

Gelsolin und Gelsolinspaltprodukte im Plasma von Patienten nach kardiopulmonaler  
Reanimation bei Myokardinfarkt

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von  
Matthias Martin Meyer-Delpho  
aus Köln

2007

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Klaus Fink
2. Gutachter: Privat-Dozent Dr. med. Henning Krep

Tag der Mündlichen Prüfung: 29.06.2007

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Professor Dr. med. Alexander Pfeifer

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abkürzungen  | 5  |
| 1. Einleitung  | 6  |
| 1.1 Gen- und Proteinstruktur von Gelsolin  | 6  |
| 1.2 Funktionsweise   | 7  |
| 1.3 Zytoplasmatisches Gelsolin   | 9  |
| 1.4 Sekretorisches Gelsolin  | 11 |
| 1.5 Klinische Aspekte  | 12 |
| 1.6 Fragestellung  | 13 |
| 2. Material und Methoden   | 16 |
| 2.1 Material   | 16 |
| 2.1.1 Chemikalien  | 16 |
| 2.1.2 Antikörper   | 18 |
| 2.1.3 Geräte   | 19 |
| 2.2 Methoden   | 20 |
| 2.2.1 Probengewinnung  | 20 |
| 2.2.2 Probenpräparation  | 22 |
| 2.2.3 Probenuntersuchung   | 23 |
| 2.2.4 Densitometrische Auswertung der Western blots  | 28 |
| 2.2.5 Statistische Auswertung  | 28 |
| 3. Ergebnisse  | 29 |
| 3.1 Gelsolin Proteinanalyse mit Western blot   | 29 |
| 3.1.1 Gelsolin im Plasma von Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation im Vergleich mit gesunden Kontrollprobanden | 29 |
| 3.1.2 Vergleich von Gelsolin im humanen und murinen Plasma   | 31 |
| 3.1.3 Western blot von humanem zytoplasmatischem Gelsolin  | 33 |
| 3.1.4 Vergleich von murinem zytoplasmatischem und plasmatischem Gelsolin   | 36 |
| 3.2 Densitometrische Auswertung der Gelsolin Western blots   | 37 |
| 3.2.1 Zeitverlauf der 83 kD Bande nach kardiopulmonaler Reanimation  | 38 |
| 3.2.2 Zeitverlauf der 40 kD Bande nach kardiopulmonaler Reanimation  | 39 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3 Zeitverlauf der 18 kD Bande nach kardiopulmonaler Reanimation   | 40 |
| 3.3 Zeitverlauf der Gesamtproteinkonzentration im Plasma nach kardiopulmonaler Reanimation  | 41 |
| 3.4 Zeitverlauf der Kreatinkinase im Plasma nach kardiopulmonaler Reanimation   | 42 |
| 3.5 Zustand 3 Monate nach Reanimation   | 44 |
| 4. Diskussion   | 45 |
| 4.1 Interpretation der 18 kD Bande  | 45 |
| 4.2 Zeitverlauf des Plasmagelsolins   | 46 |
| 4.2.1 Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und Vergleich mit anderen Untersuchungen  | 46 |
| 4.2.2 Methodenkritik  | 48 |
| 4.3 Zeitverlauf der Gelsolin Cleavageprodukte   | 49 |
| 4.4 Gelsolin als prädiktiver Parameter für die Entwicklung von Komplikationen und zu erwartende neurologische Defizite nach erfolgter Reanimation | 50 |
| 4.5 Interpretation der vergleichenden Western blots von zytosolischem und plasmatischem humanen und murinen Gelsolin                              | 52 |
| 5. Zusammenfassung  | 54 |
| 6. Anhang   | 55 |
| 6.1 Gelsolin Western blots von Patientenplasma  | 55 |
| 6.2 Gelsolin Western blots von humanem Kontrollplasma   | 57 |
| 6.3 Gelsolin Western blots von zytosolischen Proteinextraktionen  | 58 |
| 7. Literaturverzeichnis   | 61 |
| 8. Danksagung   | 70 |

## Abkürzungen

|         |  |
|---------|--|
| AA      | Aminosäure   |
| ARDS    | Acute respiratory distress syndrome = respiratorische Insuffizienz |
| BLU     | Boehringer Light Units   |
| EASS    | Extracellular Actin Scavenging System                              |
| F-Aktin | Filamentöses Aktin   |
| g       | Gramm  |
| G-Aktin | Globuläres Aktin   |
| gsn     | Gelsolin   |
| h       | Stunde   |
| HRP     | Horseradish peroxidase   |
| kD      | Kilodalton   |
| l       | Liter  |
| mA      | Milliampere  |
| min     | Minuten  |
| μl      | Mikroliter   |
| ml      | Milliliter   |
| mM      | Millimol   |
| MW      | Molekulargewicht   |
| n.s.    | Nicht signifikant  |
| OD      | Optische Dichte  |
| PAGE    | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                    |
| PIP2    | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat                               |
| PT-Pore | Permeability Transition Pore                                       |
| s       | Sekunde  |
| SD      | Standardabweichung   |
| SEM     | Standardabweichung des Mittelwertes                                |
| U/l     | Units pro Liter  |
| V       | Volt   |

# 1. Einleitung

Gelsolin ist das am längsten bekannte Mitglied einer Familie von aktinbindenden Proteinen (Yin und Stossel, 1979). Diese Familie umfasst neben Gelsolin noch sechs weitere Proteine: Adseverin (= Scinderin), Villin, CapG, Advillin, Supervillin und Flightless I. Die Eigenschaften dieser Proteine zeichnen sich durch gewebespezifische Expressionsunterschiede sowie Unterschiede in Bindung, Spaltung und Kontrolle der Aktinpolymerisation aus (Arpin et al., 1988; Liu and Yin, 1998; Lueck et al., 1998; Marks et al., 1998; Pestonjamas et al., 1997; Prendergast und Ziff, 1991). Gelsolin spaltet Aktinfilamente und bindet an das Plus-Ende der Aktinfilamente. Es kommt sowohl zytosolisch als auch sekretorisch im Blutplasma vor (Yin et al., 1984).

## 1.1 Gen- und Proteinstruktur von Gelsolin

Sowohl die zytosolische als auch die plasmatische Form von Gelsolin werden durch dasselbe Gen kodiert, welches beim Menschen auf Chromosom 9 q32-q34 liegt (Kwiatkowski et al., 1988a). Bei der Maus liegt das Gelsolin-Gen auf Chromosom 2 Locus 24,5 (Pilz et al., 1992). Bei der Maus sind eine sekretorische Form und eine zytosolische Form des Gelsolins bekannt, beim Menschen sind neben der sekretorischen Variante zwei zytosolische Isoformen des Gelsolins bekannt. Die humanen Isoformen entstehen aufgrund unterschiedlicher Transkriptionsstarts und Processing der Gelsolin mRNA (Kwiatkowski et al., 1988a).

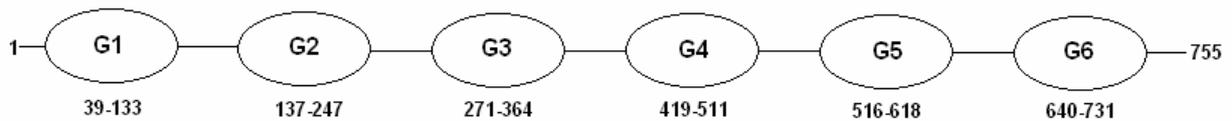
In Abwesenheit von Kalzium liegt Gelsolin monomer in einer kugeligen Konformation vor (Sun et al., 1999). Es ist aus 6 homologen Domänen aufgebaut (G1 - G6). Die Domänen bestehen aus 100 – 125 Aminosäuren (Kwiatkowski et al., 1986). Gelsolin ist bei Säugern hoch konserviert (Silacci et al., 2004). Die humane Isoform 1 (sekretorische Variante) unterscheidet sich von der humanen Isoform 2 (zytosolische Variante) durch 25 zusätzliche Aminosäuren am N-terminalen Ende (Kwiatkowski et al., 1986). Auf Aminosäureebene liegt die Homologie der murinen und der humanen Isoform 1 bei

94%, die von muriner und humaner Isoform 2 bei 95%. Die als Gelsolin-3 bekannte zytosolische Isoform unterscheidet sich von der Isoform 2 durch 11 zusätzliche Aminosäuren am N-terminalen Ende (Vouyiouklis und Brophy, 1997). Die humane Gelsolin Precursor mRNA kodiert für 782 Aminosäuren, die der Maus für 780 Aminosäuren (Swissprot, 2006). Die humane Isoform 1 (sekretorische Variante) enthält 755 Aminosäuren mit einem MW von 83 kD. Das primäre Translationsprodukt der humanen Isoform 2 (zytosolische Variante) enthält 731 Aminosäuren. Das an Position 1 stehende Methionin der Aminosäurekette ist das Signal für den Translationsstart und wird nach der Translation abgespalten, daher besteht die reife Gelsolin Isoform 2 aus 730 Aminosäuren mit einem MW von 81 kD (Kwiatkowski et al., 1988a; Swissprot, 2006). Die murine Isoform 1 (sekretorische Variante) enthält 755 Aminosäuren mit einem MW von 83 kD. Die murine Isoform 2 (zytosolische Variante) enthält 731 Aminosäuren mit einem MW von 81 kD (Swissprot, 2006).

## 1.2 Funktionsweise

Durch die Bindung von Aktinfilamenten und dem nachfolgend koordinierten Ablauf von Konformationsänderungen der Gelsolindomänen kommt es zur Spaltung von Aktinfilamenten. Im nicht aktivierten Zustand blockiert der C-Terminus (Schwanzteil der G6 Domäne) die G2 Domäne, die die notwendige aktinbindende Region zur Aktivierung des Gelsolinmoleküls darstellt (latch-tail-Hypothese) (Burtnick et al., 1997; Kiselar et al., 2003a).

Die Aktivierung des Gelsolinmoleküls erfolgt durch Bindung von Kalzium an die G6 Domäne, wodurch der aktinbindende Teil der G2 Domäne freigelegt wird (Kwiatkowski et al., 1989). Mit der Bindung der G2 Domäne an das Aktinfilament dirigiert diese die G1 Domäne mit dessen Aktinbindungsstelle an das Aktinfilament.



**Abbildung 1:** Proteinstruktur des humanen sekretorischen Gelsolins. Gelsolin besitzt Typ I kalziumbindende Bereiche in den Domänen G1 und G4, diese binden Kalzium in Abhängigkeit von vorausgegangener Aktinbindung. Typ II kalziumbindende Abschnitte findet man in den Domänen G5 und G6. Diese binden aktinunabhängig Kalzium und starten die Aktivierung des Gelsolin Moleküls. Potentielle Typ II Kalziumbindungsstellen findet man außerdem in allen anderen Gelsolindomänen. G1, G2 und G4 sind die Domänen für die Aktinbindung. Der latch-tail reicht von 745-754 (McGough et al., 2003).

Die G1 und G3 Domänen werden durch die Konformationsänderungen der Domänen G4-G6 zwischen das gebundene Aktinfilament geschoben und vollziehen damit den Spaltungsprozess des gebundenen Aktinfilamentes. Die vorausgegangenen Konformationsänderungen der Domänen G6, G2, G5 und G1 führen darüber hinaus zur Freilegung der Aktinbindungsstelle der G4 Domäne. Die G1, G2 und G4 Domänen von Gelsolin bleiben an das Aktin Plus-Ende gebunden und versiegeln dadurch das neu entstandene Aktinfilamentende. Die Enden der Aktinfilamente werden als Plus- und Minus-Ende bezeichnet. Am Plus-Ende des Aktins findet die Verlängerung des Filamentes statt. Dies geschieht durch Anlagerung von globulärem Aktin (G-Aktin) oder Aktinfilamentbruchstücken. Mit der Bindung von Gelsolin an das Plus-Ende eines Aktinfilamentes wird die Polymerisationsfähigkeit behindert. Dieser Vorgang wird capping genannt (Burtnick et al., 1997; McGough et al., 2003; McLaughlin et al., 1993).

Die biologische Wirksamkeit des zytosolischen Gelsolins ist abhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration, dem intrazellulären pH, Tyrosinphosphorylierung und intrazellulärer Phosphatidylinositol-bisphosphatkonzentration (PIP<sub>2</sub>) (Choe et al., 2002; Irobi et al., 2003; Kiselar et al., 2003b; McLaughlin et al., 1993; Narayan et al., 2003; Silacci et al., 2004; Yin und Janmey, 2003). Die notwendige Kalziumkonzentration zur Aktivierung des Gelsolins verringert sich bei sauren pH-Werten bis hin zur kalziumunabhängigen Aktivierung (Lamb et al., 1993). Ebenfalls unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgt die Aktivierung von Gelsolin durch Tyrosinphosphorylierung (Kumar und Khurana, 2004). Phosphatidyl-bisphosphate sind bislang

die einzigen bekannten Moleküle, die die aktinspaltende Aktivität des Gelsolins herabsetzen und die Dissoziation des Gelsolins vom Aktinfilament bewirken. Die Inhibition von Gelsolin durch Phosphatidyl-bisphosphate ist unabhängig vom pH-Wert (Lipiena et al., 2003).

Caspase-3 schneidet murines und humanes zytosolisches Gelsolin an einer Caspase-3-Erkennungssequenz, wobei zwei Fragmente mit einem MW von jeweils 39 und 41 kD entstehen (Kothakota et al., 1997). Plasmatisches Gelsolin besitzt eine Caspase-3-Erkennungsstelle und wird in zwei Fragmente von jeweils 41 kD gespalten. Außerdem findet sich in beiden humanen Gelsolin-Isoformen eine weitere Caspase-3-Spaltungsstelle. Bei Spaltung an dieser Position entsteht ein Spaltprodukt mit einem MW von 18 kD (Ohtsu et al., 1997). Darüber hinaus erfolgt die Spaltung von Gelsolin auch unabhängig von Caspase-3 durch eine oder mehrere Caspase-3-like-Proteasen (Jänicke et al., 1998).

### **1.3 Zytosolisches Gelsolin**

Die Aktinpolymerisation beeinflusst unterschiedliche Funktionen der Zelle. Das zytosolische Gelsolin spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Zellmigration, denn die Migrationsbewegung der Zelle entsteht durch die kontrollierte Aktinpolymerisation der Zelle in eine bestimmte Richtung (Bray und White, 1988). Die hierbei entscheidenden Umbauprozesse des Aktinzytoskeletts setzen ein Zusammenspiel von zytosolischer Gelsolinaktivität und Phosphatidyl-bisphosphat voraus. Das zytosolische Gelsolin verhindert durch capping die Polymerisation von Aktinfilamenten. Phosphatidyl-bisphosphate sind dagegen für die Dissoziation des Gelsolins von Aktinfilamenten verantwortlich, wodurch die Polymerisation der Aktinfilamente gefördert wird. Über diesen Mechanismus kann die Richtung der Polymerisation der Aktinfilamente bestimmt werden (Cunningham et al., 1991). Gelsolin vermindert die Aktivität von Phospholipase C, diese bildet aus Arachidonsäure Phosphatidyl-bisphosphate. Dadurch beeinflusst Gelsolin die Phosphatidyl-bisphosphatsynthese (Sun et al., 1997).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Gelsolin bei der Antikörper- und Integrinvermittelten Phagozytose eine Rolle spielt. Denn es werden Umbauprozesse des

Aktinzytoskeletts erforderlich, die die Form der Zelle so verändern, dass beispielsweise Kollagenbruchstücke in die Zelle aufgenommen werden können. Gelsolindefiziente Mäuse zeigen eine deutlich verlangsamte Bindung und Internalisierung von Kollagenbruchstücken (Arora et al., 2000; Arora et al., 2004; Serrander et al., 2000; Witke et al., 2001).

Gelsolin wirkt protektiv gegen apoptotischen Zelluntergang. Erhöhte Gelsolinkonzentrationen wirken protektiv bei Fas-induzierter Apoptose in Jurkat-Zellen (Ohtsu et al., 1997). Eine weitere Arbeit untersuchte primär kultivierte kortikale gelsolindefiziente murine Neurone. Diese wurden entweder Staurosporin oder Thapsigargin oder AF64A oder einer Sauerstoff/Glukose-Deprivation unter NMDA-Rezeptorblockade mit MK801 ausgesetzt. Die Apoptoserate war bei den gelsolindefizienten Neuronen signifikant höher im Vergleich zu Neuronen von Wildtyp-Mäusen. Die antiapoptotische Funktion von Gelsolin konnte auch in in-vivo Studien nachgewiesen werden (Harms et al., 2004). Bei Untersuchungen von Fas-induziertem Leberversagen an Mäusen zeigten gelsolindefiziente Mäuse eine höhere Mortalität und einen wesentlich schwereren klinischen Verlauf im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Der makroskopische Vergleich zeigte in der Leber von gelsolindefizienten Mäusen eine deutliche Umfangsvermehrung und mehr hämorrhagische Bezirke als bei den Wildtyp-Mäusen. Die histopathologische Untersuchung dieser Lebern ergab einen erhöhten Anteil von TUNEL-positiven Zellen als Zeichen einer erhöhten Apoptoserate in gelsolindefizienten Mäusen (Leifeld et al., 2006).

