quadriplegic myopathy: Analysis of myosin isoforms and evidence for calpain-mediated proteolysis. *Muscle & Nerve* (1997), 316-322
- 96. BOLLI; R.; CANNON; R.O.; SPEIR; E.; GOLDSTEIN; R.E.; EPSTEIN; S.E.: Role of cellular proteinases in acute myocardial infarction. I. Proteolysis in nonischemic and ischemic rat myocardium and the effects of antipain, leupeptin, pepstatin and chymostatin administered in vivo. *J. Am. Coll. Cardiol.* 4 (1983), 671-680
- 97. TOLNAI; S.; VON ALTHEN; I.: Calcium-dependent proteolysis in the myocardium of rats subjected to stress. *Life Sci.* 9 (1987), 1117-1122
- 98. PONTREMOLI; S.; MELLONI; E.; SALAMINO; F.; SPARATORE; B.; VIOTTI; P.; MICHETTI; M.; DUZZI; L.; BIANCHI; G.: Decreased level of calpain inhibitor activity in kidney from milan hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145 (1987), 1287-1294
- 99. SALAMINO; F.; SPARATORE; B.; TULLIO, De; R.; PONTREMOLI; R.; MELLONI; E.; PONTREMOLI; S.: The calpastatin defect in hypertension is possibly due to a specific degradation by calpain. *Biochim. Biophys. Acta* 1096 (1991), 265-269
- 100. LYNCH; G.; SEUBERT; P.: Links between long-term potentiation and neuropathology. An hypothesis involving calcium-activated proteases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 568 (1989), 171-180
- 101. MULLER D, Molinari I, Soldati L, Bianchi G A genetic deficiency in calpastatin and isovalerylcarnitine treatment is associated with enhanced hippocampal long-term potentiation. *Synapse* 19 (1995), 37-45
- 102. NIXON; R.A.: Calcium-activated neutral proteinases as regulators of cellular function. Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 568 (1989), 198-208
- 103. GRYNSPAN; F.; GRIFFIN; W.R.; CATALDO; A.; KATAYAMA; S.; NIXON; R.A.: Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2 (1997), 145-158
- 104. SAITO; K.-I.; ELCE; J.S.; HAMOS; J.E.; NIXON; R.A.: Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 2628-2632
- 105. DE ROSBO; N.K.; BERNARD; C.C.: Multiple sclerosis brain immunoglobulins stimulate myelin basic protein degradation in human myelin: a new cause of demyelination. J. Neurochem. 2 (1989), 513-518
- 106. BANIK; N.L.: Pathogenesis of myelin breakdown in demyelinating diseases: role of proteolytic enzymes. *Crit Rev Neurobiol* 4(1992), 257-271
- 107. DESHPANDE; R.V.; GOUST; J.M.; HOGAN; E.L.; BANIK; N.L.: Calpain secreted by activated human lymphoid cells degrades myelin. *J. Neurosci. Res.* 2 (1995), 259-265
- 108. KUWAKI; T.; SATOH; H.; ONO; T.; SHIBAYAMA; F.; YAMASHITA; T.; NISHIMURA; T.: Nilvadipine attenuates ischemic degradation of gerbil brain cytoskeletal proteins. *Stroke* 1 (1989), 78-83
- 109. YOSHIDA; K.; INUI; M.; HARADA; K.; SAIDO; T.C.; SORIMACHI; Y.; ISHIHARA; T.; KAWASHIMA; S.; SOBUE; K.: Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of calspectin (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circul. Res.* 77 (1995), 603-610

- 110. OKITA; J.R.; FROJMOVIC; M.M.; KRISTOPEIT; S.; WONG; T.; KUNICKI; T.J.: Montreal platelet syndrome: a defect in calcium-activated neutral proteinase (calpain). *Blood* 2(1989), 715-721
- 111. VARNUM; M.D.; DAVID; L.L.; SHEARER; T.R.: Age-related changes in calpain II and calpastatin in rat lens. *Exp. Eye Res.* 6 (1989), 1053-1065
- 112. TRUSCOTT; R.J.W.; MARCANTONIO; J.M.; TOMLINSON; J.; DUNCAN; G.: Calciuminduced opacification and proteolysis in the intact rat lens. *Invest.Ophthal. & Vision Science* 31 (1990), 2405-11
- 113. AZUMA; M; SHEARER; T.R.; MATSUMOTO; T.; TAKAHIRO; K.L.L.; MURACHI; T.: Calpain II in two in vivo models of sugar cataract. *Exp. Eye Res.* 51 (1990), 393-401
- 114. AZUMA; M.; INOUE; E.; OKA; T.; SHEARER; T.R.: Proteolysis by calpain is an underlying mechanism for formation of sugar cataract in rat lens. *Curr. Eye Res.* 14 (1995), 27-34
- 115. AGUILAR; H.I.; STEERS; J.L.; WIESNER; R.H.; KROM; R.A.F.; GORES; G.J.: Enhanced liver calpain protease activity is a risk factor for dysfunction of human liver allografts. *Transplantation* 63 (1997), 612-614
- 116. KOHLI; V.; GAO; W.; CAMARGO; C.A.JR.; CLAVIEN; P.A.: Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Proc. .Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 9354-9359
- 117. SUZUKI; K.; SHIMIZU; K.; HAMAMOTO; T.; NAKAGAWA; Y.; HAMAKUBO; T.; YAMAMURO; T.: Biochemical demonstration of calpains and calpastatin in osteoarthritic synovial fluid. *Arthritis. Rheum.* 5 (1990), 728-732
- 118. FUJIMORI; Y.; SHIMIZU; K.; SUZUKI; K.; NAKAGAWA; Y.; YAMAMOTO; S.; YAMAMURO; T.: Immunohistochemical demonstration of calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in collagen-induced arthritis in mice. *Z. Rheumatol.* 53 (1994), 72-75
- 119. 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* 6 (1995), 477-483
- 120. MIMORI; T.; SUGANUMA; K.; TANAMI; Y.; NOJIMA; T.; MATSUMURA; M.; FUJII; T.; YOSHIZAWA; T.; SUZUKI; K.; AKIZUKI; M.: Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7267-7271
- 121. YASUOKA; H.; SUGANO; Y.; OKA; T.; WATANABE; C.; KANEKO; Y.; NOJIMA; T.; MATSUMURA; M.; FUJII; T.; MIMORI; T.: Antigenic epitopes recognized by autoantibodies to calpastatin in patients with rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Ryumachi* 3(1997), 458-466
- 122. NAKAGAWA; Y.; SHIMIZU; K.; HAMAMOTO; T.; SUZUKI; K.; UEDA; M.; YAMAMURO; T.: Calcium-dependent neutral proteinase (calpain) in fracture healing in rats. *J. Orthop. Res.* 1(1994), 58-69
- 123. KAJIKAWA; N.; KISHIMOTO; A.; SHIOTA; M.; NISHIZUKA; Y.: Ca-dependent neutral protease and proteolytic activation of Ca-activated phospholipid-dependent protein kinase. *Methods in Enzymol.* 102 (1983), 279-290
- 124. YANAGISAWA; K.; SATO; S.; AMAYA; N.; MIYATAKE; T.: Degradation of myelin basic protein by calcium-activated neutral protease (CANP) in human brain and inhibition by E-64 analogue. *Neurochem Res* 10 (1983), 1285-1293

