

Melissa M. Cremers
Borsbergstraße 29 C
01309 Dresden
Mobil: 0176 3223 5335
Email: melissa.m.cremers@googlemail.com

Dresden, den 31.05.2017

Rechtsanwältin Jana Hennig
Geschäftsführerin
Roland Ernst Stiftung
Naumannstraße 8
01309 Dresden

Abschlussbericht

Promotionsstipendium zum Thema

„Einfluss des Calpain/Calpastatin-Systems auf die Regulation natriuretischer Peptide
und das myokardiale Remodeling nach Myokardinfarkt der Ratte in-vivo“

Sehr geehrte Frau Hennig,

zwischen April 2016 und März 2017 erhielt ich von der Roland Ernst Stiftung ein Promotionsstipendium, welches mir die Erforschung des Calpain/Calpastatin-Systems und dessen Bedeutung in Bezug auf das myokardiale Remodeling nach Myokardinfarkt der Ratte in vivo ermöglichte. Während dieser Zeit war ich im Labor von Frau Univ.-Prof. Dr. med. Ruth H. Strasser an der Technischen Universität Dresden am Lehrstuhl für Innere Medizin und Kardiologie im Labor für experimentelle und molekulare Kardiologie tätig. Ziel meiner experimentellen Forschungsarbeit ist es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Umbauprozesse nach Myokardinfarkt zu leisten und so langfristig Grundlagen für neue Therapeutika zu schaffen.

In Folge des von mir im Dezember 2015 erfolgreich abgeschlossenen Studiums der Zahnmedizin nutzte ich die Zeit von Januar bis März 2016 als Vorbereitungsphase der anstehenden Promotionsarbeit. In dieser Zeit konnte ich mir die theoretischen Grundlagen relevanter Methoden aneignen und studierte die Technik der Ligatur des Ramus interventrikularis anterior (RIVA) an der männlichen Wistar-Ratte. Durch diese Vorbereitung und das Erlernen des *Know-hows* des im Labor für experimentelle und molekulare Kardiologie etablierten Tiermodells des Myokardinfarktes der Vorderwand, konnte ich

meine praktische Einarbeitungszeit am Tiermodell verkürzen. Ferner nahm ich an dem einwöchigen versuchstierkundlichen Kurs *Using Experimental Animals in Research* teil, welcher in Kooperation des Max Planck Instituts Dresden und der Technischen Universität Dresden organisiert wurde. Dieser unterstützte das Verständnis sowohl der praktischen Methodik, als auch was die Belange der Ethik und Moral angeht, welche im Umgang mit Tierexperimenten aufkommen. Die mir über den Kurs ausgestellten Zertifikate berechtigen mich dazu, nach den Empfehlungen der FELASA, Kategorie B, Tierexperimente an der Ratte durchzuführen und solche nach drei- bis fünfjähriger tierexperimenteller Erfahrung zu leiten.

Ich bin dem naturwissenschaftlichen Laborteam äußerst dankbar für die umfangreiche Einführung in die Methodik der experimentellen Forschungsarbeit, aber auch im Besonderen dem Laborleiter und meinen wissenschaftlich-ärztlichen Betreuern für die Erstellung des detaillierten Projektplans und für die Möglichkeit, bei allen aufkommenden Fragestellungen immer engagierte Ansprechpartner in Ihnen zu finden.

Beginnend mit April 2016 plante ich die operativen Maßnahmen an der Wistar-Ratte und führte diese selbstständig und eigenverantwortlich durch. Dies erstreckte sich von der Bestellung der Tiere, über die operative Technik der Ligatur, der Nachsorge, bis hin zur Organentnahme. Hilfreich war hierbei der sehr verantwortungsvolle Umgang des Labors mit Versuchstieren, welcher auch meiner Vorstellung entsprach. Im Anschluss an die operative Phase zur Gewinnung der notwendigen Gewebe folgte eine erneute Einarbeitungsphase zur Erlernung der biochemischen Aufbereitung und der Analyse der Proben. Diese wurden den Verfahren des Western-Blots und der quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) zugeführt. Zusätzlich erlernte ich Methoden der Histologie und der Immunhistologie, sowie die Anwendung von ELISAs.

Mein Forschungsprojekt befasste sich mit der Untersuchung der kalziumabhängigen non-lysosomalen Cysteinprotease Calpain und dessen spezifischen endogenen Inhibitor, Calpastatin. Ich analysierte die Expression und die Aktivierung dieser Targets jeweils 24 Stunden, 5 Tage und 14 Tage nach induziertem Myokardinfarkt am Tiermodell der Ratte. Das biopsierte Gewebe des linken Ventrikels wurde unterteilt in eine vordere (ischämische) Zone, eine hintere (nicht-ischämische) Zone und eine Zwischenzone, der sogenannten Borderzone.

Calpaine werden seit dem Jahr 1976 untersucht und es ist heutzutage bekannt, dass sie in der Entwicklung vieler pathologischer Prozesse wie zum Beispiel Morbus Alzheimer, unterschiedliche Muskeldystrophien und zerebrale Ischämien eine bedeutende Rolle spielen. In Bezug auf die kardiale Ischämie und den daraus resultierenden pathomechanistischen Umbauprozessen wird den Calpainen ebenfalls eine nicht unerhebliche Relevanz zugesprochen. Calpaine werden durch eine erhöhte