Bei der Induktion von Apoptose stabilisieren Aktinfilamente die Öffnung der Permeability-Transition Poren (PT-Poren) der Mitochondrien, wodurch das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht und es zum Austritt von intramitochondrialen Proteinen wie Cytochrom c in das Zytosol kommt. Dies führt zur Caspase-9 und indirekt zur Caspase-3 Aktivierung. Die antiapoptotische Wirkung von Gelsolin resultiert aus der Kontrolle des Aktinzytoskeletts, da die Depolymerisation von Aktinfilamenten die Stabilisierung in der Mitochondrienmembran und das Öffnen der PT-Pore in der Mitochondrienmembran verhindert (Harms et al., 2004; Leifeld et al., 2006; Ohtsu et al., 1997).

Die Differenzierung von humanen Thrombozyten aus Megakaryozyten und die Aktivierung von Thrombozyten resultiert in Umbauprozessen des Zytoskeletts. Gelsolin

spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung von Thrombozyten aufgrund seiner Funktion Aktinfilamente zu spalten und darüber Einfluss auf das Zytoskelett nehmen zu können (Barkalow et al., 1996; Bearer et al., 2000). Hierzu ist ein differenziertes Zusammenspiel von intrazellulärem Kalziumanstieg und Phosphokinaseaktivität notwendig. Der Kalziumanstieg erhöht die Gelsolinaktivität, die Phosphokinase erhöht die intrazelluläre Phosphoinositolkonzentration, wodurch das Gelsolin von den Aktinfilamenten dissoziiert und eine Aktinfilamentpolymerisation zulässt (Barkalow et al., 2003; Falet et al., 2000). Bei Untersuchungen an gelsolindefizienten Mäusen konnte man eine Verdoppelung der Blutungszeit im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen feststellen (Witke et al., 1995).

Die als Gelsolin-3 bekannte Isoform des humanen zytosolischen Gelsolins unterscheidet sich aufgrund von 11 zusätzlichen Aminosäuren am N-terminalen Ende. Gelsolin-3 ist vor allem in Oligodendrozyten zu finden. Dort wirkt es möglicherweise mit bei der Myelinisierung zentraler Neurone (Vouyiouklis und Brophy, 1997).

#### **1.4 Sekretorisches Gelsolin**

Zusammen mit Gc-Globulin (group-specific component) stellt Gelsolin das Extracellular Actin Scavenging System (EASS) dar. Gc-Globulin sorgt neben seiner Funktion im EASS für den Transport von Vitamin D und wird daher auch Vitamin-D-binding Protein (DBP) genannt (Lee et al., 1989). Die zentrale Aufgabe des EASS ist die Entfernung von Aktin aus der Blutbahn (Dahl, 2005). Quelle des Plasmagelsolin ist vor allem die Skelett-, Herz- und glatte Muskulatur (Kwiatkowski et al., 1988b). Aktin ist das am stärksten exprimierte Protein im Zytoplasma und gelangt bei ausgedehnten Zelluntergängen in das Blut (Lee und Galbraith, 1992; Smith et al., 1988), wo es polymerisiert. Sekretorisches Gelsolin spaltet das im Blut vorhandene Aktin und wirkt dem Polymerisationsprozess des Aktins entgegen. Durch die Bindung an Gc-Globulin wird Aktin aus der Blutbahn eliminiert (Lind et al., 1986). Bei Sättigung des EASS bilden sich intravaskulär Aktinfilamente aus. Dies führt zu einer mechanischen Behinderung des Blutflusses und zur Aktivierung von Thrombozyten und Bildung von Mikroemboli (Scarborough et al., 1981). Vor allem im kapillaren Strombett der Lunge führen Aktinfilamente zu einer massiven Behinderung des Blutflusses (Haddad et al., 1990).

Darüber hinaus wirkt Aktin direkt toxisch auf Alveolarepithelkulturen von Schafen (Erukhimov et al., 2000). Im Tierexperiment an Ratten konnte die Ausbildung eines Lungenversagens nach einem Verbrennungstrauma durch die intravenöse Gabe von rekombinantem Gelsolin abgeschwächt werden (Rothenbach et al., 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass die Injektion ansteigender Konzentrationen von G-Aktin zu einer Sättigung des EASS führt. Die Versuchstiere zeigten dann plötzliches Herz-Kreislaufversagen mit Zeichen akuter Rechtsherzbelastung. Histologisch konnte dabei eine Thrombenbildung vor allem im pulmonalen Kapillarbett nachgewiesen werden (Haddad et al., 1990). Dieser pathophysiologische Mechanismus trägt zur Entwicklung eines Multiorganversagens bei (Erukhimov et al., 2000).

## **1.5 Klinische Aspekte**

Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb von 24 Stunden bei einem akuten fulminanten Leberversagen, bei Gram-negativer Sepsis, bei akutem Myokardinfarkt und Myonekrose die Gelsolinkonzentration im Blut auf ein Drittel der üblichen Gelsolinplasmakonzentration absinkt. Drei Tage nach einem solchen Ereignis sind die Plasmagelsolinwerte wieder mit den Werten im Kontrollkollektiv vergleichbar (Suhler et al., 1997). Bei polytraumatisierten Patienten konnte gezeigt werden, dass die Gelsolinkonzentration durchschnittlich 52 Minuten (20-110 Minuten) nach dem Unfall im Blut um 25% verringert ist (Dahl et al., 1999). Bei Patienten mit respiratorischer Insuffizienz (ARDS) zeigte sich neben der Verringerung des freien Gelsolins auch ein signifikanter Abfall des mit Aktin im Komplex befindlichen Gelsolins. Die Summe von freiem Gelsolin zusammen mit im Komplex mit Aktinfilamenten befindlichen Gelsolin war signifikant erniedrigt im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Lind et al., 1988). Gc-Globulin/Aktin-Komplexe und Gelsolin/Aktin-Komplexe werden hepatisch eliminiert (Lind et al., 1986). Des Weiteren zeigten Untersuchungen an Schwerverletzten, dass der Gelsolinpiegel bei Hospitalisation als prädiktiver Parameter geeignet sein kann. Bei Gelsolinspiegeln unter 250 mg/l entwickelten sich signifikant mehr Komplikationen, wie Tod, verlängerte Beatmungspflicht von mehr als 13 Tage und ARDS (Mounzer et al., 1999).

## 1.6 Fragestellung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden drei Aspekte untersucht:

1. Ist eine Dynamik in der Plasmakonzentration von Gelsolin und seinen Spaltprodukten bei Patienten nach Myokardinfarkt und kardiopulmonaler Reanimation nachzuweisen?
2. Trägt eine vermehrte proteolytische Spaltung von intaktem Gelsolin zu dem in der Literatur beschriebenen Abfall des zirkulierenden Gelsolins bei?
3. Hat die Plasmagelsolinkonzentration prädiktive Aussagekraft für den klinischen Verlauf eines Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation bei Myokardinfarkt, hinsichtlich der zu erwartenden metabolischen, hämodynamischen und respiratorischen Komplikationen, der zu erwartenden bleibenden neurologischen Ausfälle oder des Überlebens?

|       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| human | A | T | A | S | R | G | A | S | Q | A | 10  | human | S | Y | L | S | S | H | I | A | N | V | 390 |
| human | A | T | T | S | R | G | R | A | Q | E | 10  | human | G | Y | L | S | S | H | I | A | N | V | 390 |
| human | G | A | P | Q | G | R | V | P | E | A | 20  | human | E | R | V | P | F | D | A | A | T | L | 400 |
| human | R | A | P | Q | S | R | V | S | E | A | 20  | human | E | R | V | P | F | D | A | A | T | L | 400 |
| human | R | P | N | S | M | V | V | E | H | P | 30  | human | H | T | S | T | A | M | A | A | Q | H | 410 |
| human | R | P | S | T | M | V | V | E | H | P | 30  | human | H | T | S | T | A | M | A | A | Q | H | 410 |
| human | E | F | L | K | A | G | K | E | P | G | 40  | human | G | M | D | D | D | G | T | G | Q | K | 420 |
| human | E | F | L | K | A | G | K | E | P | G | 40  | human | G | M | D | D | D | G | T | G | Q | K | 420 |
| human | L | Q | I | W | R | V | E | K | F | D | 50  | human | Q | I | W | R | I | E | G | S | N | K | 430 |
| human | L | Q | I | W | R | V | E | K | F | D | 50  | human | Q | I | W | R | I | E | G | S | N | K | 430 |
| human | L | V | P | V | P | T | N | L | Y | G | 60  | human | V | P | V | D | P | A | T | Y | G | Q | 440 |
| human | L | V | P | V | P | P | N | L | Y | G | 60  | human | V | P | V | D | P | A | T | Y | G | Q | 440 |
| human | D | F | F | T | G | D | A | Y | V | I | 70  | human | F | Y | G | G | D | S | Y | I | I | L | 450 |
| human | D | F | F | T | G | D | A | Y | V | I | 70  | human | F | Y | G | G | D | S | Y | I | I | L | 450 |
| human | L | K | T | V | Q | L | R | N | G | N | 80  | human | Y | N | Y | R | H | G | G | R | Q | G | 460 |
| human | L | K | T | V | Q | L | R | N | G | N | 80  | human | Y | N | Y | R | H | G | G | R | Q | G | 460 |
| human | L | Q | Y | D | L | H | Y | W | L | G | 90  | human | Q | I | I | Y | N | W | Q | G | A | Q | 470 |
| human | L | Q | Y | D | L | H | Y | W | L | G | 90  | human | Q | I | I | Y | N | W | Q | G | A | Q | 470 |
| human | N | E | C | S | Q | D | E | S | G | A | 100 | human | S | T | Q | D | E | V | A | A | S | A | 480 |
| human | N | E | C | S | Q | D | E | S | G | A | 100 | human | S | T | Q | D | E | V | A | A | S | A | 480 |
| human | A | A | I | F | T | V | Q | L | D | D | 110 | human | I | L | T | A | Q | L | D | E | E | L | 490 |
| human | A | A | I | F | T | V | Q | L | D | D | 110 | human | I | L | T | A | Q | L | D | E | E | L | 490 |
| human | Y | L | N | G | R | A | V | Q | H | R | 120 | human | G | G | T | P | V | Q | S | R | V | V | 500 |
| human | Y | L | N | G | R | A | V | Q | H | R | 120 | human | G | G | T | P | V | Q | S | R | V | V | 500 |
| human | E | V | Q | G | F | E | S | A | T | F | 130 | human | Q | G | K | E | P | A | H | L | M | S | 510 |
| human | E | V | Q | G | F | E | S | A | T | F | 130 | human | Q | G | K | E | P | A | H | L | M | S | 510 |
| human | L | G | Y | F | K | S | G | L | K | Y | 140 | human | L | F | G | G | K | P | M | I | I | Y | 520 |
| human | S | G | Y | F | K | S | G | L | K | Y | 140 | human | L | F | G | G | K | P | M | I | I | Y | 520 |
| human | K | K | G | V | A | S | G | F | K | Y | 150 | human | K | G | G | T | S | R | E | G | G | Q | 530 |
| human | K | K | G | V | A | S | G | F | K | Y | 150 | human | K | G | G | T | S | R | E | G | G | Q | 530 |
| human | H | V | V | P | N | E | V | V | V | Q | 160 | human | T | A | P | A | S | T | R | L | F | Q | 540 |
| human | H | V | V | P | N | E | V | V | V | Q | 160 | human | T | A | P | A | S | T | R | L | F | Q | 540 |
| human | R | L | F | Q | V | K | G | R | R | V | 170 | human | V | R | A | N | S | A | G | A | T | R | 550 |
| human | R | L | F | Q | V | K | G | R | R | V | 170 | human | V | R | A | S | S | S | G | A | T | R | 550 |
| human | V | R | A | T | E | V | P | V | S | W | 180 | human | A | V | E | V | L | P | K | A | G | A | 560 |
| human | V | R | A | T | E | V | P | V | S | W | 180 | human | A | V | E | V | M | P | K | S | G | A | 560 |
| human | E | S | F | N | N | G | D | C | F | I | 190 | human | L | N | S | N | D | A | F | V | L | K | 570 |
| human | D | S | F | N | N | G | D | C | F | I | 190 | human | L | N | S | N | D | A | F | V | L | K | 570 |
| human | L | D | L | G | N | N | I | H | Q | W | 200 | human | T | P | S | A | A | Y | L | W | V | G | 580 |
| human | L | D | L | G | N | N | I | Y | Q | W | 200 | human | T | P | S | A | A | Y | L | W | V | G | 580 |
| human | C | G | S | N | S | N | R | Y | E | R | 210 | human | T | G | A | S | E | A | E | K | T | G | 590 |
| human | C | G | S | G | S | N | K | F | E | R | 210 | human | A | G | A | S | E | A | E | K | T | G | 590 |
| human | L | K | A | T | Q | V | S | K | G | I | 220 | human | A | Q | E | L | L | R | V | L | R | A | 600 |
| human | L | K | A | T | Q | V | S | K | G | I | 220 | human | A | Q | E | L | L | R | V | L | R | A | 600 |
| human | R | D | N | E | R | S | G | R | A | R | 230 | human | Q | P | V | Q | V | A | E | G | S | E | 610 |
| human | R | D | N | E | R | S | G | R | A | Q | 230 | human | Q | H | V | Q | V | E | E | G | S | E | 610 |
| human | V | H | V | S | E | E | G | T | E | P | 240 | human | P | D | G | F | W | E | A | L | G | G | 620 |
| human | V | H | V | S | E | E | G | G | E | P | 240 | human | P | D | A | F | W | E | A | L | G | G | 620 |
| human | E | A | M | L | Q | V | L | G | P | K | 250 | human | K | A | A | Y | R | T | S | P | R | L | 630 |
| human | E | A | M | L | Q | V | L | G | P | K | 250 | human | K | T | A | Y | R | T | S | P | R | L | 630 |
| human | P | A | L | P | A | G | T | E | D | T | 260 | human | K | D | K | K | M | D | A | H | P | P | 640 |
| human | P | A | L | P | E | G | T | E | D | T | 260 | human | K | D | K | K | M | D | A | H | P | P | 640 |
| human | A | K | E | D | A | A | N | R | K | L | 270 | human | R | L | F | A | C | S | N | K | I | G | 650 |
| human | A | K | E | D | A | A | N | R | R | L | 270 | human | R | L | F | A | C | S | N | R | I | G | 650 |
| human | A | K | L | Y | K | V | S | N | G | A | 280 | human | R | F | V | I | E | E | V | P | G | E | 660 |
| human | A | K | L | Y | K | V | S | N | G | A | 280 | human | R | F | V | I | E | E | V | P | G | E | 660 |
| human | G | T | M | S | V | S | L | V | A | D | 290 | human | L | M | Q | E | D | L | A | T | D | D | 670 |
| human | G | S | M | S | V | S | L | V | A | D | 290 | human | L | M | Q | E | D | L | A | T | D | D | 670 |
| human | E | N | P | F | A | Q | G | A | L | R | 300 | human | V | M | L | L | D | T | W | D | Q | V | 680 |
| human | E | N | P | F | A | Q | G | A | L | R | 300 | human | V | M | L | L | D | T | W | D | Q | V | 680 |
| human | S | E | D | C | F | I | L | D | H | G | 310 | human | F | V | W | V | G | K | D | S | Q | E | 690 |
| human | S | E | D | C | F | I | L | D | H | G | 310 | human | F | V | W | V | G | K | D | S | Q | E | 690 |
| human | K | D | G | K | I | F | V | W | K | G | 320 | human | E | E | K | T | E | A | L | T | S | A | 700 |
| human | R | D | G | K | I | F | V | W | K | G | 320 | human | E | E | K | T | E | A | L | T | S | A | 700 |
| human | K | Q | A | N | T | E | E | R | K | A | 330 | human | K | R | Y | I | E | T | D | P | A | N | 710 |
| human | K | Q | A | N | M | E | E | R | K | A | 330 | human | K | R | Y | I | E | T | D | P | A | N | 710 |
| human | A | L | K | T | A | S | D | F | I | T | 340 | human | R | D | R | R | T | P | I | T | V | V | 720 |
| human | A | L | K | T | A | S | D | F | I | S | 340 | human | R | D | R | R | T | P | I | T | V | V | 720 |
| human | K | M | D | Y | P | K | Q | T | Q | V | 350 | human | K | Q | G | F | E | P | P | S | F | V | 730 |
| human | K | M | Q | Y | P | R | Q | T | Q | V | 350 | human | R | Q | G | F | E | P | P | S | F | V | 730 |
| human | S | V | L | P | E | G | G | E | T | P | 360 | human | G | W | F | L | G | W | D | D | N | Y | 740 |
| human | S | V | L | P | E | G | G | E | T | P | 360 | human | G | W | F | L | G | W | D | D | N | Y | 740 |
| human | L | F | K | Q | F | F | K | N | W | R | 370 | human | W | S | V | D | P | L | D | R | A | M | 750 |
| human | L | F | K | Q | F | F | K | N | W | R | 370 | human | W | S | V | D | P | L | D | R | A | M | 750 |
| human | D | P | D | Q | T | D | G | L | G | L | 380 | human | A | E | L | A | A |   |   |   |   |   | 760 |
| human | D | P | D | Q | T | D | G | P | G | L | 380 | human | A | E | L | A | A |   |   |   |   |   | 760 |

Abbildung 2: Aminosäuresequenz des humanen plasmatischen Gelsolins, die Aminosäuresequenz des zytosolischen Gelsolins ist gepunktet eingezeichnet.