- 125. DESHPANDE; R.V.; GOUST; J.M.; HOGAN; E.L.; BANIK; N.L.: Calpain secreted by activated human lymphoid cells degrades myelin. *J. .Neurosci. Res.* 42 (1995), 259-265
- 126. DAVID; L.L.; VARNUM ; M.D.; LAMPI; K.J.; SHEARER; T.R.: Calpain II in human lens. Invest. Ophthalmol. & Visual Science 30 (1989), 269-275
- 127. DAVID; L.L.; WRIGHT; J.W.; SHEARER; T.R.: Calpain II induced insolubilization of lens β-crystallin polypeptides may induce cataract. *Biochim. Biophys. Acta* 1139 (1992), 210-216
- 128. DAVID; L.L.; SHEARER; T.R.: Purification of calpain II from rat lens and determination of endogenous substrates. *Exp. Eye Res.* 42 (1986), 227-238
- 129. DAVID; L.L.; SHEARER; T.R.; SHIH; M.: Sequence analysis of lens β-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 1937-1940
- 130. YOSHIDA; H.; YUMOTO; N.; TSUKAHARA; I.; MURACHI; T.: The degradation of alpha-crystallin at its carboxyl-terminal portion by calpain in bovine lens. *Invest.Ophthal. & Visual Science* 27 (1986), 1269-1273
- 131. SIMAN; R.; Baudry; M.; Lynch; G.: Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc Natl Acad Sci U S A Jun*; 81 (11) (1984), 3572-3576
- 132. LYNCH; G.; BAUDRY; M.: The biochemistry of memory: A new and specific hypothesis. *Science* 224 (1984), 1057-1063
- 133. KUNICKI; T.J.; MOSESSON; M.W.; PIDARD; D.: Cleavage of fibrinogen by human platelet calcium-activated protease. *Thromb Res* Jul 15;35(2)(1984), 169-182
- 134. RODGERS; G.M.; CONG; J.; GOLL; D.E.; KANE; W.H.: Activation of coagulation factor V by calcium-dependent proteinase. *Biochim. Biophys. Acta* 929 (1987), 263-270
- 135. FOX; J.E.B.; AUSTIN; C.D.; REYNOLDS; C.C.; STEFFEN; P.K.: Evidence that agonist- induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 13289-13295
- 136. MCDERMOTT; J.R.; MANTLE; D.; BIGGINS; J.A.; KIDD; A.M.; DAVISON; K.; LAUFFART; B.; PENNINGTON; R.J.: Specificity of neuropeptide degradation by two calcium-activated neutral proteases from human skeletal muscle. *Life Sci* Aug 26; 37 (8) (1985), 725-730
- 137. SAIDO; T.C.; MIZUNO; K.; SUZUKI; K.: Proteolysis of protein kinase C by calpain: Effect of acidic phospholipids. *Biomed. Biochim. Acta* 50 (1991), 485-489
- 138. MELLONI; E.; PONTREMOLI; S.; MICHETTI; M.; SACCO; O.; SPARATORE; B.: The involvement of calpain in the activation of protein kinase C in neutrophils stimulated by phorbol myristic acid. *J. Biol. Chem.* 261 (1986), 4101-4105
- 139. CRESSMAN; C.M.; MOHAN; P.S.; NIXON; R.A.; SHEA; T.B.: Proteolysis of protein kinase C: mM and mu-M calcium-requiring calpains have different abilities to generate, and degrade the free catalytic subunit, protein kinase M. *FEBS Letters* 367 (1995), 223-227
- 140. PONTREMOLI; S.; MELLONI; E.; SPARATORE; B.; MICHETTI; M.; SALAMINO; F.; HORECKER; B.L.: Isozymes of protein kinase C in human neutrphils and their modification by two endogenous proteinases. *J. Biol. Chem.* 265 (1990), 706-712