Kalziumkonzentration aktiviert, welche aus unterschiedlichen Gründen resultieren kann. Bei infarktbedingtem Sauerstoffmangel führt das Erliegen der ATP-Produktion zu einer Dysfunktion des ATP-betriebenen Natriumgradienten. Der gestörte Natriumgradient führt wiederum zu einem Versagen des Natrium-Kalzium-Austauschers, was letztlich in einer Kalziumakkumulation endet. Zudem scheint eine Angiotensin-vermittelte Inositoltrisphosphatrezeptor-Aktivierung, die eine Kalziumausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum einleitet, auch im nicht-infarzierten Gewebe eine Erhöhung der Kalziumkonzentration induzieren zu können. Es ist bekannt, dass eine Calpastatin-Überexpression in transgenen Mäusen zu einer reduzierten Infarktgröße führt und die Entstehung einer Apoptose und Hypertrophie attenuiert. Calpaine zeigen als postulierte Vorstufe ihrer Aktivierung die Eigenschaft der Membran-Translokation. Dabei kommt es zur kalziumabhängigen Translokation cytosolischen Calpains an die Phospholipide der Zellmembran. Dort findet eine leichtere Aktivierung der Calpaine statt. Calpaine hydrolysieren zahlreiche Substrate. Die aus der Hydrolyse resultierenden alpha II-Spectrin Spaltprodukte sind als spezifische Marker der Calpain-Aktivität anerkannt.

Als Voraussetzung für meine Studie wurde die suffiziente Ligatur des RIVA mit konsekutiver Infarzierung der myokardialen Vorderwand durch ein intraoperatives Elektrokardiogramm bestätigt (ST-Streckenhebung). Die darauffolgenden Umbauprozesse des Ventrikels sowie die progrediente Herzinsuffizienz wurden mittels transthorakaler Echokardiographie, einer Analyse der Sekretion des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und histologischer Färbungen nachgewiesen. In meinen Experimenten konnte ich anhand des Calpain-spezifischen alpha II-Spectrin Spaltprodukts (145/150 kDa) nachweisen, dass in der ischämischen Vorderwand sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 5 und 14 Tagen eine hoch signifikant gesteigerte Calpain-Aktivität vorliegt. Unsere Western-Blot Analyse wies ebenfalls in der Vorderwand nach 5 und 14 Tagen eine hoch signifikant gesteigerte Calpain-Expression auf. Die Beobachtung der gesteigerten Expression wurde auch zu Teilen in den Untersuchungen der qRT-PCR bestätigt. Eine Translokation der Calpaine konnten wir in der Vorderwand nach 24 Stunden feststellen. Zu den untersuchten Zeitpunkten wurden in Hinterwand und Borderzone (im Gegensatz zur Vorderwand) weder Anzeichen für eine gesteigerte Aktivität, noch für eine erhöhte Expression oder Translokation gefunden. Unsere Ergebnisse suggerieren demnach einen Zusammenhang der Calpain-Aktivität mit dem Infarktgeschehen der Vorderwand und der darauffolgenden Vernarbung. Durch eine externe Arbeitsgruppe wurde bei Calpastatin-Überexpression eine verringerte Narbenheilung mit konsekutiv erhöhter Mortalität nach Myokardinfarkt durch Ventrikelrupturen beobachtet. In Bezug auf meine Forschung führt diese Aussage zu der Annahme, dass Calpaine in der Vorderwand eine bedeutende Rolle für die Narbenausbildung/Wundheilung einnehmen. Zusätzlich konnten unsere Experimente die Hypothese festigen, dass eine Translokation zu einer verstärkten Calpainaktivität führt, diese aber nicht das ausschließliche Regulationsmoment einer Calpainaktivierung darstellt. Durch die fehlende Calpain-Aktivität in Borderzone und Hinterwand erscheint eine wesentliche Rolle der Calpaine nach Myokardinfarkt in Bezug auf das myokardiale

Remodeling fraglich. Zusammenfassend bestärken die von uns erhobenen Daten die Bedeutung des Calpain-/Calpastatinsystems in der ischämischen Vorderwand, dessen Relevanz in den pathophysiologischen Prozessen der Infarkt-Borderzone und nicht-ischämischen Hinterwand indes scheint nach unseren Daten nicht gegeben.

In den wöchentlich stattfindenden Wissenschaftsbesprechungen der Kardiologie konnte ich zu mehreren Gelegenheiten den experimentellen Werdegang und die Ergebnisse meiner Forschungsarbeit vorstellen. Dies half mir durch konstruktives Feedback, meine Arbeitsweise zu optimieren und des Weiteren meine Fähigkeiten des Vortragens zu verfeinern. Durch das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten mit eigenverantwortlicher Planung und Umsetzung des Projektes verbesserte ich darüber hinaus meine Handlungs- und Organisationsfähigkeiten und eignete mir ein strukturiertes Fehlermanagement an.

An dieser Stelle möchte ich mich nochmals ausdrücklich und ganz herzlich bei der Roland Ernst Stiftung für die finanzielle und ideelle Unterstützung bedanken. Die fokussierte wissenschaftliche Auseinandersetzung mit meinem Promotionsthema über den Zeitraum eines Jahres wäre ohne die Unterstützung der Roland Ernst Stiftung so nicht möglich gewesen. Ich bin sehr dankbar und fühle mich geehrt. Meine Forschungsergebnisse werde ich in Form einer Dissertationsschrift niederlegen und diese an der Medizinischen Fakultät Dresden als wissenschaftlichen Beitrag und zur Erlangung des akademischen Grades *doctor medicinae dentariae* (Dr. med. dent.) einreichen. Eine finale Version der Dissertationsschrift sende ich Ihnen bei Bedarf sehr gerne zu. Es wäre mir darüber hinaus eine große Freude zu Ihrer Jahrestagung erscheinen zu dürfen, um meine Ergebnisse zu präsentieren und mich persönlich bedanken zu können.

Hochachtungsvoll

Melissa M. Cremers