Zum Vergleich ist die korrespondierende murine Aminosäuresequenz unter der humanen Aminosäuresequenz dargestellt. Die Sequenzunterschiede zwischen murinem und humanem Gelsolin sind mit Kästen umrahmt. Humanes und murines Gelsolin Isoform 1 (plasmatisch) umfassen 755 Aminosäuren. Die Homologie von humaner und muriner Isoform 1 liegt bei 94%. Das Translationsprodukt des humanen und murinen Gelsolins Isoform 2 (zytosolisch) enthält 731 Aminosäuren. Das Methionin an Position 1 der Aminosäurekette fungiert als Initiator der Translation und wird nach der Translation abgespalten. Das fertige Gelsolin Isoform 2 besteht daher aus 730 Aminosäuren. Die Homologie von humaner und muriner Isoform 2 liegt bei 95%. Die Caspase-3-Spaltung findet an DQTD<sup>367</sup>G und SEPD<sup>612</sup>G der Aminosäuresequenz des humanen plasmatischen Gelsolins statt. Das humane zytosolische Gelsolin besitzt diese Spaltstellen an Position DQTD<sup>352</sup>G und SEPD<sup>588</sup>G der Aminosäuresequenz (Kamada et al., 1998; Ohtsu et al., 1997).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| Bradford Stammlösung               | Firma Roth Art. KO51.1, Karlsruhe, Deutschland   |
| HEPES-Mg-Puffer                    | HEPES 10 mM (1,19 g/500 ml)<br>MgCl <sub>2</sub> 5 mM 0,508 g/500 ml<br>pH mit NaOH auf 7,6 einstellen.<br>Lagerung bei Raumtemperatur |
| Proteinaseinhibitor                | Complete mini von Roche Cat. No. 11836153001, Deutschland  |
| Proteinmarker                      | Precision Plus Protein Standards Dual Color Cat.No. 161-0374 der Firma BioRad Hercules CA 94547, USA                                   |
| Running-Puffer 5x (Lämmli, pH 8,3) | Tris ultrapur 15 g<br>Glycin 72 g<br>SDS 50 ml 10% w/v 5 g mit Aqua dest.<br>auf 1 l auffüllen bei Raumtemperatur aufbewahren          |

|                  |  |
|------------------|--|
| Stripping-Puffer | 2-Mercaptoethanol 100 mM 3,91 g/500 ml<br>SDS 2%ig w/v 10 g/500 ml<br>TRIS 62,5 mM 3,78 g/500 ml<br>Aqua dest. mit HCl auf pH 6,7 einstellen   |
| TBS              | Tris ultrapur 20 mM 2,42 g<br>NaCl 137 mM 8 g<br>mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen<br>pH mit 1 N HCl auf 7,6 einstellen. Bei 4°C<br>aufbewahren |
| TBST             | TBS 500 ml<br>0,5 ml TWEEN-20 0,1% pH 7,6<br>pH mit HCl einstellen<br>Lagerung bei 4°C   |
| TBST-Milch       | TBST<br>Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk<br>Cat. No. 170-6404 von BioRad Hercules<br>CA 94547, USA                                      |
| Transfer-Puffer  | Tris ultrapur 25 mM 3,03 g<br>Glycin 192 mM 14,4 g<br>Methanol 20% v/v 200 ml mit Aqua dest.<br>auf 1 l auffüllen.<br>pH zwischen 8,1 und 8,3  |
| 0,5 M TRIS-HCl   | TRIS ultrapur 6,06 g mit Aqua dest. auf<br>100 ml auffüllen.<br>pH 6,8 titrieren   |

1,5 M TRIS- HCl

TRIS ultrapur 36,34 g mit Aqua dest. auf  
200 ml auffüllen.  
pH 8,8 titrieren

## **2.1.2 Antikörper**

### **2.1.2.1 Primäre anti-Gelsolin-Antikörper**

Monoclonal GSN Clone GS-2C4 mouse ascites fluid G4896 von Sigma, Saint Louis Missouri, 63103 USA. Dieser monoklonale Antikörper bindet an ein Epitop des C-terminalen Endes von humanem Gelsolin. Bei der Entwicklung des Antikörpers wurde humanes Gelsolin mit Chymotrypsin verdaut. Dabei entstand unter anderem ein 47 kD schweres Gelsolinspaltprodukt vom C-terminalen Ende. Nach Immunisierung von Mäusen mit diesem Spaltprodukt wurden Splenozyten mit Maushybridomazellen fusioniert. Auf diese Weise gelingt eine ergiebige Produktion monoklonaler Antikörper gegen humanes Gelsolin. Es besteht eine Kreuzreaktivität dieses anti-human-Gelsolin-Antikörpers mit Schweine-, Kaninchen- und Rindergelsolin. Dieser monoklonale anti-human-Gelsolin-Antikörper eignet sich aufgrund seiner Entwicklung in der Maus schlecht zur Detektion von murinem Gelsolin. Denn die Hybridisierung mit dem sekundären goat-anti-mouse Antikörper führt zur unselektiven Bindung von murinen Epitopen. Daher wurde zur Detektion murinen Gelsolins ein polyklonaler anti-human-Gelsolin-Antikörper verwendet, der im Kaninchen generiert wurde. Dieser polyklonale anti-human-Gelsolin-Antikörper wurde im Labor von David Kwiatkowski, Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, USA entwickelt.

### **2.1.2.2 Primärer anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper**

Monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulin Clone B-5-1-2 T 5168 LOT 51K4820 von Sigma, Saint Louis Missouri 63103, USA

### 2.1.2.3 Sekundärer Antikörper

GAM (Goat-Anti-Mouse IgG) (H+L) HRP-Conjugate Cat. No. 1706516 von BioRad, Hercules CA 94547, USA

GAR (Goat-Anti-Rabbit IgG) (H+L) HRP-Conjugate Cat. No. 170-6515 von BioRad, Hercules CA 94547, USA

### 2.1.3 Geräte

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Blutprobenröhrchen        | EDTA K Monovette 03/25, Sarstedt;<br>Nümbrecht, Deutschland           |
| Chemilumineszenzimager    | LUMI-IMAGER F1, Boehringer Mannheim<br>GmbH; Mannheim, Deutschland    |
| Rotarac                   | RenXII Nr. 40719, Heidolph; Schwabach,<br>Deutschland                 |
| LumiAnalyst               | Version 3.0 1997, Boehringer Mannheim;<br>Mannheim, Deutschland       |
| PRISM                     | Version 4.00, GraphPad Software Inc.;<br>San Diego CA, USA            |
| Spektrophotometer         | Beckmann DU-64; München, Deutschland                                  |
| Teflon-Glas Homogenisator | Potter S Typ 853302/4, B. Braun<br>Melsungen; Melsungen, Deutschland  |
| Transfermembran           | Immobilon-P Transfer Membrane P15372,<br>Millipore; Billerica MA, USA |

|                 |   |
|-----------------|---|
| Ultrazentrifuge | Beckmann L7-55 Ultrazentrifuge;<br>München, Deutschland |
| Wasserbad       | GFL Typ 1083; Burgwedel, Deutschland                    |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Probengewinnung

#### 2.2.1.1 Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation

In Zusammenarbeit mit dem Rettungsdienst der Stadt Bonn erfolgte bei reanimierten Patienten nach Wiederherstellen eines stabilen Kreislaufes die initiale periphere Blutentnahme durch den Notarzt. Die Einschlusskriterien waren männliches Geschlecht, Alter zwischen 18 und 80 Jahren und Zustand nach Reanimation. Das Alter der Patienten betrug  $66,9 \pm 6,5$  Jahre (Durchschnittsalter  $\pm$  SD). 29 Patienten wurde im Rahmen dieser Arbeit Blut abgenommen. Allerdings konnten nur in 10 Fällen das Blut für die vorliegende Arbeit verwendet werden, da entweder kein Einverständnis der Angehörigen vorlag oder aufgrund des Geschlechtes des Patienten kein Einschluss in die Studie erfolgen konnte. Die Ursache des Herz-Kreislauf-Stillstandes der eingeschlossenen Patienten war in allen Fällen ein akuter koronararterieller Verschluss. Initial erfolgte die Blutentnahme durch den Notarzt, nach telefonischer Benachrichtigung der Doktoranden erfolgte nach 2, 6, 24 und teilweise 48h eine Blutentnahme auf den Intensivstationen. Stets wurden 4 ml EDTA-Blutproben Röhrchen verwendet. Das Blut wurde peripher venös entnommen. Die Verwendung der oben genannten Proben wurde durch die Ethikkommission an der medizinischen Fakultät der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn genehmigt (klinische Prüfung 018/03).

### **2.2.1.2 Gesundes Kontrollkollektiv**

Zur Kontrolle wurden einem Kollektiv von 4 gesunden freiwilligen Probanden durch periphere Venenpunktion Blut entnommen und daraus Plasmaproben präpariert. Dies geschah in gleicher Weise wie bei den reanimierten Patienten. Die Probanden waren ebenfalls alle männlich. Das Alter betrug  $26,0 \pm 3,4$  Jahre (Durchschnittsalter  $\pm$  SD).

### **2.2.1.3 Humanes zytosolisches Gelsolin**

Die myokardialen Gewebeproben wurden bei Herzklappenersatzoperationen entnommen. Beim Anschluss der Herz-Lungen-Maschine wird das venöse Blut im rechten Vorhof angesaugt, dazu wird eine großlumigen Kanüle in den rechten Vorhof platziert. Zu diesem Zweck wird ein Zugang in den Vorhof gestanzt, das hierbei ausgestanzte Gewebe wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Bei den kardiochirurgischen Eingriffen wurde Etomidat und Sufentanil zur Narkoseeinleitung verwendet. Zur Relaxation wurde Pancuronium verwendet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Isofluran und Sufentanil oder Remifentanil.

Das Neocortexgewebe wurde bei therapieresistenter Epilepsie im Rahmen von Operationen entnommen. Der MRT-Befund des Gehirns zeigte keine pathologischen Veränderungen in diesen Bereichen. Die Resektion von gesundem Neocortexgewebe war notwendig um an den Epilepsieherd zu gelangen. Die Patienten standen unter antiepileptischer Medikation und waren mit Flunitrazepam und Ranitidin prämediziert worden. Die Narkose wurde mit Thiopental eingeleitet und dann weitergeführt mit Isofluran und Remifentanil oder mit Propofol und Remifentanil. CisAtracurium wurde zur Muskelrelaxation verwendet.

### **2.2.1.4 Murines sekretorisches und zytosolisches Gelsolin**

In der vorliegenden Arbeit wurde Blutplasma durch Punktion der V. cava inferior sowie Neocortex- und Myokardproben von Gelsolin knockout-Mäusen ( $gsn^{-/-}$ ) und Wildtyp-Mäusen ( $gsn^{+/+}$ ) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten  $gsn^{-/-}$  Mäuse sind in einen gemischten background aus 129/SV x BALB/C eingekreuzt, da die  $gsn$ -Gendelektion sonst eine Letalmutante wäre (Harms et al., 2004). Die Mäuse wurden in 12-stündigem Hell-dunkel-Rhythmus unter S1-Bedingungen gehalten. Es wurden 5 Mäuse pro Käfig

gehalten. Die Mäuse wurden bei 24°C Umgebungstemperatur gehalten und hatten ständig freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Mäuse wurden mit Standard Haltungsdiet für Mäuse 1324, der Firma Altromin, Lage, Deutschland gefüttert. Die Käfige waren mit Plospan Streu der Firma Plomp, Waardenburg, Niederlande ausgelegt.

## **2.2.2 Probenpräparation**

### **2.2.2.1 Blutproben**

Innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme erfolgte, unter Wahrung der Kühlkette (4°C), die Aufbereitung der Proben. Die Blutproben wurden bei 4°C mit 1.177 x g (bei 3.500 rpm) für 10 min zentrifugiert, anschließend das Plasma in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert bis zur weiteren Analyse.

### **2.2.2.2 Gewebeproben**

Die Proteinpräparation des humanen und des Maus-Herzmuskelgewebes erfolgte mit einem handbetriebenen Glas-Homogenisator. 100 mg des Gewebes wurden mit jeweils 1900 µl HEPES MgCl<sub>2</sub> + Proteinaseinhibitor homogenisiert.

Die Proteinpräparation des humanen und des Maus-Neokortexgewebes erfolgte mit einem Teflon-Glas-Homogenisator. 100 mg der jeweiligen Gewebe wurden mit jeweils 1900 µl HEPES MgCl<sub>2</sub> + Proteinaseinhibitor bei 0°C (mit 500 Umdrehungen pro Minute) homogenisiert.

Die Homogenate von Herzmuskel- und Neokortexgewebe wurden in Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und mit 50.000 x g (24.000 rpm) bei 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

## 2.2.3 Probenuntersuchung

### 2.2.3.1 Proteinbestimmung

Es erfolgte zunächst eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976). Nachdem die Proben 1:100 verdünnt und zusammen mit 1 ml Bradford-Lsg. (1:5 verdünnt und filtriert) in eine Mikroküvette gegeben worden sind, wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Referenzwerte wurde eine für diesen Zweck hergestellte Verdünnungsreihe aus Rinderalbumin (BSA) verwendet. Mit der PRISM-Software wurde dann die Proteinkonzentration der Proben anhand der BSA-Eichkurve mit nonlinearer Regression berechnet. Nach Übertragung der errechneten Proteinkonzentrationen in MS-EXCEL erfolgte die Verdünnungsberechnung der Proben. Zur Vergleichbarkeit der Mengen an Gelsolin und Gelsolincleavageprodukten muss gewährleistet sein, dass von allen Proben die gleiche Ausgangsmenge von Gesamteiweiß verglichen wird. Von den humanen Plasmagelsolinproben wurden je lane 60 µg Gesamtprotein, bei den Mausplasmaproben 20 µg Gesamtprotein, von den humanen Hirnproben 20 µg Gesamtprotein, von den humanen Herzproben 20 µg Gesamtprotein, von den Maus Hirnproben 15 µg Gesamtprotein und von den Maus-Herzproben 15 µg Gesamtprotein auf den Polyacrylamidgel aufgetragen.

### 2.2.3.2 Acrylamidgel

Running Gel, 8%iges SDS-Gel

Deionisiertes Wasser 3,415 ml

1,5 M TRIS-HCl 2,5 ml

SDS 10%ig w/v 80 µl

Acrylamid stock solution 30%ig 2,575 ml

Bis-Acrylamid stock solution 2%ig 1,380ml,

Ammoniumpersulfat 10%ig 50 µl

TEMED 5 µl

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Stacking Gel, 4%iges SDS-Gel | Deionisiertes Wasser 5,393 ml               |
|                              | 0,5 M TRIS-HCl 2,5 ml                       |
|                              | SDS 10%ig w/v 80 $\mu$ l                    |
|                              | Acrylamid stock solution 30%ig 1,287 ml     |
|                              | Bis-Acrylamid stock solution 2%ig 0,690 ml, |
|                              | Ammoniumpersulfat 10%ig 50 $\mu$ l          |
|                              | TEMED 5 $\mu$ l                             |

### 2.2.3.3 SDS-Gelelektrophorese und Western blot

Es wurde ein 8%iges SDS-Gel verwendet, da damit eine optimale gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit einem MW zwischen 30 und 90 kD erzielt wird.

Entsprechend der PAGE-Verdünnungsberechnung wurden die berechneten Probenvolumina in die Gelslots pipettiert. Anschließend wurde das Plasma mit einer Gelelektrophorese (PAGE) in Running-Puffer (siehe Kapitel 2.1.1) bei 75 V mit Stromstärken zwischen 33 und 14 mA sowie einer Laufzeit von ca. 150 min bei 4°C aufgetrennt.

Anschließend wurde das aufgetrennte Plasma vom Gel auf PVDF-Membranen (siehe Kapitel 2.1.3) transferiert. Hierzu wurde das Gel in Transfer-Puffer (siehe Kapitel 2.1.1) gewaschen. Währenddessen wurde die PVDF-Membran in Methanol für 10 min eingelegt, um Verunreinigungen, vor allem von lipophilen Stoffen, auf der Membran zu entfernen. Anschließend wurde die Membran in deionisiertem Wasser und Transfer-Puffer durchfeuchtet. Nun erfolgte die Anordnung von Vlies, Saugpapier, Gel, Transfermembran, erneut Saugpapier und erneut Vlies übereinander. Diese Anordnung wurde in einen Trägerschlitten eingeklemmt, dieser wiederum in die Transferkammer gespannt und die Kammer mit Transfer-Puffer gefüllt. Der Transfer wurde bei 100 V und Stromstärken zwischen 177 und 400 mA über 3h im Eisbad durchgeführt. Nach dem Transfer wurde das Vlies und das Saugpapier entfernt und die Umrisse des Gels auf der Transfermembran ausgeschnitten und das Gel verworfen. Die Transfermembran wurde mit der ehemals dem Gel zugewandten, proteinbeladenen Seite nach innen zeigend in ein 50 ml Reaktionsgefäß von NUNC überführt und mit 5% TBST-Milch geblockt (siehe Kapitel 2.1.1). Durch den Zusatz des Milchproteins wird die unspezifische Bindung des

primären Antikörpers an der Membran vermindert. Dazu wurde die Transfermembran über Nacht auf dem Rotarac mit 5 ml 5% TBST-Milch bei 4°C geblockt. Anschließend erfolgten 3 Waschschrirte á 5 Minuten mit TBST bei Raumtemperatur auf dem Rotarac. Nun wurde der primäre Antikörper hinzugegeben.

Humane Plasma- und Gewebeprouben:

- Monoklonaler anti-Gelsolin-Antikörper von Sigma in einer Verdünnung von 1:500 (8 µl anti-Gelsolin-Antikörper : 4 ml 5% TBST-Milch).
- Polyklonaler anti-Gelsolin-Antikörper hergestellt von David Kwiatkowski (DK) in einer Verdünnung von 1:1000 (5 µl DK-Antikörper : 5 ml 5% TBST-Milch).