- 141. SAKAI; K.; AKANUMA; H.; IMAHORI; K.; KAWASHIMA, k; S.: A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis. *J. Biochem.* 101 (1987), 911-918
- 142. AU; K.S.: Activation of erythrocyte membrane Ca²⁺-ATPase by calpain. *Biochim. Biophys. Acta* 905 (1987), 273-278
- 143. JAMES; P.; VORHERR; T.; KREBS; J.; MORELLI; A.; CASTELLO; G.; MCCORMICK; D.J.; PENNISTON; J.T.; FLORA, De; A.; CARAFOLI; E.: Modulation of erythrocyte Ca²⁺-ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin-binding domain. J. Biol. Chem. 264 (1989), 8289-8296
- 144. WANG; K.K.W.; VILLALOBO; A.; ROUFOGALIS; B.D.: Activation of the Ca²⁺-ATPase of human erythrocyte membrane by an endogenous Ca²⁺-dependent neutral protease. *Arch. Biochem. Biophys.* 260 (1988), 696-704
- 145. ANDO; Y.; MIYACHI; Y.; IMAMURA; S.; KANNAGI; R.; MURACHI; T.: Purification and characterization of calpains from pig epidermis and their action on epidermal keratin. *J. Invest. Dermatol.* 90 (1988), 26-30
- 146. TSUNEKAWA; S.; TAKAAHASHI; K.; ABE; M.; HIWADA; K.; OZAWA; K.; MURACHI; T.: Calpain proteolysis of free and bound forms of calponin, a troponin T-like protein in smooth muscle. *FEBS Letters* 250 (1989), 493-496
- 147. CROALL; D.E.; CHACKO; S.; WANG; Z.: Cleavage of caldesmon and calponin by calpain: substrate recognition is not dependent on calmodulin binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1298 (1996), 276-284
- 148. YANG; L.-S.; KSIEZAK-REDING; H.: Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments. *Eur. J. Biochem.* 233 (1995), 9-17
- 149. MERCKEN; M.; GRYNSPAN; F.; NIXON; R.A.: Differential sensitivity to proteolysis by brain calpain of adult human tau, fetal human tau and PHF-tau. *FEBS Letters* 368 (1995), 10-14
- 150. OLDENBURG; K.R.; HUBBELL; W.L.: Invertebrate rhodopsin cleavage by an endogenous calcium activated protease. *Exp Eye Res* Oct; 51 (4) (1990), 463-472
- 151. MELLGREN; R.L.: Proteolysis of nuclear proteins by □-calpain and m-calpain. J. Biol. Chem. 266 (1991), 1392-1394
- 152. SATO; N.; FUJIO; Y.; YAMADA-HONDA; F.; FUNAI; H.; WADA; A.; KAWASHIMA; S.; AWATA; N.; SHIBATA; N.: Elevated calcium level induces calcium-dependent proteolysis of A-CAM (N-cadherin) in heart - Analysis by detergent-treated model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217 (1995), 649-653
- 153. SHEPPARD; A.; WU; J.; RUTISHAUSER; U.; LYNCH; G.: Proteolytic modification of neutral cell adhesion molecule (NCAM) by the intracellular proteinase calpain. *Biochim. Biophys. Acta* 1076 (1991), 156-160
- 154. HIRAI; S.; KAWASAKI; H.; YANIV; M.; SUZUKI; K.: Degradation of transcription factors, c-jun and c-fos, by calpain. *Febs-Letters* 287 (1991), 57-61
- 155. EARNEST; J.P.; SANTOS; G.F.; ZUERBIG; S.; FOX; J.E.B.: Dystrophin-related protein in the platelet membrane skleton. Integrin-induced change in detergent-insolubility and cleavage by calpain in aggregating platelets. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 27259-27265

- 156. TRAENCKNER; E.B.-M.; WILK; S.; BAEUERLE; A.: A proteasome inhibitor prevents activation of NF- \Box B and stabilizes a newly phosphorylated form of I \Box B-alpha that is still bound to NF- \Box B. *EMBO J.* 13 (1994), 5433-5441
- 157. LIU; Z.Q.; KUNIMATSU; M.; YANG; J.P.; OZAKI; Y.; SASAKI; M.; OKAMOTO; T.: Proteolytic processing of nuclear factor kappa B by calpain in vitro. *FEBS Lett* 385 (1-2) (1996), 109-113
- 158. GONEN; H.; SHKEDY; D.; BARNOY; S.; KOSOWER; N.S.; CIECHANOVER; A.: On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Letter* 406 (1997), 17-22
- 159. WALKER; G.; PFEILSCHIFTER; J.; KUNZ; D.: Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-g-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. J. Biol. Chem. 271 (1996), 16679-16687
- 160. CHOI; Y.H.; LEE; S.J.; NGUYEN; P.M.; JANG; J.S.; LEE; J.; WU; M.-L.; TAKANO; E.; MAKI; M.; HENKART; P.A.; TREPEL; J.B.: Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 28479-28484
- 161. FALCHETTO; R.; Vorherr; T.; Carafoli; E.: The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci* (12) (1992),1613-1621
- 162. ISHII; H.; SUZUKI; Y.; HORIE; S.; NAKAGAWA; M.; KAZAMA; M.: Participation of calpain I activation in the ATP release reaction of platelets stimulated with thrombin. *Biochim. Biophys. Acta* 1175 (1992), 37-43
- 163. KADOYA; K.; AZUMA; M. DAVID; L.L.; SHEARER; T.R.: Role of calpain in hydrogen peroxide induced cataract. *Curr.Eye Res.* 12 (1993), 341-46
- 164. FUKAI; F.; OHTANI; T.; UEKI; M.; KATAYAMA; T.: Involvement of calciumdependent cysteine protease in fibronectin-induced chemotactic migration of NIH-L13 fibroblasts. *Biochem Mol Biol Int* (2)(1993), 225-229
- 165. SQUIER; M.K.T.; MILLER; A.C.K.; MALKINSON; A.M.; COHEN; J.J.: Calpain activation in apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 159 (1994), 229-237
- 166. BARTUS; R.T.; BAKER; K.L.; HEISER; A.D.; SAWYER; S.D.; DEAN; R.L.; ELLIOTT; P.J.; STRAUB; J.A.: Postischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. *J.Cereb.Blood Flow and Metabol.* 14 (1994), 537-44
- 167. SARIN; A.; CLERICI; M.; BLATT; S.P.; HENDRIX; C.W.; SHEARER; G.M.; HENKART; P.A.: Inhibition of activation-induced programmed cell death and restoration of defective immune responses of HIV+ donors by cysteine protease inhibitors. J. Immunol. 153 (1994), 862-872
- 168. BALCERZAK; D.; POUSSARD; S.; BRUSTIS; J.; ELAMRANI; N.; SORIANO; M.; COTTIN; P.; DUCASTAING; A.: An antisense oligodeoxyribonucleotide to m-calpain mRNA inhibits myoblast fusion. *J Cell Sci* 108(5)(1995), 2077-2082
- 169. POSNER; A.; RASER; K.J.; HAJIMOHAMMADREZA; I.; YUEN; P.W.; WANG; K.K.: Aurintricarboxylic acid is an inhibitor of mu- and m-calpain. *Biochem Mol Biol Int* Jun;36(2)(1995), 291-299
- 170. ZHU; W.; MURTHA; P.E.; YOUNG; C.Y.F.: Calpain inhibitor-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214 (1995), 1130-1137

- 171. ARORA; A.S.; GROEN, de; P.C.; CROALL; D.E.; EMORI; Y.; GORES; G.J.: Hepatocellular carcinoma cells resist necrosis during anoxia by preventing phospholipase-mediated calpain activation. *J. Cell. Physiol.* 167 (1996), 434-442
- 172. SPENCER; M.J.; LU; B.; TIDBALL; J.G.: Calpain II expression is increased by changes in mechanical loading of muscle in vitro. *J. Cell. Biochem.* 64 (1997), 55-66
- 173. MELLGREN; R.L.: Evidence for participation of a calpain-like cysteine protease in cell cycle progression through late G1 phase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 (1997), 555-558
- 174. CROALL; D.E.; DEMARTINO; G.N.: Comparison of two calcium-dependent proteinases from bovine heart. *Biochim. Biophys. Acta* 788 (1984), 348-55
- 175. MEHDI; S.: Cell-penetrating inhibitors of calpain. TIBS 16 (1991), 150-153
- 176. HAUGLAND; R.P.: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 6. Edition ©1966 Molecular Probes Inc.
- 177. DUNCAN; G.; JACOB; T.J.C.: Calcium and the physiology of cataract. In: Human cataract formation, Pitman, London (Ciba Foundation symposium 106) (1984), 132-152
- 178. KARLSSON; J.-O.; ANDERSSON; M.; KLING-PETERSEN; A.; SJÖSTRAND; J.: Proteolysis in Human Lens Epithelium Determined by a Cell-Permeable Substrate. *IOVS* 40 (1999), 261-264
- 179. AUTRIC; F.; FERRAZ; C.; KILHOFFER; M.-C.; CAVADORE; J.-C.; DEMAILLE; J.G.: Large-scale purification and characterisation of Calmodulin from Ram testis. *Biochim. Biophys. Acta* 631 (1980), 139-147
- 180. YOSHIDA; H.; MURACHI; T.; TSUKAHARA; I.: Limited proteolysis of bovine lens alpha-crystallin by calpain, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, isolated from the same tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 798 (1984), 252-259
- 181. COUKELL; M.B.; CAMERON; A.M.; ADAMES; N.R.: Involvement of intracellular calcium in protein secretion in Dictyostelium discoideum. J. Cell Sci. 103 (1992), 371-380
- 182. FALET; H.; PAIN; S.; RENDU; F.: Tyrosine unphosphorylated platelet SHP-1 is a substrate for calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252(1) (1998): 51-55
- 183. HUTTENLOCHER; A.; PALECEK; S.P.; LU; Q.; ZHANG; W.; MELLGREN; R.L.; LAUFFENBURGER; D.A.; GINSBERG; M.H.; HORWITZ; A.F.: Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.* 272(52) (1997): 32719-32722
- 184. YOSHIDA; H.; MURACHI; T.; TSUKAHARA; I.: Degradation of actin and vimentin by calpain II, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, in bovine lens. *FEBS Letters* 170 (1984): 259-2621
- 185. ANDERSSON; M.; SJOSTRAND, J.; ANDERSEN; B.; KARLSSON; J.O.: Calpains in lens epithelium from patients with cataract. Exp.Eye Res. 59 (1994): 359-64

Abbildungsverzeichnis

Seite 1. Abbildungen Abbildung 1: Struktur der Calpainuntereinheiten nach Sorimachi et al. (38) 6 Abbildung 2: SDS-Gelelektrophorese von m-Calpain aus Rinderherz 9 Abbildung 3: SDS-Gelelektrophorese von m-Calpain vor und nach Reinigung 10 durch die HPLC Abbildung 4: SDS-Gelelektrophorese nach der chromatographischen 12 **Reinigung von Proteasomen** Abbildung 5: SDS-Gelelektrophorese nach der chromatographischen 19 **Reinigung von Calpastatin** Nachweis der Spezifität von 1E8 (anti-m-Calpain-Antikörper, **Abbildung 6:** 22 monoklonal) Abbildung 7: Excitationsspektrum von Fura 2 (aus 176) 23 Emissionsspektrum von Fluo-3/Fura Red (aus 176) **Abbildung 8:** 23 Abbildung 9: Nativelektrophorese von isoliertem m-Calpain 33 Abbildung 10: SDS-Elektrophorese von isoliertem m-Calpain 33 Abbildung 11: Zymogramm von isoliertem m-Calpain 34 Abbildung 12: m-Calpain im Westernblot, monoklonales Antiserum 1E8 35 m-Calpain im Westernblot, polyklonales Kaninchen-Antiserum Abbildung 13: 35 Abbildung 14: Westernblot von m-Calpain aus Rinderherz und Calpain aus 39 Linsenepithelzellen vom Rind Abbildung 15: Nachweis der Orte des hydrolytischen Umsatzes der fluorogenen 43 Peptidsubstrate Boc-Leu-Met-AMC und Boc-Leu-Met-CAMC Abbildung 16: Bildsequenz von Diagramm 25, S. 45 (Kontrollreaktion ohne 44 Inhibitor) Abbildung 17: Darstellung von isoliertem m-Calpain aus Rinderherz im AFM 60 Abbildung 18: Darstellung einzelner m-Calpainpartikel und Größenmessung 61 Abbildung 19: Selbstorganisation von m-Calpain auf Siliciumträger 62 Abbildung 20: Selbstorganisation von m-Calpain auf Siliciumträger 63 Abbildung 21: Linsenepithelzellen, angefärbt mit Kaninchen-anti-m-Calpain, 65 anti-Kaninchen-FITC Abbildung 22: Linsenepithelzellen, angefärbt mit Maus-anti-m-Calpain (1E8), 65 anti-Maus-FITC Abbildung 23, 24: Immunofluoreszenz ohne Primärantiserum (links) und 68 Histogramm (rechts) Abbildung 25, 26: Immunofluoreszenz mit anti-m-Calpain-Antiserum 69 Primärinkubation (links) und Histogramm (rechts) Abbildung 27, 28: Immunofluoreszenz mit m-Calpain (1:20) vorinkubiertem 69 anti-m-Calpain-Antiserum (1:20) als Primärantiserum (links) und Histogramm (rechts) Abbildung 29, 30: Immunofluoreszenz mit m-Calpain (1:5) vorinkubiertem 69 anti-m-Calpain-Antiserum (1:20) als Primärantiserum (links) und Histogramm (rechts) Abbildung 31: Linsenepithelzellen fixiert mit 2% Paraformaldehyd in HBS, 70 danach inkubiert mit 1% Triton-X-100 in HBS Abbildung 32: Linsenepithelzellen mit 1% Triton-X-100 in HBS inkubiert, 70 danach fixiert mit 2% Paraformaldehyd in HBS Abbildung 33: Linsenepithelzellen, angefärbt mit Kaninchen-anti-m-Calpain-71 Antiserum/anti-Kaninchen-FITC, Antigendetektion auf der Zelloberfläche