Maus Plasma- und Gewebeprouben:

- Polyklonaler anti-Gelsolin-Antikörper von DK in einer Verdünnung von 1:10.000 (1 µl DK-Antikörper : 10 ml 5% TBST-Milch).

Die Transfermembran rotierte in der entsprechenden Antikörperlösung für 3h bei Raumtemperatur auf dem Rotarac. Es schließt sich ein weiterer Waschvorgang an, 3 mal 5 Minuten mit TBST bei Raumtemperatur auf dem Rotarac. Nun erfolgte in einem frischen 50 ml NUNC-Reaktionsgefäß die Inkubation mit dem sekundären Antikörper.

Abhängig von der Spezies, in der der primäre Antikörper generiert wurde, wurden unterschiedliche sekundäre Antikörper verwendet:

- Bei monoklonalen primären Antikörpern wurde ein GAM (goat-anti-mouse) Antikörper von BioRad in einer Verdünnung von 1:1000 (4 µl GAM-Antikörper : 4 ml TBST) verwendet, an den HRP (horseradish peroxidase) gebunden war.
- Bei polyklonalen primären (Kaninchen) Antikörpern wurde ein GAR (goat-anti-rabbit) Antikörper von BioRad in einer Verdünnung von 1:3000 (2 µl GAR-Antikörper : 6 ml TBST) verwendet, an den HRP gebunden war.

Nach Überführen der Transfermembranen in die NUNC-Gefäße wurden die transferierten PVDF-Membranen für 90 min auf dem Rotarac bei Raumtemperatur mit den jeweiligen Antikörperlösungen inkubiert. Es schließt sich ein Waschvorgang an, wiederum 3 mal 5 Minuten mit TBST bei Raumtemperatur auf dem Rotarac.

#### **2.2.3.4 Chemilumineszenzdetektion**

Die immunologische Detektion wurde mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Durch Auftragen eines entsprechenden Substrates reagiert die HRP der sekundären Antikörper mit dem Substrat und führt zu einer Lichtemission. Das notwendige Substrat wird vor der Messung aus zwei Komponenten hergestellt. Hierzu mischt man zu gleichen Teilen LUMI light Lösung I und II. Der Vorteil des Substrates liegt in seiner hohen Sensitivität und langen Leuchtdauer, die es ermöglicht mindestens 15 min lang Aufnahmen zu machen. Man schwenkt die Transfermembran mit beiden Seiten in dem Gemisch und platziert die Transfermembran mit der ehemals dem Gel zugewandten Seite nach oben in dem LUMI-IMAGER. Initial wurde eine Messung über 10 s durchgeführt. Nach dieser ersten Messung wurde auf die noch im LUMI-IMAGER befindliche Membran so viel des LUMI light I und II Gemisches pipettiert, dass ein Substrat-See entsteht und erneut gemessen, diesmal für 5 s. Die hierbei gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der LUMI-Analyst Software densitometrisch ausgewertet.

### 2.2.3.5 Bestimmung des Molekulargewichtes der Banden

Mit Hilfe eines rekombinanten Proteinmarkers erfolgte die Zuordnung der Molekulargewichte zu den detektierten Banden des Western blots (siehe Kapitel 2.1.1). Hierzu wurden die Lauflängen der Banden des Proteinmarkers und der unbekannt Banden des Plasma- bzw. Gewebegelsolins gemessen. Es folgte eine Quotientenbildung von Lauflänge der Proteinmarkerbanden bzw. den Plasma- und Gewebegelsolinbanden mit der Lauffrontdistanz. Nach Logarithmierung der bekannten Proteinmarkermolekulargewichte erlaubte eine lineare Regression nach anschließender Delogarithmierung die Zuordnung der unbekannt Banden zu Molekulargewichten.

### 2.2.3.6 Gelbeladungskontrolle

Für Western blots von Plasmaproben steht kein gut charakterisiertes, ausreichend stabil exprimiertes housekeeping Gen bzw. Protein zur Verfügung, das als Proteinbeladungskontrolle verwendet werden könnte. Deshalb bleibt nur eine gleichmäßige Proteinbeladung durch sorgfältige Bestimmung der Proteinkonzentration sicherzustellen. Beim Western blot von zytosolischen Proteinen wurde  $\alpha$ -Tubulin als Gelbeladungskontrolle verwendet (Harms et al., 2004). Hierzu wurde die Transfermembran gestrippt, das bedeutet, dass alle Antigen-Antikörper-Bindungen auf der Membran gelöst und die Antikörper entfernt werden. Dazu wird die Membran mit Stripping-Buffer (siehe Kapitel 2.1.1.) 30 min lang bei 50°C schüttelnd im Wasserbad inkubiert. Es folgte die Entnahme aus dem Wasserbad und Waschen der Transfermembran 3 mal 15 min mit TBST-Puffer bei Raumtemperatur. Überführung der Transfermembran in ein 50 ml NUNC Gefäß und Zugabe von 5% TBST-Milch zum Blocken über Nacht bei 4°C auf dem Rotarac.

Danach folgte erneutes Waschen der Transfermembran 3 mal 15 min mit TBST-Puffer bei Raumtemperatur. Nun erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers. Dazu wurde ein monoklonaler anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper von Sigma in einer Verdünnung von 1:10.000 in 5% TBST-Milch (1  $\mu$ l Antikörper : 10 ml TBST-Milch) 1h mit der Transfermembran inkubiert. Wieder erfolgte ein Waschvorgang 3 mal 5 Minuten mit TBST bei Raumtemperatur. In einem frischen 50 ml NUNC Gefäß erfolgte der Ansatz des sekundären Antikörpers. Als sekundärer Antikörper wurde GAM von BioRad

verwendet. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBST (1 µl : 10 ml TBST) für 1h mit der Transfermembran inkubiert. Es schließt sich ein weiterer Waschvorgang mit 3 mal 5 Minuten mit TBST bei Raumtemperatur an.

#### **2.2.4 Densitometrische Auswertung der Western blots**

Mit Hilfe des LumiAnalyst Programms von Boehringer Ingelheim erfolgte die densitometrische Analyse der Western blots. Als Maßeinheit zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden arbiträre Boehringer Light Units (BLU) gewählt. Dies ist eine vom Hersteller des Lumilmagers Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics eingeführte dimensionslose Einheit zur Quantifizierung der optischen Dichte, also der Schwärzungsintensität der dargestellten Banden.

#### **2.2.5 Statistische Auswertung**

Die untersuchten Proben stellen bei Patienten mit Zustand nach Reanimation wegen akuten Myokardinfarkt einen Verlauf von Plasmaparametern über einen Zeitraum von 48 Stunden dar. Der Stichprobenumfang für die Zeitpunkte initial, 2 und 6 Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand, liegt bei 10 Patienten. Der Stichprobenumfang für die Zeitpunkte 24 und 48 Stunden nach kardiopulmonaler Reanimation liegt bei 9 und 4 Patienten. Prinzipiell handelt es sich um verbundene Stichproben, weshalb die Anwendung einer einfaktoriellen Varianzanalyse für verbundene Stichproben angezeigt wäre. Aufgrund von fehlenden Werten zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Reanimation ist die Anwendung einer ANOVA für verbundene Stichproben nicht möglich. Daher wurden die Ergebnisse der Densitometrie mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) für unverbundene Stichproben durchgeführt. Als post-Test wurde ein Dunnetts-Test angewandt, um die Intensität und damit indirekt die Menge an Gelsolin und seinen Spaltprodukten mit dem Ausgangswert nach erfolgter Reanimation (Zeitpunkt „initial“) zu vergleichen.

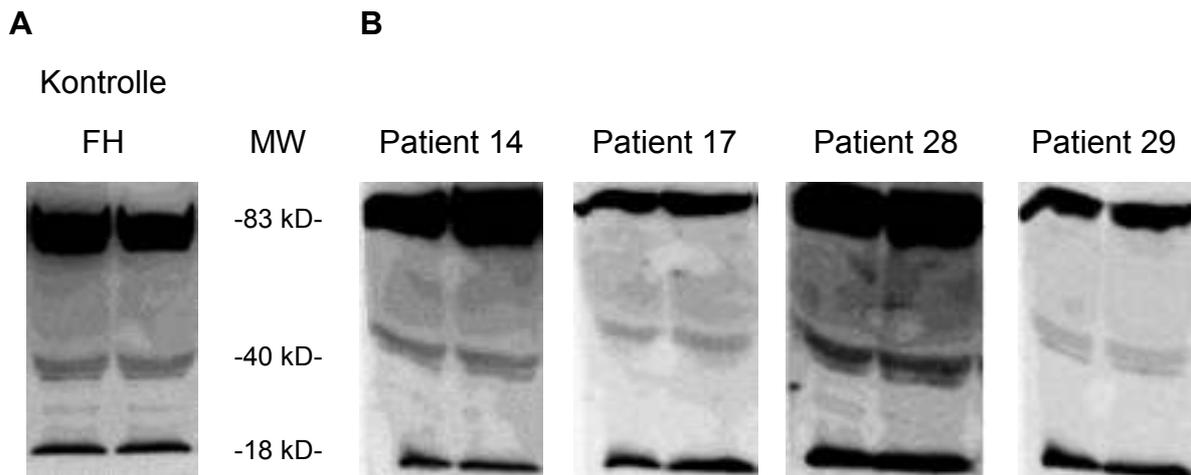
Die Gesamtproteinkonzentrationen der reanimierten Patienten wurde zu den oben genannten Zeitpunkten untereinander und mit der Gesamtproteinkonzentration des gesunden Kontrollkollektives verglichen. Hierzu wurde eine einfaktorielle ANOVA und der Student t-Test angewandt.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Gelsolin Proteinanalyse mit Western blot**

#### **3.1.1 Gelsolin im Plasma von Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation im Vergleich mit gesunden Kontrollprobanden**

Bei der Proteinpräparation mit Gelelektrophorese und anschließendem Western blot von Patientenplasma zeigt sich ein typisches Bandenmuster. Das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine liegt bei Kontrollen mit dem Proteinmarker Precision Plus Protein Standards Dual Color bei 83, 40 und 18 kD. Sowohl im Patientenplasma als auch im Kontrollplasma (Abbildung 3) zeigt sich eine intensive Bande bei 83 kD und eine deutlich weniger intensive breite Bande um 40 kD sowie eine schmale intensive Bande bei 18 kD. Die Bande bei 83 kD repräsentiert das konstitutiv exprimierte intakte Gelsolin. Die Banden um 40 und 18 kD repräsentieren Gelsolinspaltprodukte (Ohtsu et al., 1997). Das Bandenmuster von Patienten nach Reanimation und von der gesunden Kontrollgruppe unterscheidet sich nicht. Im Western blot von Patientenplasma zeigen sich große interindividuelle Unterschiede in der Breite der 83 kD Gelsolinbande. Die dargestellten lanes enthalten jeweils die Proteinpräparation von Plasma zum Zeitpunkt nach Wiederherstellen des Kreislaufes. Eine Übersicht aller freiwilligen Probanden sowie einer Übersicht aller untersuchten Patienten-Plasma ist im Anhang (Kapitel 6.1 und 6.2) abgebildet.

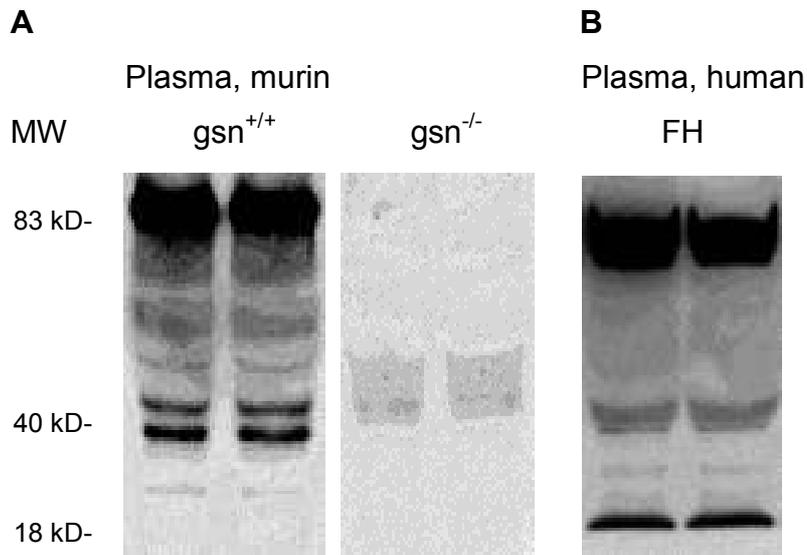


**Abbildung 3:** Exemplarischer Western blot einer Proteinpräparation von Plasma des gesunden männlichen Probanden FH (**A**). Beide lanes enthalten die gleiche Proteinpräparation (60 µg Gesamtprotein pro lane). Der hier verwendete monoklonale anti-gsn-Antikörper detektiert in gelsolinhaltigem Plasma Banden bei 83, 40 und 18 kD. Die Bande bei 83 kD stellt das intakte Gelsolin dar, bei 40 und 18 kD befinden sich die Gelsolinspaltprodukte. Primärer monoklonaler anti-gsn-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 5% TBST-Milch 3h bei Raumtemperatur, sekundärer Antikörper GAM in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST 1,5h bei Raumtemperatur. Western blot der Plasmen von Patient 14, 17, 28 und 29 zum Zeitpunkt der Wiederherstellung des Spontankreislaufes (**B**). Verwendet wurde der monoklonale anti-gsn-Antikörper. In beiden lanes eines Patienten wurde die gleiche Proteinpräparation aufgetragen (60 µg Gesamtprotein pro lane). Die Patientenplasmen zeigen das von den Kontrollplasmen bekannte Bandenmuster bei 83, 40 und 18 kD. Die 83 kD Bande stellt das intakte Gelsolin dar, die 40 und 18 kD Bande repräsentiert die Gelsolinspaltprodukte. Monoklonaler anti-gsn-Antikörper, Verdünnung 1:500 in 5% TBST-Milch 3h bei Raumtemperatur, GAM-Antikörper, Verdünnung 1:1000 in TBST 1,5h bei Raumtemperatur.

### **3.1.2 Vergleich von Gelsolin im humanen und murinen Plasma**

Aufgrund der hohen Homologie des murinen und humanen Gelsolins ist ein ähnliches Bandenmuster bei humanen und murinen Plasmaproben zu erwarten. Um die Spezifität der Immunodetektion zu zeigen, wurde das Plasma einer Wildtyp-Maus mit dem von gelsolindefizienten Mäusen verglichen. Gelsolindefiziente Mäuse exprimieren weder zytosolisches noch sekretorisches Gelsolin. Der für Western blots an humanem Plasma verwendete primäre Antikörper wurde in der Maus generiert. Daher verursacht die Verwendung des sekundären Antikörper GAM (Goat-Anti-Mouse) bei murinem Plasma viele unspezifische Banden. Daher wurde für Western blots an murinem Plasma- und Gewebegelsolin als primärer Antikörper ein nicht kommerziell erhältlicher polyklonaler Antikörper verwendet. Dieser polyklonale Antikörper wurde in Kaninchen generiert und von David Kwiatkowski (DK) zur Verfügung gestellt. Im murinen Plasma wird mit dem polyklonalen Antikörper eine breite intensive Bande um 83 kD und zwei schmale intensive Banden bei 40 kD detektiert. Die 83 kD Bande repräsentiert das intakte Gelsolin, die 40 kD Bande die Cleavageprodukte. Die Gelelektrophorese mit anschließendem Western blot von Plasma gelsolindefizienter Mäuse zeigte keine Immunoreaktivität.

Bei den Western blots der humanen Kontroll- und Patientenplasmen wurde ein monoklonaler, kommerziell verfügbarer Antikörper verwendet. Die Gelelektrophorese mit anschließendem Western blot von humanem Plasma zeigt sowohl bei den Patientenplasma als auch bei den Kontrollplasma eine breite intensive Bande bei 83 kD. Diese repräsentiert das intakte sekretorische Gelsolin. Der monoklonale Antikörper differenziert die Cleavageprodukte des Gelsolins bei 40 kD schlechter als der polyklonale Antikörper. Im Vergleich mit dem polyklonalen Antikörper erscheint bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers die Bande der Spaltprodukte bei 40 kD flauer und breiter. Bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers wird eine dritte schmale, intensive Bande bei 18 kD detektiert. Bei der Verwendung des polyklonalen Antikörpers erscheint diese nicht.

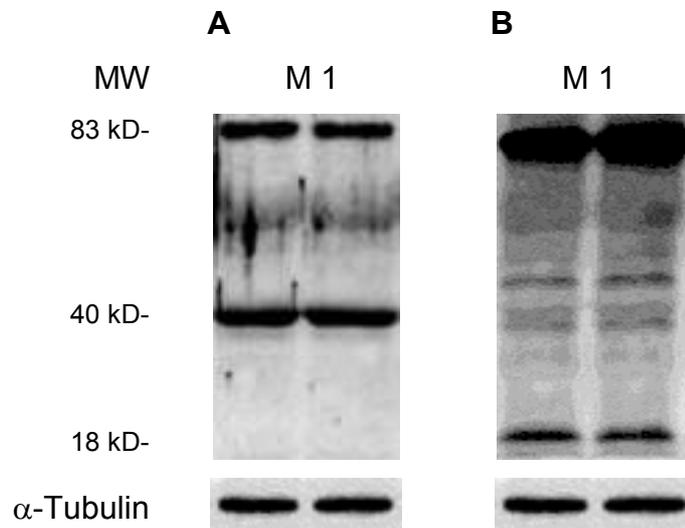


**Abbildung 4:** Gelelektrophorese und Western blot von murinem Plasma mit dem polyklonalen anti-gsn-Antikörper (**A**), jeweils zwei lanes mit gleichem Proteingehalt (20 µg Gesamtprotein pro lane). Neben dem Gelsolin-Wildtyp wurde Plasma gelsolindefizienter Mäuse (gsn<sup>-/-</sup>) als Negativkontrolle verwendet. Im Plasma von Wildtyp-Mäusen lässt sich das intakte sekretorische bzw. zytoplasmatische Gelsolin bei 83 kD detektieren, das gespaltene Gelsolin findet man mit zwei Banden bei 40 kD. Im Plasma von gelsolindefizienten Mäusen werden keine spezifischen Banden detektiert. Primärer polyklonaler anti-gsn-Antikörper in der Verdünnung 1:1000 (5 µl anti-gsn-Antikörper : 5 ml 5% TBST-Milch) 3h bei Raumtemperatur, sekundärer Antikörper GAR in einer Verdünnung von 1:3000 (2 µl GAR : 6 ml TBST) 1,5h bei Raumtemperatur. Gelelektrophorese und Western blot von Kontrollplasma des gesunden Probanden FH mit dem monoklonalen anti-gsn-Antikörper (**B**), zwei lanes des gleichen Probanden mit gleichem Proteingehalt (60 µg Gesamtprotein pro lane). Beim Western blot von humanem Plasma mit dem monoklonalen anti-gsn-Antikörper zeigt sich neben der Bande bei 83 und 40 kD eine weitere schmale, intensive Bande bei 18 kD. Die Bande bei 83 kD zeigt das intakte plasmatische Gelsolin, die Bande bei 40 und 18 kD die Gelsolinspaltprodukte an. Primärer monoklonaler anti-gsn-Antikörper, Verdünnung 1:500 in 5% TBST-Milch 3h bei Raumtemperatur, sekundärer Antikörper GAM, Verdünnung 1:1000 in TBST 1,5h bei Raumtemperatur.

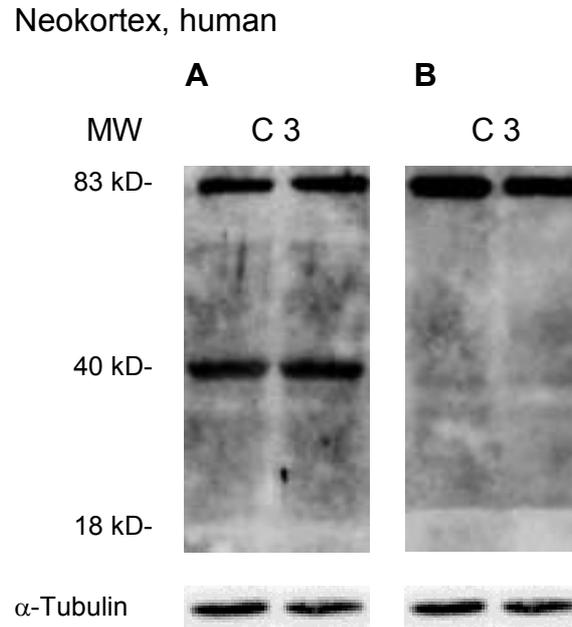
### 3.1.3 Western blot von humanem zytosolischen Gelsolin

Bei der Proteinanalyse von Patienten- und Kontrollplasma mit dem verwendeten monoklonalen Antikörper wurde neben der 83 und 40 eine 18 kD Bande detektiert. Die 18 kD Bande konnte bei Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern im murinem Plasma nicht nachgewiesen werden. Zur Charakterisierung der beiden anti-Gelsolin-Antikörper und der mit ihnen im Plasma detektierten Banden wurden Western blots von humanen zytosolischen Präparationen aus Myokard- und Neokortexgewebe durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei der Proteinpräparation von zytosolischem Gelsolin mit dem monoklonalen Antikörper weniger Gelsolinspaltprodukte detektiert wurden. Im Western blot von gesundem humanem Myokardgewebemogenat mit dem verwendeten monoklonalen Antikörper wurde neben der 83 und 40 kD Bande eine 18 kD Bande detektiert. Bei der Präparation von humanem Neokortexgewebe wurden keine Spaltprodukte detektiert. Bei der Verwendung des polyklonalen Antikörpers zeigten sich konstant zwei Banden. Eine Bande bei 83 kD, welche das intakte Gelsolin und eine Bande um 40 kD, die die Gelsolinspaltprodukte repräsentiert. Die dargestellten Western blots stellen nur eine Auswahl dar. Eine Übersicht über alle untersuchten Neokortex- und Myokardproben sowohl mit dem monoklonalen als auch mit dem polyklonalen Antikörper ist im Anhang abgebildet (Kapitel 6.3).

## Myokard, human



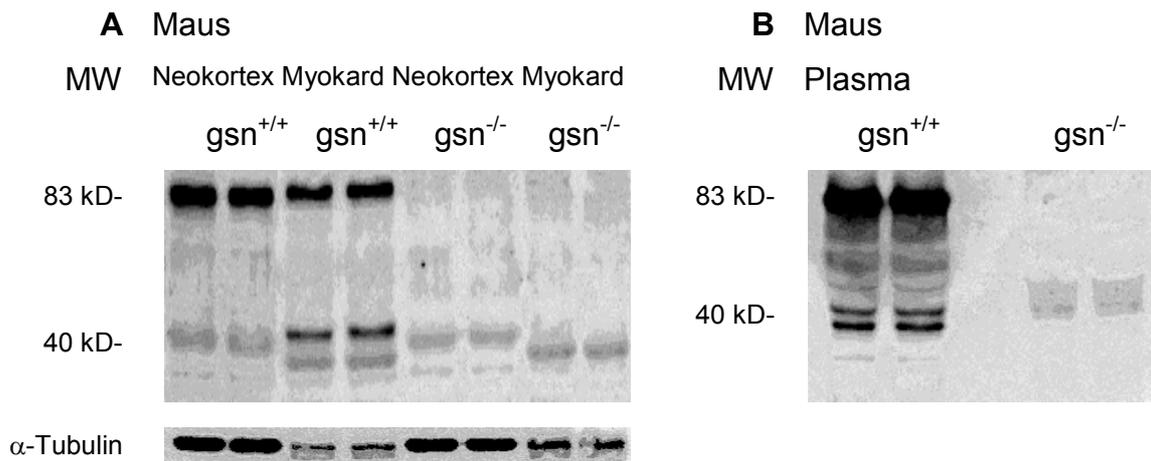
**Abbildung 5:** Exemplarischer Western blot einer Proteinpräparation von humanem Myokard des Probanden M1 mit dem polyklonalen anti-gsn-Antikörper (**A**). Die Western blots aller Probanden sind im Anhang dargestellt. Beide lanes stammen von demselben Probanden und enthalten die gleiche Proteinmenge (20  $\mu$ g Gesamtprotein pro lane). Die Bande bei 83 kD repräsentiert das intakte Gelsolin, bei 40 kD wurde ein Gelsolinspaltprodukt detektiert. Primärer polyklonaler anti-gsn-Antikörper in der Verdünnung 1:1000 (5  $\mu$ l Antikörper : 5 ml 5% TBST-Milch) 3h bei Raumtemperatur, sekundärer Antikörper GAR in einer Verdünnung von 1:3000 (2  $\mu$ l GAR : 6 ml TBST) 1,5h bei Raumtemperatur. Western blot einer Proteinpräparation von humanem Myokard mit dem monoklonalen anti-gsn-Antikörper (**B**). Beide lanes stammen von demselben Probanden und enthalten die gleiche Proteinmenge (20  $\mu$ g Gesamtprotein pro lane). Die Bande bei 83 kD detektiert das intakte zytosolische Gelsolin. Bei 18 und 40 kD sind Gelsolinspaltprodukte nachweisbar. Primärer monoklonaler anti-gsn-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 5% TBST-Milch 3h bei Raumtemperatur, sekundärer Antikörper GAM in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST 1,5h bei Raumtemperatur.



**Abbildung 6:** Exemplarischer Western blot einer Proteinpräparation von humanem Kortexgewebe des Probanden C3 mit dem polyklonalen anti-gsn-Antikörper (**A**). Die Western blots aller Probanden sind im Anhang dargestellt. Beide lanes stammen von demselben Probanden und enthalten die gleiche Menge an Protein (20  $\mu$ g Gesamtprotein pro lane). Nachweis von Antikörperbindung bei 83 und 40 kD. Die 83 kD Bande repräsentiert das intakte zytosolische Gelsolin, die 40 kD Bande die Spaltprodukte. Primärer polyklonaler anti-gsn-Antikörper in der Verdünnung 1:1000 (5  $\mu$ l Antikörper : 5 ml 5% TBST-Milch) 3h bei Raumtemperatur, sekundärer Antikörper GAR in einer Verdünnung von 1:3000 (2  $\mu$ l GAR : 6 ml TBST) 1,5h bei Raumtemperatur. Western blot einer Proteinpräparation von humanem Kortexgewebe mit dem monoklonalen anti-gsn-Antikörper (**B**). Beide lanes stammen von demselben Probanden und enthalten die gleiche Menge an Protein (20  $\mu$ g Gesamtprotein pro lane). Der Nachweis von Immunoreaktivität bei 83 kD zeigt das intakte zytosolische Gelsolin an. Weitere Antikörperbindungen sind nicht nachweisbar. Primärer monoklonaler anti-gsn-Antikörper 1:500 in 5% TBST-Milch 3h bei Raumtemperatur, sekundärer Antikörper GAM 1:1000 in TBST 1,5h bei Raumtemperatur.

### 3.1.4 Vergleich von murinem zytosolischen und plasmatischen Gelsolin

Um die Spezifität der Banden in humanen Gewebepreparationen zu überprüfen, wurden die Western blots auch mit murinem Gewebe durchgeführt, weil dabei auch Gewebe von  $gsn^{-/-}$  Mäusen zur Verfügung stand. Mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers war eine deutliche Immunodetektion von Gelsolin in den Gewebeproben der Wildtyp-Mäuse feststellbar. Die Bande bei 83 kD zeigt das intakte Gelsolin, die Bande bei 40 kD Gelsolinspaltprodukte an. Weder in den Proteinpräparationen der gelsolindefizienten murinen Gewebeproben noch im Plasma von  $gsn^{-/-}$  Mäusen war eine Immunoreaktivität nachweisbar. Bei der Proteinanalyse von Plasma von Wildtyp-Mäusen zeigen sich mit dem polyklonalen Antikörper Banden bei 83 und zwei weitere Banden bei 40 kD, die Gelsolinspaltprodukte repräsentieren. Die Bande bei 18 kD fehlt.



**Abbildung 7:** Western blot einer Proteinpräparation von murinem Myokard und Neokortex von Wildtyp und gelsolindefizienten Mäusen (**A**). Western blot einer Proteinpräparation von murinem Plasma von Wildtyp und gelsolindefizienten Mäusen (**B**). Das Neokortex- und Myokardgewebe sowie das Plasma stammen von demselben Wildtyp-Individuum. Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. Analog dazu wurde Neokortex- und Myokardgewebe sowie das Plasma von einer gelsolindefizienten Maus verwendet. Die Proteinpräparationen der Wildtyp-Maus zeigen eine deutliche Bande bei 83 kD. Diese Bande repräsentiert das intakte Gelsolin. Während im Plasma und in der Myokardpräparation Gelsolinspaltprodukte nachweisbar sind, zeigen sich in der Neokortexpräparation keine Spaltprodukte. Die Neokortex-, Myokard- und Plasmapräparation der gelsolindefizienten Maus zeigen keine Immunoreaktivität.

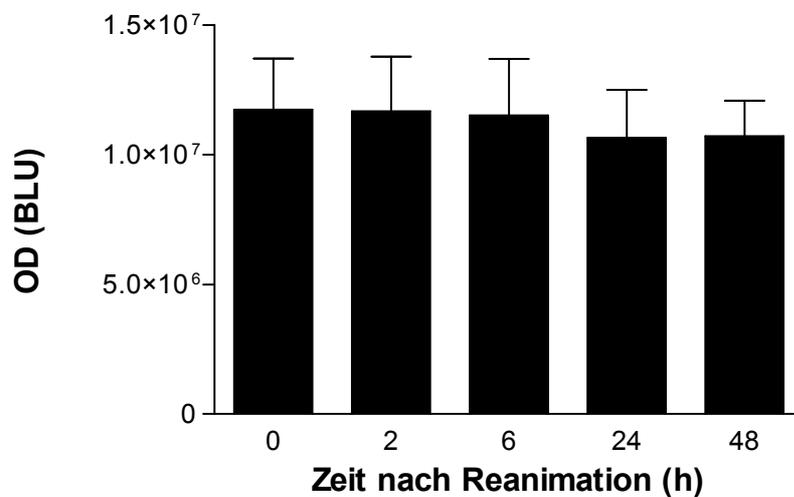
### **3.2 Densitometrische Auswertung der Gelsolin Western blots**

Nach der Proteinauftrennung der Patientenproben erfolgte eine densitometrische Auswertung der Western blot Banden. Die densitometrische Quantifizierung erfolgte anhand arbiträrer Boehringer light units (BLU), als Maßeinheit für die optische Dichte (OD), also die Schwärzungsintensität der Bande. Es wurde für jede Bande der Mittelwert dieser Bande aus allen Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt (initial, 2, 6, 24 und 48 Stunden nach Reanimation) gemessen. Mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) wurde der Mittelwert der Banden zu den Zeitpunkten 2, 6, 24 und 48 Stunden nach Reanimation mit dem Mittelwert zum Zeitpunkt der initialen Blutentnahme (direkt nach erfolgreicher Reanimation) dieser Bande verglichen.

Als post-Test wurde der Dunnett's Test verwendet. Dieser testet die Ausgänge eines multiplen Vergleiches gegen eine Kontrolle.

### 3.2.1 Zeitverlauf der 83 kD Bande nach kardiopulmonaler Reanimation

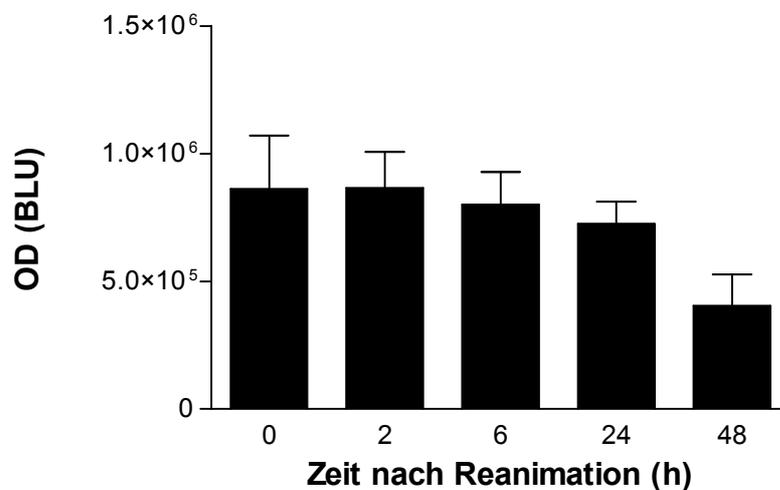
Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei der 83 kD Bande um das intakte humane plasmatische Gelsolin. Zu jedem der fünf Zeitpunkte wurde der Mittelwert der OD für die 83 kD Bande aus den Messergebnissen der Patientenplasmen ermittelt. Die ANOVA und der Dunnetts-Test zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den gemessenen OD der 83 kD Bande aller Patienten über einen Zeitraum von 48h ( $p_{0h \text{ vs. } 2h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 6h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 24h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 48h} = \text{n.s.}$ ).



**Abbildung 8:** Verlauf der 83 kD Bande über 48 Stunden als Mittelwert aller eingeschlossenen Patienten. Die 83 kD Bande repräsentiert das intakte Gelsolin. Nach densitometrischer Auswertung der Western blots und Quantifizierung in Boehringer Light Units (BLU) als Maßeinheit konnte kein signifikanter Unterschied in der Konzentration des intakten Gelsolin festgestellt werden ( $p_{0h \text{ vs. } 2h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 6h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 24h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 48h} = \text{n.s.}$ ; Pat. Nr.: Mean  $\pm$  SEM; Pat. 2:  $5,8600 \times 10^6 \pm 437212$ ; Pat. 4:  $9,9588 \times 10^6 \pm 2,0766 \times 10^6$ ; Pat. 7:  $8,4100 \times 10^6 \pm 1,7529 \times 10^6$ ; Pat. 11:  $1,2333 \times 10^7 \pm 867020$ ; Pat. 13:  $1,8688 \times 10^7 \pm 920230$ ; Pat. 14:  $1,6328 \times 10^7 \pm 1,9319 \times 10^6$ ; Pat. 16:  $9,4538 \times 10^6 \pm 824332$ ; Pat. 17:  $7,5730 \times 10^6 \pm 1,5693 \times 10^6$ ; Pat. 28:  $2,0158 \times 10^7 \pm 2,0349 \times 10^6$ ; Pat. 29:  $4,9860 \times 10^6 \pm 738878$ ).