Abbildung 34,	35: Mikrofilamente in Linsenepithelzellen; F-Aktin angefärbt mit RH-Phalloin	73
Abbildung 36,	37: Intermediärfilamente in Linsenepithelzellen; Vimentin angefärbt mit Maus-anti-Vimentin/ anti-Maus-Biotin/	73
Abbildung 38,	39: Mikrotubuli in Linsenepithelzellen, Mikrotubuli angefärbt	74
Abbildung 40,	41: Calpain in Linsenepithelzellen; Calpain angefärbt mit Maus- anti-m-Calpain 1E8/ anti-Maus-FITC	74
Abbildung 42:	Vergleich von Calpain und Mikrofilamenten in der Immun- fluoreszenz	76
Abbildung 43:	Vergleich von Calpain und Intermediärfilamenten in der Immunfluoreszenz	77
Abbildung 44:	Vergleich von Calpain und Mikrotubuli in der Immun- fluoreszenz	78
Abbildung 45:	Modelle für heterodimere Calpainmoleküle (30K + 80K) und Aufnahme am Rasterkraftmikroskop	85
2. Diagramm	e	Seite
Diagramm 1:	Calpain-Isolation aus Rinderherz-Homogenat über DEAE- Sephacel	8
Diagramm 2:	Calpain-Isolation aus Rinderherz-Homogenat über Red- Sepharose	9
Diagramm 3:	HPLC-Reinigung von m-Calpain-haltigen Fraktionen nach der Säulenchromatographie	10
Diagramm 4:	Detektion von Protein und Aktivität während des 1. Separa- tionsschrittes von Proteasomen an DEAE-Toyoperl Ionenaustauscher	11
Diagramm 5:	Detektion von Protein und Aktivität während des 2. Separations-schrittes von Proteasomen an Red Sepharose	11
Diagramm 6:	Detektion von Protein und Aktivität während des 3. Separations- schrittes von Proteasomen an Sephacryl S-200	12
Diagramm 7:	HPLC-Trennung und Identifikation von Produkten der Boc-Leu- Met-AMC-Synthese	15
Diagramm 8:	HPLC-Trennung und Identifikation von AMC	15
Diagramm 9:	HPLC-Diagramm zur Reinheit des Syntheseproduktes Boc-Leu- Met-AMC	15
Diagramm 10:	Massenspektrogramm zur Bestätigung des Syntheseproduktes Boc-Leu-Met-AMC	16
Diagramm 11:	Calpastatin-Isolation aus Rinderherz-Homogenat über DEAE- Sephacel	18
Diagramm 12:	Calpastatin-Separation über Superdex 200 aus aktiven Fraktionen der DEAE-Sephacel-Trennung	18
Diagramm 13:	Fluoreszenzkalibrierung von AMC für die Konzentrations- bestimmung am Fotometer F2000	24
Diagramm 14,	15: Fluoreszenzdetektion von 10µl einer 10-5 bzw. 10-6M AMC- Lösung für die Konzentrationsbestimmung an der HPLC	25
Diagramm 16:	Abhängigkeit der Calpain-Aktivität von der Ca2+-Konzentration	27
Diagramm 17	Abhängigkeit der Calpain-Aktivität von der Thiol-Konzentration (Mercaptoethanol, ME)	28

Diagramm 18:	Ermittlung von K_M und V_{max} im Lineweaver-Burg-Plot am Beispiel des Umsatzes von Boc-Leu-Met-CAMC mit m-Calpain aus Rinderberz	29
Diagramm 19:	Abhängigkeit der Calpain-Aktivität von der Menge zugesetzten Calpastatins	31
Diagramm 20:	Calpainaktivität mit Protease-Inhibitoren (100µM), Substrat Boc-Leu-Met-AMC (20µM)	32
Diagramm 21:	Abhängigkeit der Proteasomen- und der Calpain-Aktivität von der Ca ²⁺ -Konzentration, Substrat Boc-Leu-Met-AMC	37, 81
Diagramm 22:	Proteolytische Aktivität von Proteasomen unter dem Einfluß von Protease-Inhibitoren, Substrat Boc-Leu-Met-AMC	38
Diagramm 23:	Vergleich der Inhibitorwirkung auf Proteasomen und m-Calpain, Substrat Boc-Leu-Met-AMC	38
Diagramm 24:	Fluoreszenzentwicklung durch hydrolytische Freisetzung von AMC untersuchter Peptidsubstrate in Linsenepithelzellen	41
Diagramm 25:	Spontane intrazelluläre Fluoreszenzentwicklung nach Inkubation mit 20µM Peptidsubstrat BLMM	45
Diagramm 26:	HPLC-Fluoreszenz-Kontolle der Hydrolyse von 20µM BLMM ohne Inhibitor	45
Diagramm 27:	HPLC-Fluoreszenz-Kontolle von 20µM BLMM ohne Hydrolyse	45
Diagramm 28:	Prozentuale Freisetzung von AMC in Gegenwart von Inhibitoren bei der Hydrolyse von BLMM durch Linsenepithelzellen	46
Diagramm 29:	Änderung der Ca ²⁺ -abhängigen Fluoreszenz intrazellulär nach sprunghafter Änderung der extrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration	48
Diagramm 30:	Einfluß des Ionophors Ionomycin auf die Änderung der Ca ²⁺⁻ abhängigen Fluoreszenz intrazellulär nach sprunghafter Änderung der extrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration	48
Diagramm 31:	Intrazelluläre Fluoreszenzentwicklung durch Proteolyse des Peptidsubstrates BLMM: Kontrollreaktion ohne Ionomycin	49
Diagramm 32:	HPLC-Trennung und Identifikation der Fluoreszenz von Boc- Leu-Met-AMC 20 μM in Tris-HCl pH 7,4; <i>Kontrollreaktion ohne</i> <i>Zellen</i>	50
Diagramm 33:	HPLC-Trennung und Identifikation der Fluoreszenz im Überstand nach 25 min Inkubation von Linsenepithelzellen mit Peptidsubstrat: <i>Kontrollreaktion ohne Jonomycin</i>	50
Diagramm 34:	Intrazelluläre Fluoreszenzentwicklung durch Proteolyse des Peptidsubstrates BLMM	51
Diagramm 35:	Intrazelluläre Fluoreszenzentwicklung durch Proteolyse des Peptidsubstrates BLMM	51
Diagramm 36:	relative Fluoreszenzentwicklung als Maß der proteolytischen Aktivität in Linsenepithelzellen	51
Diagramm 37:	Einfluß des Peptidsubstrates BLMM auf die Calciumionen- konzentration in Linsenepithelzellen	53
Diagramm 38:	Auswertung des hydrolytischen Freisetzung von AMC nach 20 Minuten Inkubation der Linsenepithelzellen mit 30µM Ionomycin, 2mM EGTA oder Ca ²⁺ und dem Peptidsubstrat Boc- Leu-Met-AMC	53
Diagramm 39:	Verlauf der intrazellulären Proteolyse von 20µM BLMM unter dem Einfluß von 30µM Ionomycin und 2mM Ca ²⁺ oder 2mM EGTA	54