### 3.2.2 Zeitverlauf der 40 kD Bande nach kardiopulmonaler Reanimation

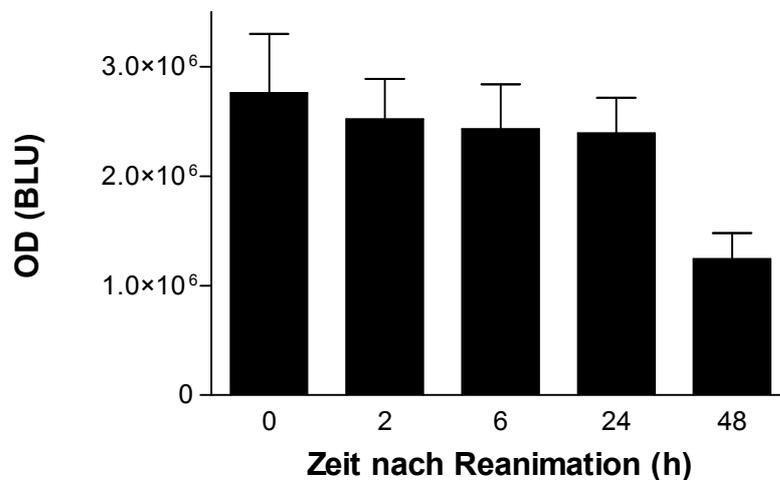
Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei der 40 kD Bande um das gespaltene Gelsolin. Zu jedem der 5 Zeitpunkte wurde der Mittelwert der OD für die 40 kD Bande aus den Messergebnissen der Patientenplasmen ermittelt. Die ANOVA und der Dunnetts-Test zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der gemessenen OD der 40 kD Bande über einen Zeitraum von 48h ( $p_{0h \text{ vs. } 2h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 6h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 24h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 48h} = \text{n.s.}$ ).



**Abbildung 9:** Verlauf der 40 kD Bande über 48 Stunden aller eingeschlossenen Patienten. Die 40 kD Bande repräsentiert Gelsolinspaltprodukte. Nach densitometrischer Auswertung der Western blots und Quantifizierung der OD in Boehringer Light Units (BLU) als Maßeinheit konnte kein signifikanter Unterschied in der Konzentration der Gelsolinspaltprodukte festgestellt werden ( $p_{0h \text{ vs. } 2h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 6h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 24h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 48h} = \text{n.s.}$ ; Pat. Nr.: Mean  $\pm$  SEM; Pat. 2: 910875  $\pm$  80175; Pat. 4: 662500  $\pm$  8203; Pat. 7: 1,7313  $\times 10^6 \pm$  299036; Pat. 11: 931250  $\pm$  123709; Pat. 13: 985250  $\pm$  56266; Pat. 14: 447650  $\pm$  110399; Pat. 16: 1,1215  $\times 10^6 \pm$  89201; Pat. 17: 442700  $\pm$  56975; Pat. 28: 467000  $\pm$  38950  $\times 10^6$ ; Pat. 29: 343300  $\pm$  37781).

### 3.2.3 Zeitverlauf der 18 kD Bande nach kardiopulmonaler Reanimation

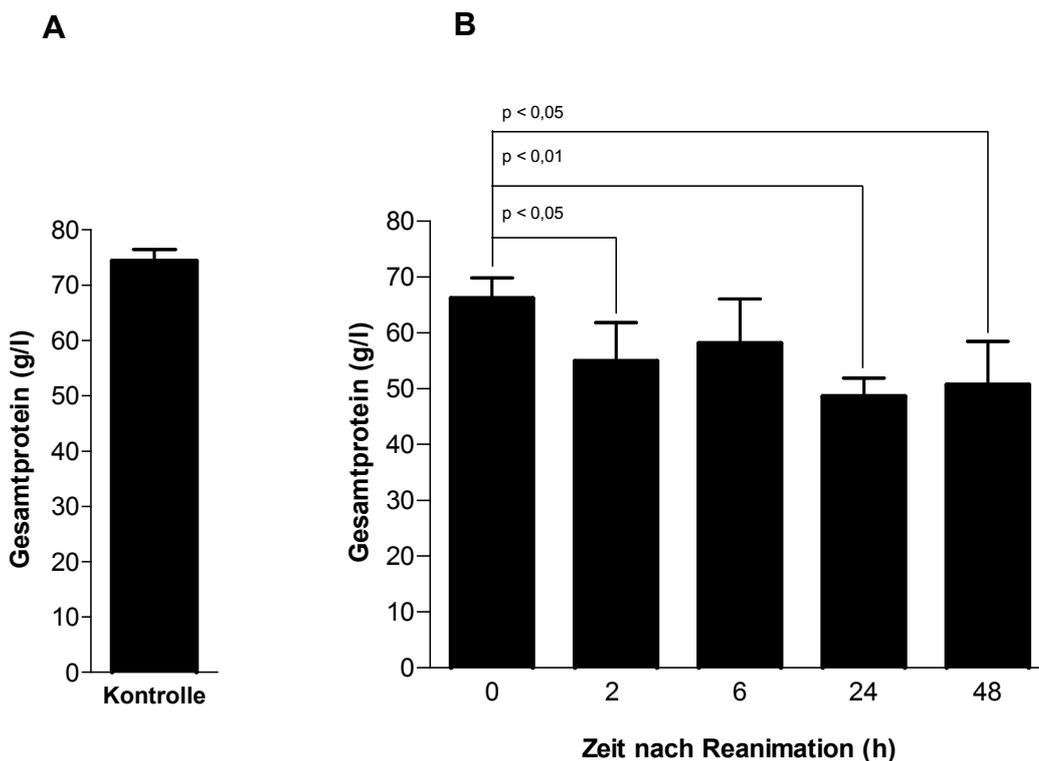
Der monoklonale Antikörper detektiert eine Bande bei 18 kD. Hierbei handelt es sich am ehesten um ein Gelsolinprodukt. Durch den polyklonalen Antikörper erfolgt keine Detektion der 18 kD Bande. Der Verlauf der 18 kD Bande über 48 Stunden zeigt keine signifikanten Unterschiede in der ANOVA und dem Dunnetts-Test ( $p_{0h \text{ vs. } 2h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 6h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 24h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 48h} = \text{n.s.}$ ).



**Abbildung 10:** Verlauf der 18 kD Bande über 48 Stunden aller eingeschlossenen Patienten. Die 18 kD Bande repräsentiert ein Gelsolinfragment. Nach densitometrischer Auswertung der Western blots und Quantifizierung in Boehringer Light Units (BLU) als Maßeinheit konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p_{0h \text{ vs. } 2h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 6h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 24h} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. } 48h} = \text{n.s.}$ ; Pat. Nr.: Mean  $\pm$  SEM; Pat. 2:  $4,0938 \times 10^6 \pm 77765$ ; Pat. 4:  $1,7125 \times 10^6 \pm 62400$ ; Pat. 7:  $4,3375 \times 10^6 \pm 766199$ ; Pat. 11:  $3,5725 \times 10^6 \pm 265648$ ; Pat. 13:  $3,0575 \times 10^6 \pm 92162$ ; Pat. 14:  $782875 \pm 50595$ ; Pat. 16:  $2,5250 \times 10^6 \pm 84484$ ; Pat. 17:  $1,1506 \times 10^6 \pm 51398$ ; Pat. 28:  $2,1780 \times 10^6 \pm 125216$ ; Pat. 29:  $1,3350 \times 10^6 \pm 87164$ ).

### 3.3 Zeitverlauf der Gesamtproteinkonzentration im Plasma nach kardiopulmonaler Reanimation

Die Gesamtproteinkonzentration im Plasma wurde nach Bradford bestimmt. Es wurde der Mittelwert aus den Gesamtproteinkonzentrationen aller Patienten für jeden Zeitpunkt der Blutentnahmen bestimmt. Der Mittelwert der Gesamtproteinkonzentration war 2, 24 und 48 Stunden nach Reanimation signifikant vermindert im Vergleich zur Gesamtproteinkonzentration der Patienten zum initialen Zeitpunkt nach Reanimation. Darüber hinaus ergab der durchgeführte Student t-Test keinen Unterschied zwischen der Gesamtproteinkonzentration der Kontrollgruppe und der Gesamtproteinkonzentration der Patientengruppe zum initialen Zeitpunkt nach Reanimation (ANOVA und Dunnett's posthoc tests:  $p_{0h \text{ vs. Kontrolle}} = \text{n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. 2h}} < 0,01$ ,  $p_{0h \text{ vs. 6h}} \text{ n.s.}$ ;  $p_{0h \text{ vs. 24h}} < 0,01$ ;  $p_{0h \text{ vs. 48h}} < 0,01$ ).



**Abbildung 11:** Kontrollplasma gesunder Probanden (A). Die Gesamteiweißkonzentration der Kontrollgruppe unterscheidet sich nicht von der der reanimierten Patienten zum Zeitpunkt der

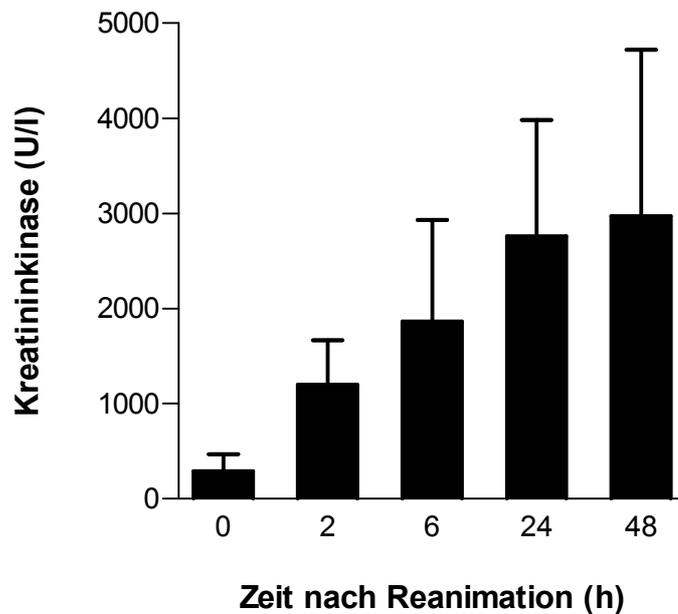
Reanimation (Patientenplasma 0h vs. Kontrolle  $p = 0,18$  Mittelwert MEAN = 74,37 g/l; Standardabweichung der Mittelwerte SEM = 2,013 g/l). Hierzu wurde ein Student t-Test verwendet. Patientenplasma nach erfolgter Reanimation (**B**). Die Gesamteiweißkonzentration ist vom initial gemessenen Zeitpunkt (0h) im Vergleich mit den Werten 2, 24 und 48 Stunden nach Reanimation signifikant vermindert. Hierzu wurde eine one-way ANOVA mit einem Dunnett's posthoc Test angewandt (Pat. Nr.: Mean  $\pm$  SEM; Pat. 2: 61,82  $\pm$  8,293; Pat. 4: 57,55  $\pm$  6,157; Pat. 7: 61,56  $\pm$  0,9608; Pat. 11: 51,90  $\pm$  2,817; Pat. 13: 54,53  $\pm$  3,140; Pat. 14: 62,06  $\pm$  5,829; Pat. 16: 50,07  $\pm$  5,739; Pat. 17: 50,02  $\pm$  2,104; Pat. 28: 49,53  $\pm$  4,735; Pat. 29: 67,43  $\pm$  3,935).

### **3.4 Zeitverlauf der Kreatinkinase im Plasma nach kardiopulmonaler Reanimation**

Kreatinkinase (CK) ist ein zytosolisches Protein, das für die schnelle Rephosphorylierung von ADP zu ATP verantwortlich ist. Die CK ist in Skelett- und Herzmuskulatur stark exprimiert. Somit äußern sich Barrierestörungen der Zellmembran von Skelett- und Herzmuskelzellen in einem Anstieg der CK im Blut (Dörner, 2003). Die Patienten in der vorliegenden Arbeit wiesen innerhalb der ersten 48h nach kardiopulmonaler Reanimation einen massiven CK-Anstieg im Blut auf. Teilweise wurde mehr als das 100-fache des oberen CK-Referenzwertes gemessen. Der Anteil der CK, welche aus Herzmuskelzellen freigesetzt wird, kann anhand der CK-MB Fraktion von der Gesamt-CK bestimmt werden. Bei koronararteriellen Verschlüssen ist diese Fraktion erhöht. Im Rahmen der Herzinfarkt Diagnostik stellt die CK-Bestimmung ein wichtiges diagnostisches Werkzeug dar (Dörner, 2003).

Die Patienten in der hier vorliegenden Arbeit wurden bei Einlieferung einer notfallmäßigen Koronarangiographie gegebenenfalls mit Angioplastie oder Stentimplantation unterzogen. Da auf diese Weise ein akuter Myokardinfarkt nachgewiesen und behandelt werden konnte, wurde während des stationären Aufenthaltes häufig auf die Bestimmung der CK-MB Fraktion verzichtet. Es wurde lediglich die Gesamt-CK zur Quantifizierung des allgemeinen Zellschadens bestimmt. Erfahrungswerte zeigen, dass unkomplizierte akute koronararterielle Verschlüsse einen CK-Anstieg bis 600 U/l innerhalb der ersten 2 Tage zeigen. Unter einem unkomplizierten Herzinfarkt versteht man einen akuten koronararteriellen Verschluss, der ohne maligne Rhythmusstörungen oder Auftreten eines kardiogenen Schocks abläuft. Bei

degenerativen Muskelerkrankungen kann abhängig vom Schweregrad ein CK-Anstieg auf 8000 U/l beobachtet werden. Die Patienten der vorliegenden Arbeit zeigten teilweise einen Anstieg der CK-Werte auf über 9000 U/l.



**Abbildung 12:** Zeitverlauf der CK über 48h nach kardiopulmonaler Reanimation. Der Referenzbereich der CK von 10-80 U/l wird mit Werten teilweise über 9000 U/l deutlich überschritten. Dies spricht für eine Störung der Zellmembran der Herz- und Skelettmuskulatur. Bei den in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen Patienten ist im Durchschnitt bereits 2 Stunden nach Reanimation der obere Referenzwert überschritten. Bei den Patienten der vorliegenden Arbeit wurden CK-Werte bis über 9000 U/l nach 48h gemessen (Pat. Nr.: Mean  $\pm$  SEM; Pat. 2: 57,00  $\pm$  0,0; Pat. 4: 363,0  $\pm$  85,60; Pat. 7: 5002  $\pm$  2375; Pat. 11: 3626  $\pm$  1968; Pat. 13: 962,8  $\pm$  606,4; Pat. 16: 311,0  $\pm$  93,79; Pat. 28: 1223  $\pm$  443,5).

### 3.5 Zustand 3 Monate nach Reanimation

| Patienten Nr.: | Zustand 3 Monate nach Reanimation                       |
|----------------|---|
| 2              | Entlassung, mit hypoxischem Hirnschaden                 |
| 4              | Entlassung ohne neurologisches Defizit                  |
| 7              | Verstorben  |
| 11             | Verstorben  |
| 13             | Entlassung ohne neurologisches Defizit                  |
| 14             | Verstorben  |
| 16             | Verstorben  |
| 17             | Entlassung, mit vorbestehenden neurologischen Defiziten |
| 28             | Weiterhin stationäre Behandlung                         |
| 29             | Übernahme ins Pflegeheim mit hypoxischem Hirnschaden    |

## 4. Diskussion

### 4.1 Interpretation der 18 kD Bande

Bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers von Sigma ließ sich bei den Plasmaproteinpräparationen der Patienten und der freiwilligen Probanden stets eine Bande bei 18 kD detektieren. Diese Bande zeigte sich bei Verwendung des polyklonalen anti-human-gsn-Antikörpers nicht.

Bei der Generierung von polyklonalen Antikörpern durch Immunisierung eines Kaninchens kann nicht vorher bestimmt werden, gegen welche Epitope des immunisierenden Peptids die Antikörperbildung erfolgt. Wird das gesamte Peptid zur Immunisierung verwendet, entsteht eine Vielzahl verschiedener Antikörper gegen diverse Epitope auf dem Peptid. Solche Antikörper-Präparationen, wie der hier verwendete DK anti-human-gsn-Antikörper, werden Antiserum genannt. Diese Antikörper sind erfahrungsgemäß sehr gut für die Darstellung von Proteinen im Western blot geeignet, aber nicht für die selektive Detektion bestimmter Fragmente. Dies kann auch dazu führen, dass Spaltprodukte des Gelsolins das entsprechende Epitop nicht aufweisen und das Antiserum das Spaltprodukt nicht detektiert. Dies ist im Fall der 18 kD Bande zu vermuten. Caspase-3-vermittelt kann an Position DQTD<sup>352</sup>G und SEPD<sup>588</sup>G des zytosolischen und Position DQTD<sup>376</sup>G und SEPD<sup>612</sup>G des plasmatischen Gelsolins gespalten werden, so dass Fragmente von 41 bzw. 39 und 18 kD entstehen (Kamada et al., 1998; Ohtsu et al., 1997). Der monoklonale Antikörper von Sigma bindet möglicherweise an ein Epitop auf diesem 18 kD Fragment, wobei unklar ist, warum bei gesunden Probanden und Probenkühlung eine Caspase-3-like Enzymaktivität entsteht. Deshalb muss auch an ein anderes nichtidentifiziertes Protein mit passendem Epitop gedacht werden.