Diagramm 40,	41: Proteolytische Freisetzung von AMC bei der Inkubation von Linsenepithelzellen mit BLMM nach 2,5 oder 10 Minuten Vorinkubation mit 30µM Ionomycin und 2mM Ca ²⁺ oder 2mM EDTA	55
Diagramm 42:	Untersuchung des Substratumsatzes von BLMM nach ansteigenden Vorinkubationzeiten mit Ionomycin und EDTA ohne Proteasesubstrat	56
Diagramm 43:	Freisetzung von AMC bei der Inkubation von Linsenepithel- zellen mit BLMM bei 10 Minuten Vorinkubation	57
Diagramm 44:	Vergleich der Proteolyse von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC unter Bedingungen des optimalen Enzymumsatzes in vitro und der immuncytochemischen Inkubation bei Raumtemperatur	67
3. Schemata		Seite

Schema 1:	Synthese von Boc-Leu-Met-AMC	16
Schema 2:	Synthese von Boc-Leu-Met-AMC	17
Schema 3:	Meßeinrichtung eines inversen Laser Raster Mikroskops (LSM)	40
Schema 4:	Aktivierungsmechanismus für m-Calpain an Mikrofilamenten	96
	in Linsenepithelzellen	

Seite 4. Tabellen Tabelle 1: native Proteine als Substrate von Calpain 1 Tabelle 2: Einteilung der Calpain-Spezies 3 Tabelle 3: Krankheitsbilder, die mit Calpain in Zusammenhang gebracht 4 werden Protease-Inhibitoren und deren Bezugsquelle Tabelle 4: 20 Tabelle 5: Mengen und Konzentrationen von CaCl₂ für die Untersuchung 27 der Ca²⁺-Abhängigkeit Tabelle 6: Mengen und Konzentrationen von Mercaptoethanol, ME für die 28 Untersuchung der Thiol-Abhängigkeit Tabelle 7: Volumina und Endkonzentrationen des Substrates im Test 29 Tabelle 8: K_M, V_{max}, K_{cat}=V_{max}/Enzym_i, K_{cat}/K_M für den Umsatz der 30 Peptidsubstrate mit m-Calpain Tabelle 9: Mengen und Konzentrationen von Calpastatin für die 30 Untersuchung der Inhibitorwirkung auf m-Calpain Tabelle 10: Mengen und Konzentrationen der Protease-Inhibitoren 31 Tabelle 11: Zuordnung der Inhibitoren zum Diagramm 20 32 Tabelle 12: Mengen und Konzentrationen von CaCl₂ für die Untersuchung 36 der Ca²⁺-Abhängigkeit Mengen und Konzentrationen der Protease-Inhibitoren Tabelle 13: 37 Tabelle 14: Zuordnung der Inhibitoren zum Diagramm 22, 23 38 Tabelle 15: Fluoreszenzverhalten untersuchter Peptidsubstrate in vivo 41 Tabelle 16: Meßschema am LSM 44 Tabelle 17: Hydrolytische Freisetzung von AMC durch Linsenepithelzellen 46 unter dem Einfluß von Protease-Inhibitoren nach 22,5 Minuten Inkubation mit dem Peptidsubstrat BLMM Tabelle 18: Schema der Untersuchung der intrazellulären Calciumionen-47 konzentration in Linsenepithelzellen

Tabelle 19:	Meßschema zur Untersuchung der Calciumionen-Abhängigkeit der Hydrolyse von BLMM in Linsenenithelzellen	49
Tabelle 20:	Meßschema zur Untersuchung der Calciumionen-Abhängigkeit der Hydrolyse von BLMM in Linsenepithelzellen	50
Tabelle 21:	Schema zur Untersuchung des Einflusses des Peptidsubstrates BLMM auf die intrazelluläre Calciumionenkonzentration in Linsenepithelzellen	52
Tabelle 22:	Meßschema zur Untersuchung des Verlaufes der Hydrolyse von BLMM in Linsenepithelzellen	54
Tabelle 23:	Schema für die "kurze (lange)" Vorinkubation von Linsenepithel- zellen mit Ionomycin und Ca ²⁺ oder EDTA und anschließender Inkubation mit BLMM	55
Tabelle 24:	Schema für die Untersuchung des Substratumsatzes von BLMM nach ansteigenden Vorinkubationzeiten mit Ionomycin und EDTA ohne Proteasesubstrat	56
Tabelle 25:	Inkubationsschema für die Untersuchung der proteolytischen Aktivität nach einem kurzzeitigen Wechsel der Calciumionen- konzentration in Linsenenithelzellen	57
Tabelle 26:	Ansätze für die Untersuchung des Einflusses von m-Calpain auf anti-m-Calpain-Antiserum 1E8 bei Bedingungen für die Immuncytochemie	66
Tabelle 27:	Verdünnungsschema für die Inkubation mit anti-m-Calpain- Antiserum 1E8 und für die Gemische von 1E8 + m-Calpain	68
Tabelle 28:	Inkubationsmedien für die Darstellung von Calpain und den Cytoskelett-Anteilen Aktin und Vimentin	72

Abkürzungen

µ-Calpain	Calpain mit Calciumionenbedarf von ca.10µM
30K	kleine Untereinheit von Calpain
80K	große Untereinheit von Calpain
ACN	Acetonitril, Elutionsmittel für die HPLC
Afm	Atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskopie
AMC	7-Amino-4-Methylcumarin
BLLMM	Boc-Leu-Met-AMC
BLMM	Boc-Leu-Met-AMC, Butyl-oxycarbonyl-Leucinyl-
	Methionyl-Aminomethylcumarin
BLMM-Cl	Boc-Leu-Met-CAMC, Butyl-oxycarbonyl-Leucinyl-
	Methionyl-Chloraminomethylcumarin
BLM-Rhodamin	Boc-Leu-Met-Rhodamin
BMMM	Boc-Met-AMC
BNMM	Boc-Norleu-Met-AMC
Boc-Met-OH	Butyl-oxycarbonyl-Methionin
BSA	Rinderserumalbumin
BVLLM	Boc-Val-Leu-AMC
Calpain-Inhibitor I	Ac-Leu-Leu-Norleucinal
Calpain-Inhibitor II	Ac-Leu-Leu-Methional
Calpeptin	Z-Leu-Norleucinal
Chymostatin	Proteaseinhibitor aus Actinomyceten
CL	Calpain Large subunit, große Untereinheit
CS	Calpain Small subunit, kleine Untereinheit
DEAE-Sephacel	O-2-Diethylaminoethyl-Rest auf Cellulose (13)
DMF	N,N-Dimethylformamid
E-64	Oxiran-Inhibitor von Aspergillus japonicus
E-64d, EST	(2S,3S)-trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-3-
·	Methylbutane Ethyl Ester
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (13)
EGTA	Ethylenbis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure (13)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HBS	Hepes buffer solution, pH 7,4:
	Angaben in mM
	NaCl 140, CaCl ₂ 2, KCl 4, MgCl ₂ 2, HEPES 10,
	Glucose 10
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulionsaure (13)
HPLC	High performance liquide chromatography
krist.	Kristallin
	Linsenepithelzellen (lens epithel cells)
	Laser Scanning Microscop, Laser Raster Mikroskop
Lsm.	Lösungsmittel
m-Calpain	Calpain mit Calciumbedart von ca.1mM
ME	Mercaptoethanol
nCL	novel Calpain Large subunit
NEM	N-Ethyl-Maleinimid
PBS	Phosphatgepufferte 0,9%ige Kochsalzlösung pH 7,4:
	Angaben in mM
	NaCl 137; KCl 2,7; KH ₂ PO ₄ 1,5 ; Na ₂ HPO ₄ 10,1

PCMPS	Parachlormercuriphenylsulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POC-Kammer	Inkubationsgefäß für die Untersuchung von lebenden
	Zellen unter einem Inversmikroskop
RP-18	Reversed Phase-18-Säule für HPLC-Trennung
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
SAPLM	Suc-Ala-Phe-Leu-AMC
SH	Thiolgruppe z.B. in der Seitenkette von Cystein
SLLVYM	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Succinyl-Leucinyl-
	Leucinyl-Valyl-Tyrosyl-Aminomethylcumarin
SLYM	Suc-Leu-Tyr-AMC
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tridest. H ₂ O	Wasser nach Ionenaustauscher; $R > 18,2M\Omega$
ü.N.	über Nacht
ü.Wo.	übers Wochenende
ZAAPCK	Z-Arg-Arg-Phe-Chlorketon
ZLYCK	Z-Leu-Tyr-Chlorketon
ZVLLM-Cl	Z-Val-Leu-Leu-Amino-4-Chlormethylcumarin

Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
7-Amino-4-methylcumarin (AMC)	SENN CHEMICALS
Ac-Leu-Leu-Arginal (LEUPEPTIN)	CALBIOCHEM
Aqua-Poly/Mount	POLYSCIENCE, INC.
Azocasein	Prof.J.Langner, Uni Halle
Boc-Leu-Met-AMC	Eigensynthese
Boc-Leu-Met-CAMC	MOLEKULAR PROBES
Boc-Leu-Osu	BACHEM
Boc-Met-OH	NOVA BIOCHEM
Bz-Val-Gly-Arg-AMC	BACHEM
Casein	SERVA
Chymostatin	CALBIOCHEM
DTT, Dithiothreitol	SERVA
N-(trans-Epoxysuccinyl)-L-Leucin-4- Guanidinobutylamid (E-64)	FLUKA
(2S,3S)-trans-Epoxysuccinyl- L-Leucylamido-3- Methylbutan-Ethylester (E-64d, EST)	CALBIOCHEM
Fluo-3	MOLECULAR PROBES
Fura-2	MOLECULAR PROBES
FuraRed	MOLECULAR PROBES
HEPES	C.ROTH
Iodazetamid	E.MERCK
Ionomycin	CALBIOCHEM
 MW-Marker 29000 Carboanhydrase 45000 Albumin (E) 66000 Albumin (R) 97400 Phosphorylase 116000 β-Galactosidase 205000 Myosin 	BOEHRINGER INGELHEIM
2. MW-Marker 129000 Carbonic Anhydrase 45000 Albumin egg 67000 Albumin bovine 97400 Phosphorylase B	BOEHRINGER INGELHEIM
Ac-Leu-Leu-Methional (CALPAIN INHIBITOR II)	BOEHRINGER MANNHEIM

Ac-Leu-Leu-Norleucinal (CALPAIN INHIBITOR I)	BOEHRINGER MANNHEIM
N-Ethylmaleinimid (NEM)	SCHUCHARDT; München
Papain, 30U/mg	BOEHRINGER MANNHEIM
Pepstatin	CALBIOCHEM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SERVA
p-Hydroxymercuri-Benzoesäure, Natriumsalz, HgC6H4COONa	CHEMAPOL, Prag
p-Hydroxymercurisulfonat Natriumsalz (PCMPS)	SIGMA
Pluronic	MOLECULAR PROBES
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	BACHEM
Z-Ala-Ala-Phe-Chlormethylketon (ZAAPCK)	Dr.Jahreis (15), Uni Halle
Z-Leu-Norleucinal (CALPEPTIN)	NOVABIOCHEM
Z-Leu-Tyr-Chlormethylketon (ZLYCK)	BACHEM
Anti-Rabbit IgG-POD	BOEHRINGER MANNHEIM
Anti-Mouse Ig-POD	BOEHRINGER MANNHEIM
Anti-Mouse Ig (H&L); aff. Purified	VECTOR
Anti-Mouse Ig (H&L)-Fluorescein; aff. Purified	VECTOR
Goat Anti-Rabbit IgG(H&L)-FITC, aff. Purified	DIANOVA