## **4.2 Zeitverlauf des Plasmagelsolins**

Die vorliegende Arbeit zeigt eine konstante Konzentration von Gelsolin im Plasma von Patienten nach Reanimation innerhalb der ersten 48 Stunden. Im Gegensatz dazu zeigten andere Arbeiten im Plasma von Patienten mit akutem fulminanten Leberversagen, Gram-negativer Sepsis, akutem Myokardinfarkt, Myonekrose und polytraumatisierten Patienten eine signifikante Verminderung der Gelsolinplasmakonzentration innerhalb des ersten Tages, was meist im Sinne eines Verbrauches als Aktin-Scavenger gedeutet wurde (Dahl et al., 1999; Suhler et al., 1997).

### **4.2.1 Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und Vergleich mit anderen Untersuchungen**

Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeit gegenüber der Literatur können dadurch erklärbar sein, dass verbrauchtes plasmatisches Gelsolin durch zytosolisches Gelsolin, das aus der Skelettmuskulatur freigesetzt wird, kompensiert wird. Auf diese Weise wäre auch bei Krankheitsbildern mit massivem Zelluntergang keine Veränderung der Plasmakonzentration von Gelsolin nachweisbar (Dahl, 2005).

Auszuschließen sind die Überlegungen, dass das EASS aufgrund fehlender Freisetzung von Aktin nicht in Anspruch genommen wurde oder die periphere Gewebeschädigung mit Freisetzung von Aktin in die Blutbahn erst nach dem Untersuchungszeitraum erfolgte. Denn bei den eingeschlossenen Patienten kam es innerhalb der ersten 48 Stunden nach Reanimation zu einem massiven Anstieg der Gesamt-CK. Teilweise wurden CK-Werte von mehr als 9000 U/l gemessen. Im Rahmen eines unkomplizierten koronararteriellen Verschlusses steigen die Werte der Gesamt-CK erfahrungsgemäß auf Werte bis 600 U/l (Dörner, 2003). Der Anstieg der Gesamt-CK auf derart hohe Werte ist somit nicht allein durch die Freisetzung von CK aus dem Myokard zu erklären. Daher weisen diese hohen CK-Werte auf eine deutliche Zellschädigung mit Barrierestörung des gesamten Organismus vor allem der Skelettmuskulatur durch den Herz-Kreislauf-Stillstand hin. Anhand dessen kann das Austreten von Aktin in der Blutbahn angenommen werden. Auf die im Rahmen der routinemäßigen Herzinfarkt Diagnostik durchgeführte Bestimmung der CK-MB Fraktion wurde hier oftmals verzichtet. Denn bei

den untersuchten Patienten war ein akuter koronararterieller Verschluss die Ursache des Herz-Kreislaufstillstandes. Dieser wurde bei Aufnahme des Patienten mittels Koronarangiographie bestätigt und durch Angioplastie mit Stentimplantation behandelt. Daher reicht die Bestimmung der Gesamt-CK zur Verlaufskontrolle des Infarktes aus.

Die Verringerung der Plasmagelsolinkonzentration in den Untersuchungen an Patienten mit akutem fulminanten Leberversagen, Gram-negativer Sepsis, akutem Myokardinfarkt, Myonekrose und polytraumatisierten Patienten könnte durch einen Verdünnungseffekt durch Infusionen verursacht worden sein, was von anderen Autoren bei der Bestimmung der Gelsolinkonzentration nicht berücksichtigt wurde. Durch die intensive Volumentherapie während der ersten 48 Stunden konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Verringerung des Gesamtproteins bei den untersuchten Patienten nachgewiesen werden. In den oben zitierten Arbeiten wurde das Gelsolin im Plasma von Patienten ohne vorherige Proteinkorrektur / Normalisierung untersucht. Dadurch könnte ein stärkerer Abfall des Gelsolinplasmaspiegels gemessen worden sein, als tatsächlich vorlag. Diese Problematik wurde von anderen Autoren bedacht aber methodenbedingt nicht immer in der Berechnung berücksichtigt (Dahl, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Normalisierung der aufzutragenden Proteinkonzentration durchgeführt. Mittels Proteinbestimmung nach Bradford wurde im Vorhinein die Gesamtproteinkonzentration der zu untersuchenden Proben bestimmt. Anschließend wurden mit Hilfe einer Verdünnungsberechnung die Proben in der Weise verdünnt, dass nur Proben mit gleichen Gesamtproteinkonzentrationen miteinander verglichen werden konnten. So wurde gewährleistet, dass von den Patientenplasmaproben und den Kontrollplasmaproben stets 60 µg Gesamtprotein pro lane aufgetragen wurden. Auf diese Weise wurde der Verdünnungseffekt korrigiert.

Der enorme logistische Aufwand hat dazu geführt, dass trotz des Untersuchungszeitraumes von 3 Jahren nur 10 bzw. 9 bzw. 4 Patienten in die Studie eingeschlossen werden konnten. Arbeiten mit einem geringeren logistischen Aufwand haben 23 polytraumatisierte Patienten (Dahl et al., 1999), 18 Patienten mit akutem Leberversagen, 10 Patienten mit akutem Myokardinfarkt und 12 Patienten mit Myonekrose unterschiedlicher Genese untersucht (Suhler et al., 1997).

Es ist zu diskutieren, ob bei einer größeren Anzahl von Patienten ein signifikanter Abfall der Gelsolinspaltprodukte nachweisbar wäre. Insbesondere nach 48h ist eine abnehmende Tendenz zu erkennen.

#### **4.2.2 Methodenkritik**

Auch die unterschiedlichen Messmethoden für Gelsolin müssen diskutiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Gelsolinmenge semiquantitativ mittels Western blot bestimmt. Es kann keine Aussage über die absolute Menge an Gelsolin in der untersuchten Probe getroffen werden. Lediglich eine Zunahme oder eine Abnahme im Vergleich mit anderen Proben ist möglich. Andere Arbeiten verwendeten ebenfalls ein Western blot Verfahren zur Analyse der Gelsolinkonzentrationen. Allerdings wurde bei jedem Western blot neben den zu analysierenden Patientenplasma-Proben 4 Proben mit definierten Gelsolinkonzentrationen zum Vergleich mitgeführt. Somit war nach densitometrischer Auswertung auch eine Aussage über die Gelsolinkonzentration in den Patientenplasmen möglich (Mounzer et al., 1999).

In anderen zitierten Arbeiten wurden die zu untersuchenden Proben nach dem Prinzip der Nephelometrie analysiert. Das Prinzip dieses Analyseverfahrens beruht in der Streuung eines einfallenden Lichtstrahls durch Antigen-Antikörperkomplexe. Je größer die Menge an Antigen-Antikörperkomplexen, desto stärker die Streuung des einfallenden Lichtstrahles. Durch die vorher durchgeführte Erstellung einer Eichkurve anhand von Antigen-Antikörperlösungen mit bekannten Gelsolinkonzentrationen ist eine quantitative Bestimmung der Gelsolinkonzentration einer Probe möglich.

In anderen Arbeiten wurde ein indirekter kompetitiver ELISA (Enzym linked immunosorbent assay) zur Bestimmung des Gelsolins verwendet. Hierbei wurden Wellplatten mit einem fixierten Anti-Gelsolin-Antikörper mit einer definierten Konzentration von Gelsolin inkubiert. Nach Verwerfen des Überstandes folgte die Inkubation mit einem Gemisch entweder von Patienten Plasmaproben mit anti-Gelsolin-Antikörpern oder einer Standardlösung mit definierten Gelsolin Konzentrationen mit anti-Gelsolin-Antikörpern. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Inkubation mit horseradish-peroxidase konjugierten anti-IgG-Antikörpern. Nach Verwerfen des Überstandes und Zugabe des horseradish-peroxidase Substrates erfolgte die Auswertung über eine optische Dichtemessung. Der Vorteil an diesem Verfahren ist die Quantifizierbarkeit der

Gelsolinkonzentration in den Patientenproben durch Verwendung von Standardlösungen mit definierten Gelsolinkonzentrationen. Allerdings ist jeder ELISA nur so gut wie der capturing-Antikörper, d.h. dass alle Banden, die ein Antikörper im Western blot erzeugt, im ELISA undifferenziert bleiben und zur Farbreaktion beitragen. Außerdem wird auch in der betreffenden Arbeit keine Proteinkorrektur der Plasmaproben der Patienten erwähnt, so dass bei Infusionstherapie der Patienten ein Verdünnungseffekt resultiert (Ito et al., 1992).

### **4.3 Zeitverlauf der Gelsolin Cleavageprodukte**

Die vorliegende Arbeit zeigt eine gleichbleibende Konzentration von Gelsolinspaltprodukten im Plasma von Patienten innerhalb der ersten 48 Stunden nach Reanimation. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob im Plasma auch vermehrt durch Caspase-3 prozessierte Gelsolinspaltprodukte vorhanden sind. Das Vorhandensein von Caspasen beschränkt sich physiologischerweise auf den Intrazellulärraum. Durch den Einfluss des Sauerstoffmangels kommt es intrazellulär zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Hierdurch kommt es unter anderem zur Spaltung von Gelsolin in die bereits genannten 41 bzw. 39 bzw. 18 kD Fragmente. Somit könnte ein Anstieg der Gelsolinspaltprodukte des zytosolischen Gelsolins Zeichen gesteigerter Apoptose aufgrund des Sauerstoffmangels sein. Das plasmatische Gelsolin kann ebenfalls durch Caspasen gespalten werden. Es ist also denkbar, dass die bei der Apoptose freigegebenen Caspasen auch plasmatisches Gelsolin spalten.

In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Aktin Gehalt im Plasma mehr Gelsolin gebunden wird und die Menge an freiem Gelsolin somit abnimmt. Dies bedeutet, dass eine Sättigung des EASS mit Aktin auftritt (Haddad et al., 1990). Es ist anzunehmen, dass bei Auftreten von Aktin im Plasma die Menge an Gesamtgelsolin zunächst gleich bleibt. Allerdings sollte die Menge an freiem Gelsolin abnehmen, während die Menge an gebundenem Gelsolin zunimmt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass bei Patienten mit ARDS die Gesamtgelsolinkonzentration erniedrigt ist. Da Gelsolin-Aktin-Komplexe über Stunden im peripheren Blut zirkulieren, ist eine Reduktion der Gesamtgelsolinkonzentration innerhalb der ersten 52 Minuten nicht zu erklären (Lind et al., 1988). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist somit auch nicht eine

vermehrte Gelsolinspaltung für den Abfall des Plasmagelsolinpiegels verantwortlich. Einige Autoren haben vorgeschlagen, dass sich die Aktin-Gelsolin-Komplexe extravasal im Interstitium anreichern, von wo sie allmählich hepatisch eliminiert würden (Dahl, 2005; Lind et al., 1986).

#### **4.4 Gelsolin als prädiktiver Parameter für die Entwicklung von Komplikationen und zu erwartende neurologische Defizite nach erfolgter Reanimation**

Der Zelluntergang im Rahmen eines Herz-Kreislaufstillstandes führt zu einer Freisetzung von Aktin in die Blutbahn (Lee und Galbraith, 1992; Smith et al., 1988). Das plasmatische Gelsolin spaltet dieses Aktin und sorgt zusammen mit Gc-Globulin für die Entfernung von Aktin und seinen Spaltprodukten aus der Blutbahn (Dahl, 2005; Lind et al., 1986). Hierbei kommt es zu einem Absinken des Gelsolinpiegels (Dahl et al., 1999; Suhler et al., 1997). Somit korreliert das Absinken des Gelsolinpiegels mit der Menge an freigesetztem Aktin und der Menge an untergegangenen Zellen. Letztendlich sollte daher über das Absinken des Gelsolinpiegels indirekt das Ausmaß des Zellschadens quantifiziert werden können. Dies hat insbesondere klinische Relevanz, da aktuell keine ausreichenden Parameter zur Verfügung stehen, die den diffusen Zellschaden in der Form quantifizieren können, dass eine Aussage über die Entwicklung von Komplikationen bzw. die zu erwartenden neurologischen Defizite getroffen werden kann. In der vorliegenden Arbeit sollte der Plasmagelsolinpiegel innerhalb der ersten 48 Stunden nach Reanimation gemessen werden und 3 Monate nach Reanimation eine Analyse der Krankenakten erfolgen. Die Krankenakte wurde geprüft hinsichtlich der Dauer des Intensiv- und Krankenhausaufenthaltes, der Menge an kreislaufunterstützenden Medikamente, der Vorerkrankungen und der neurologischen Situation des Patienten zum Zeitpunkt der Entlassung bzw. 3 Monate nach Reanimation. In der vorliegenden Arbeit konnten keine Veränderungen der Konzentration von Gelsolin oder Gelsolinspaltprodukten im Plasma von Patienten nach Reanimation innerhalb der ersten 48 Stunden festgestellt werden. Allerdings zeigten die untersuchten Patienten eine große Variation ihres Zustandsbildes nach der primär erfolgreichen Reanimation.

Die Bandbreite dieser Zustandsbilder reichte vom Tod innerhalb der ersten zwei Wochen nach Reanimation bis hin zum Überleben der kardiopulmonalen Reanimation ohne subjektive oder klinisch nachweisbare Residualsymptomatik. Somit eignet sich die Beurteilung des Verlaufes von Gelsolin und Gelsolinspaltprodukten mittels Western blot über 48 Stunden nach Reanimation nicht, um Aussagen über die Entwicklung von Komplikationen oder aber die zu erwartenden körperlichen Beeinträchtigungen zu treffen. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Gelsolin Spiegel bei polytraumatisierten Patienten am Tag der Einlieferung einen Hinweis auf die zu erwartenden respiratorischen Komplikationen gibt (Mounzer et al., 1999). Allerdings zeigen andere Untersuchungen zur Aussagefähigkeit des Gelsolin Spiegels im Blut von polytraumatisierten Patienten keinen Zusammenhang zwischen dem Gelsolin Spiegel und dem Schweregrad des Traumas oder der Überlebenschance (Dahl, 2005).

Der Umbau des Zytoskelettes bzw. die Kontrolle über diesen Umbau stellen eine zentrale Funktion der Zelle dar. Gelsolin wird in nahezu allen humanen Zellen exprimiert. Der klinische Nutzen von Gelsolin befindet sich zur Zeit noch im Experimentalstadium. Allerdings gibt es eine Reihe von Erkrankungen, die mit einer Veränderung der Gelsolinexpression einhergehen. Glatte Muskelzellen aus Narben- bzw. Strikturgewebe von Patienten mit Morbus Crohn zeigten in den entzündlich veränderten Darmabschnitten einen höheren intrazellulären Gehalt von Gelsolin als Zellen aus nicht entzündeten Abschnitten. Die Zellen aus dem Narbengewebe zeigten in der Zellkultur eine geringere Fähigkeit zur Kontraktion von Kollagenetzwerken. Es wird vermutet, dass die chronische Entzündungsreaktion eine gesteigerte Gelsolinexpression induziert, wodurch die Migrationsfähigkeit der glatten Muskelzellen erhöht wird (Ehrlich et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in humanem Myokard mit endgradiger ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie die Gelsolinexpression erhöht ist. In der Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob dies als Folge oder als Ursache der Kardiomyopathie zu werten ist (Yang et al., 2000). Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass eine erhöhte zytosolische Gelsolinkonzentration bei klarzelligem Nierenzellkarzinom mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Kim et al., 2005). Bereits andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Veränderungen der zytosolischen Gelsolinkonzentration beim Pankreaskarzinom, beim Nicht-kleinzelligen-

Bronchialkarzinom und beim duktalem Mammakarzinom prognostische Aussagen bezüglich des Stadiums der Tumorerkrankung liefern können. Beim Pankreaskarzinom genauso wie beim Nicht-kleinzelligen-Bronchialkarzinom korrelieren hohe zytosolische Gelsolinpiegel mit einem fortgeschrittenen Tumorleiden. Die hohe Konzentration von zytosolischem Gelsolin wurde als Zeichen einer erhöhten Zellmotilität als eine Voraussetzung für die Invasion umgebender Gewebe und Metastasierung gedeutet (Shieh et al., 1999; Thompson et al., 2006). In Arbeiten, die die Expression von Gelsolin in Gewebeproben von Mammakarzinomen gemessen haben, zeigten sich stadienabhängige Unterschiede in der zytosolischen Gelsolinkonzentration. In einem frühen Tumorstadium soll eine niedrige zytosolische Gelsolinkonzentration die Tumorentwicklung begünstigen. Im fortgeschrittenen Tumorstadium werde dann die Expression von Gelsolin wieder gesteigert, um über eine erhöhte Zellmotilität eine Invasion der umgebenden Gewebe und die Metastasierung zu ermöglichen (Somari et al., 2003; Thor et al., 2001). Die Begünstigung der Tumorentwicklung am Anfang einer Tumorerkrankung durch niedrige zytosolische Gelsolinpiegel ist kritisch zu betrachten. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen belegen den antiapoptotischen Effekt von Gelsolin. Dieser Effekt würde eine Tumorentwicklung begünstigen, während eine Down-Regulation antiapoptotischer Effekte bei einem Karzinom wenig sinnvoll erscheint (Harms et al., 2004; Leifeld et al., 2006).