Bezeichnung	Hersteller
AFM Nanoscope IIIa Dimension 5000	DIGITAL INSTRUMENT
Blue Vertical, BV100/C, Gel-Elektrophorese	SERVA
DEAE- Sephacel	PHARMACIA
DEAE-Toyoperl	TOSO
Desaphor HF	DESAGA
Computer, 133MHz, Eigenbau	
Fluoreszenzfotometer F2000	HITACHI
Fluoval	VEB CARL ZEISS JENA
Fraktionssammler Super Frac	PHARMACIA LKB
HPLC-Fluoreszenzmonitor 8450	BISCHOFF
HPLC-Präzisionspumpe HPP 5001	LABORATORNI PRISTROJE
HPLC-Pumpe Modell 2200	BISCHOFF
HPLC-Spektralfotometer Lambda 1000	BISCHOFF
HPLC-UV Detektor LCD 2040	LABORATORNI PRISTROJE
Konzentrator Model 402	AMICON
Kühl-Tischzentrifuge SIGMA	
LSM - Laser Raster Mikroskop	CARL ZEISS JENA
Markierte Objektträger	MEDCO
Messerhomogenisator Art-Micra D-8	CARL ROTH
Nitrocellulose Extra, Blotmembran	SARTORIUS
Oberschalenwaage Owa Labor	WÄGETECHNIK RAPIDO
Objektträger Superfrost	CARL ROTH
pH-Einstabmeßkette EGA 131	MEINSBERGER ELEKTRODEN
pH-Messgerät PHM 95	RADIOMETER
POC-Kammern	BACHOFER
Potter-Homogenisator	GLAS-COL
Potter-Homogenisatoren 125µm, 40µm Spalt	GLENCO
Präzisionsküvetten	HELLMA
Red Sepharose	PHARMACIA
Rotations-Antrieb MR 25	MLW PRÜFGEGERÄTEWERK
	FREITAL
Rotationsverdampfer RZR 2	HEIDOLPH
Rotiphorese Gel 30	CARL ROTH
RP-18-Säule, ET 125/8/4 Nucleosil mit	MACHEREY-NAGEL
Vorsäule	
Schüttler mit Plattform MS1	IKA
Sephacryl S-200	PHARMACIA
Specol UV VIS	CARL ZEISS JENA
Super-UV Cuvettes	ELKAY PRODUCTS
Ultrazentrifuge Spinco 1265 b	BECKMAN INSTRUMENTS
Uvicord II	LKB
Zentrifugenbecher	KONTRON

Geräte und Verbrauchsmaterial

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines vom Land Sachsen-Anhalt 1800A/0048B) geförderten Forschungsvorhabens (FKZ am Institur für Physiologische Chemie der medizinischen Fakultät der Universität Halle/Wittenberg.

Für das in mich gesetzte Vertrauen, die kameradschaftliche Hilfe und die Möglichkeit, zu jedem Problem einen kompetenten Partner zur Seite zu haben, möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes bedanken.

Besonderer Dank gilt

Dr.I.Willhardt, der mich kurzfristig in seine Arbeitsgruppe aufnahm und dann mehr als drei Jahre aktiv die Arbeit betreut hat.

Weiterhin bedanke ich mich nochmals bei allen, die aktiv an der Arbeit mitgewirkt haben

Frau Hahn Dr.D.Glanz Frau Wolter Dr.U.Rothe Frau Goder Prof. M.Iwig Frau Thate Frau Dr. B.Fricke Dr.F.Laube Prof.J.Lasch Dr.B.und K.Lennarz Dr.I.Lachmann Dr.U.Bakowski

Erklärung

Die vorliegende Arbeit habe ich selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur erstellt.

Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens von mir eingereicht.

Halle, 20. Juli 1999

Heiner Sann

Lebenslauf

Heiner Sann Husumer Str. 5 37308 Heiligenstadt



- 16.09.1959 geboren in Erfurt/ Thüringen Eltern: Mutter Ärztin, Vater Lehrer
- 1966-1974 allgemeinbildende Oberschulen in Straußfurt und Heiligenstadt
- 1974-1978 erweiterte Oberschule Heiligenstadt, Abitur
- 1978-1981 Militärdienst
- 1981-1986 Universität Leipzig, Sektion Biowissenschaften, Biologiestudium (Tierphysiologie) 1983-1986 Spezialisierung: Elektronenmikroskopie (REM, TEM)
- Diplom zum Thema: "Gefrierätzuntersuchungen am Endothel von Cortexkapillaren und am Epithel des Plexus choroideus nach intracerebroventricularer Injektion von Vasopressin bei Wistarratten", AG Prof. Ermisch, Betreuer Dr. Hess
- 1986-1989 (AdW ZWG) MYTRON Heiligenstadt AG Dr. Metze: Entwicklung und Untersuchung eines FIA-Automaten (Fließ-Injektions-Analyse)

AG Preis: Testung und Entwicklung von Baugruppen und Laborfermentor-Prototypen CHEMIEANLAGENBAU LEIPZIG-GRIMMA

- 1989-1990 CHEMIEANLAGENBAU LEIPZIG-GRIMMA Abt. Biotechnologie, Labor "Geräteentwicklung": Arbeit am Computer, Entwicklung eines Schlauchpumpenprizips mit sehr langer Lebensdauer des Schlauches (Projekt mit IWG BEUCHA), Mitarbeit an der Entwicklung einer Ultraschall-Dichtemessung in Flüssigkeiten (on line-Biomassebestimmung)
- 1990-1991 IWG BEUCHA: Pumpenprojekt mit digitaler Ansteuerung
- 1991 ZIMEX GmbH: Verkauf von Laborgeräten und Zubehör
- 1991 selbständig, FINDEISEN-SANN LÄBORBEDARF in Leipzig: Verkauf von Laborgeräten, Zubehör, Labor-Verbrauchsmaterial und Labormöbeln
- 1992-1993 CALBIOCHEM GmbH: Biochemikalienhandel, Marketing und Produktberatung
- 1993-1995 ALEXIS DEUTSCHLAND GmbH: Biochemikalienhandel, Aufbau der Firma, Geschäftsführer
- 1995-1999 Universität Halle-Wittenberg, Institut für Physiologische Chemie, AG Dr. Willhardt wissenschaftlicher Assistent Promotion zum Thema: "Vergleichende Untersuchungen über die Aktivierung von isoliertem Calpain und einer calciumabhängigen cytosolischen Protease in Linsenepithelzellen"

Weiterbildung, spezielle Fähigkeiten

- 1983-1986 Ausbildung an Elektronenmikroskopen (TEM, REM)
- 1989 Weiterbildungskurs "Enzymelektroden"
- ab 1990 Tätigkeiten am Computerabeitsplatz
- 1995-1999 ZEISS LSM (Laser-Raster-Mikroskop), enzymologische Untersuchungen lebender Zellen unter dem Mikroskop, Wartung des Gerätes, immuncytochemische und enzymatische Fluoreszenzuntersuchungen, HPLC, Gelchromatographie, Elektrophorese, Blotten
- ab 1995 Aufbau von Hardware und Computer-Netzwerken, Netzwerkbetreuung, Softwarebetreuung, Grundkurs UNIX

Heiligenstadt, 20. Juli 1999