#### **4.5 Interpretation der vergleichenden Western blots von zytosolischem und plasmatischem humanen und murinen Gelsolin**

Die Proteinpräparation und der anschließende Western blot von plasmatischem Gelsolin ergibt ein typisches Bandenmuster. Die intensive Bande bei 83 kD repräsentiert das intakte Gelsolin, bei 40 und 18 kD finden sich Spaltprodukte. Die Gelsolinspaltprodukte entstehen unter anderem durch Caspaseaktivierung bei Induktion von Apoptose. Gelsolinspaltprodukte erscheinen dann im Blut bzw. freigesetzte Caspasen spalten im Blut befindliches Gelsolin. Somit sollten kaum Gelsolinspaltprodukte in intaktem Gewebe von adulten Menschen nachweisbar sein. Aus diesem Grund erfolgte eine Proteinpräparation und nachfolgend ein Western blot vom humanem Neokortex- und

Myokardgewebe. Wie erwartet, ließen sich keine bzw. weniger Gelsolinspaltprodukte detektieren im Vergleich zu den Plasmaproteinpräparationen.

Die vergleichenden Western blots von Plasma- und Gewebeproben von Wildtyp- und gelsolindefizienten Mäusen erfolgte zur Darstellung der Spezifität der verwendeten Antikörper. Erwartungsgemäß zeigte sich eine fehlende Immunodetektion der Proben der gelsolindefizienten Maus. Die Proben der Wildtyp-Maus auf dem gleichen Western blot zeigen eine deutliche Immunodetektion mit dem typischen Bandenmuster, dass sich auch bei den humanen Proben mit dem verwendeten polyklonalen Antikörper darstellen lässt. Die Unterschiede in der Immunodetektion der verwendeten polyklonalen und monoklonalen Antikörper wurden bereits in 4.1 besprochen.

## 5. Zusammenfassung

Gelsolin ist ein Protein, das sowohl zytosolisch als auch im Plasma vorkommt. Hauptaufgabe des zytosolischen Gelsolins ist die Spaltung von Aktinfilamenten und die Kontrolle der Polymerisationsdynamik von Aktin. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit Gelsolin im Plasma als Teil des Extracellular Actin Scavenging System. In dieser Aufgabe ist es für die Elimination von Aktin aus der Blutbahn mitverantwortlich. Wie andere Arbeiten zeigen konnten, sinkt bei ausgedehnten Zelluntergängen und Auftreten von Aktin in der Blutbahn der Gelsolinspiegel im Plasma. Dies konnte unter anderem bei Patienten mit Gram-negativer Sepsis, Myonekrose, akutem Leberversagen und polytraumatisierten Patienten nachgewiesen werden. Die vorliegende Arbeit über den 48-stündigen Verlauf des Gelsolinspiegels im Plasma bei Patienten mit Zustand nach kardiopulmonaler Reanimation bei Myokardinfarkt konnte die oben genannten Ergebnissen nicht bestätigen. Es konnten keine Veränderungen im Gelsolinspiegel des Plasmas von Patienten nach Reanimation festgestellt werden. Als Begründung hierfür ist denkbar, dass durch den massiven Zelluntergang im Rahmen des Herz-Kreislauf-Stillstandes und Myokardinfarktes der Verbrauch des plasmatischen Gelsolins durch den vermehrten Austritt von zytosolischem Gelsolin aus Skelettmuskelgewebe kompensiert wird. Darüber hinaus ist denkbar, dass ein Abfall des Gelsolinspiegels durch die Infusionstherapie vorgetäuscht wird, der methodenbedingt in anderen Arbeiten nicht korrigiert wurde.

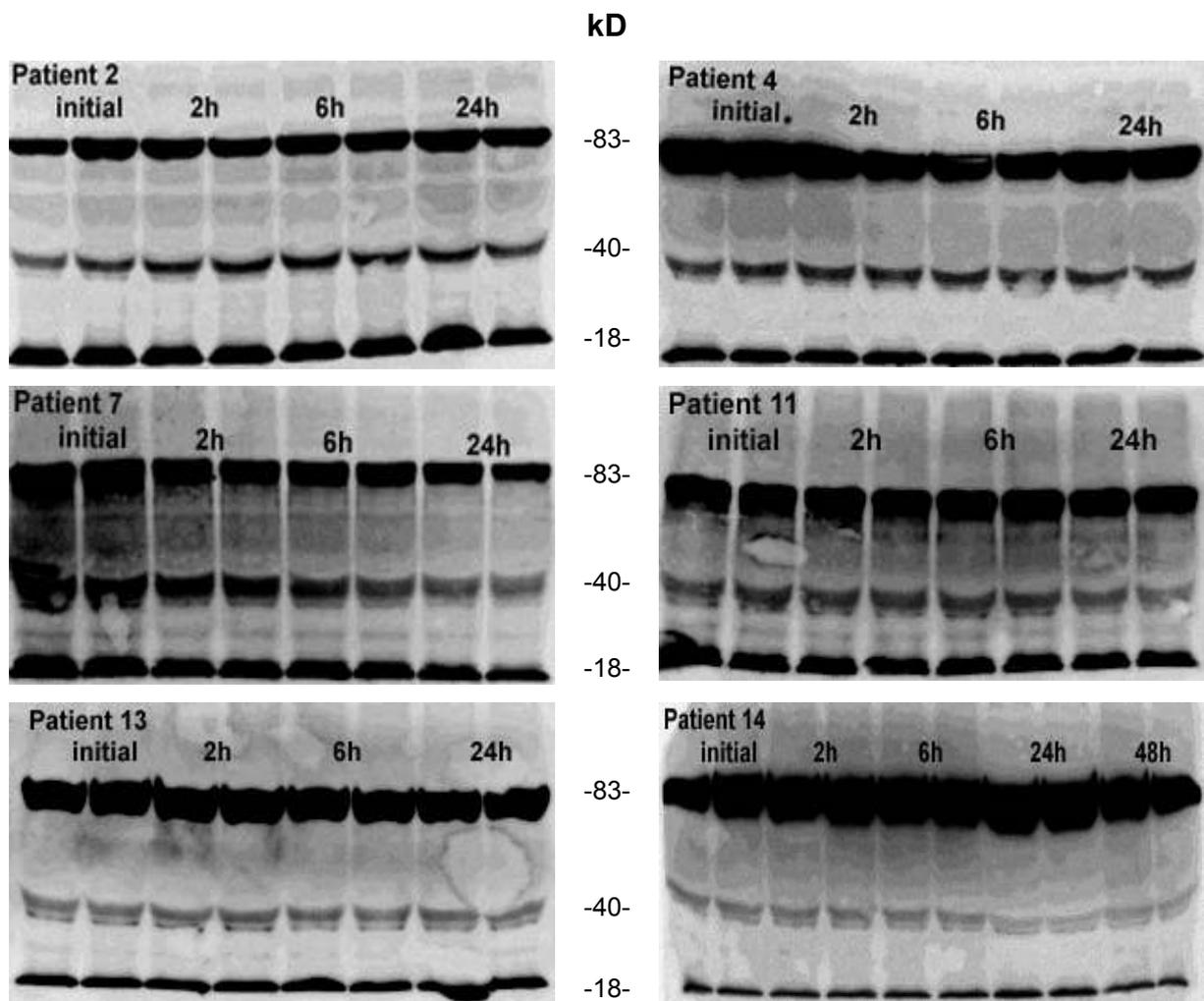
Zweitens befasste sich diese Arbeit mit der Frage der Aussagekraft des Gelsolinspiegels von Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation bei Myokardinfarkt als möglichem prädiktivem Parameter zur Abschätzung der Prognose von Überleben oder Entwicklung von Komplikationen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, dass sich der Plasmagelsolinspiegel zumindest bei den untersuchten Patienten nicht als prognostischer Faktor verwenden lässt.

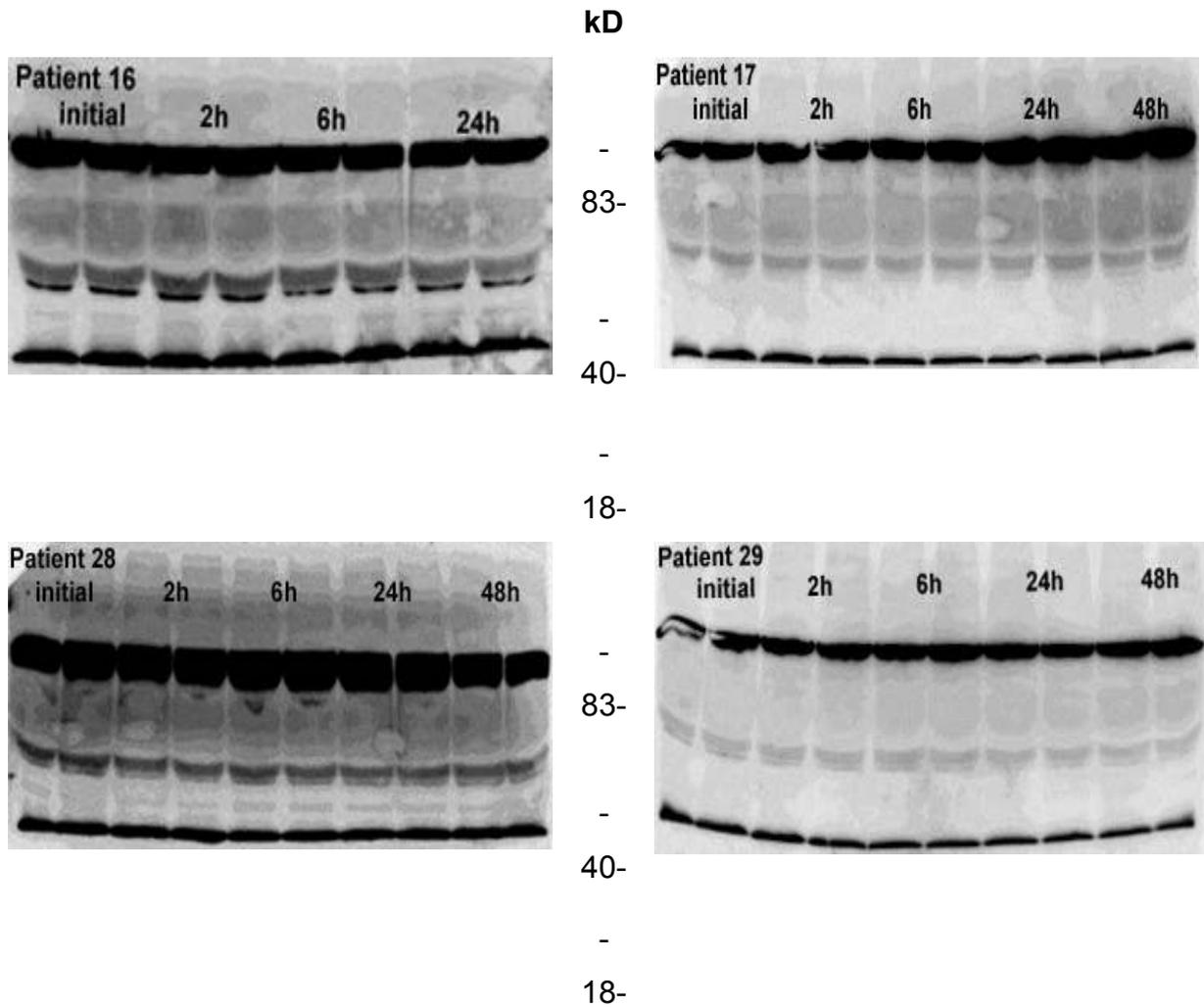
Diese Arbeit beschäftigte sich drittens mit der Frage, ob ein Absinken des Gelsolinspiegels neben der Elimination von Gelsolin-Aktin-Komplexen aus der Blutbahn auch durch vermehrte Spaltung von Gelsolin entsteht. Es konnte aber keine Zunahme der Spaltprodukte des Gelsolins innerhalb von 48 Stunden nach kardiopulmonaler Reanimation nachgewiesen werden.

## 6. Anhang

### 6.1 Gelsolin Western blots von Patientenplasma

Die folgenden Western blots stellen eine Übersicht von allen untersuchten Patienten dar. Es wurden mehr als die dargestellten Patientenplasmen gesammelt und untersucht, aber aus Gründen des Geschlechtes oder fehlenden Einverständnis der Angehörigen fanden diese Patienten keine Berücksichtigung in dieser Arbeit.

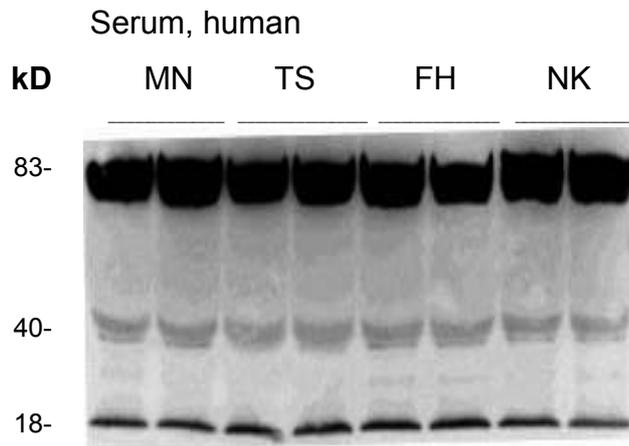




**Abbildung 13:** Übersicht von allen in dieser Arbeit verwendeten Patienten Plasmaproteinpräparationen mit anschließendem Western blot. Jeweils zwei lanes mit der gleichen Proteinpräparation. Als primärer Antikörper wurde der monoklonale anti-gsn-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 5% TBST-Milch verwendet. Die Inkubationszeit betrug 3h bei Raumtemperatur. Als sekundärer Antikörper wurde ein GAM-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST verwendet. Die Inkubationszeit betrug 1,5h bei Raumtemperatur.

## 6.2 Gelsolin Western blots von humanem Kontrollplasma

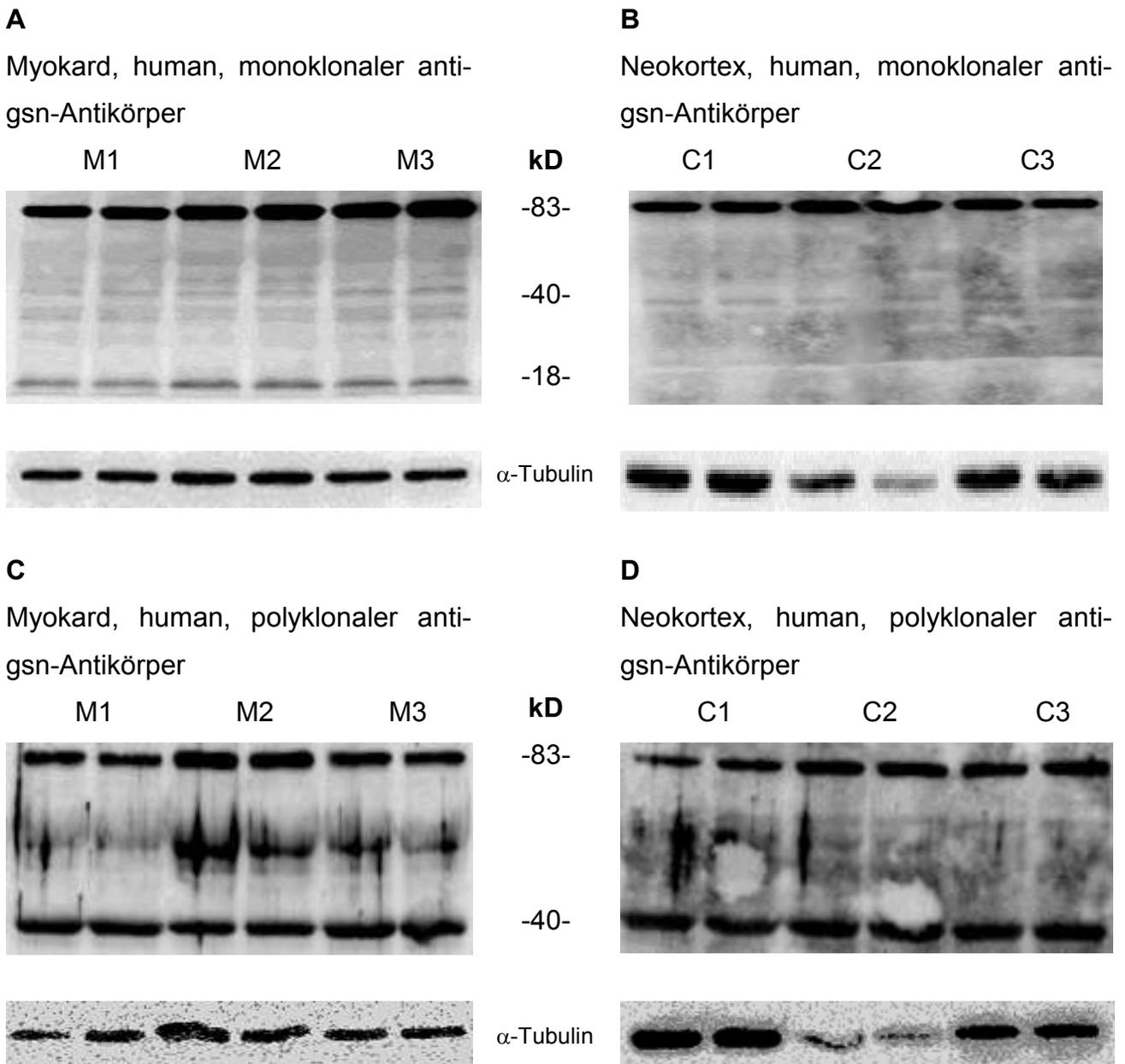
Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Kontrollplasmaproben von gesunden Probanden.



**Abbildung 14:** Gelelektrophorese und Western blot der vier Kontrollplasmen gesunder männlicher Probanden. Jeweils zwei lanes desselben Probanden mit der gleichen Proteinpräparation. Die lanes sind mit den Initialen des Probanden gekennzeichnet. Als primärer Antikörper wurde der monoklonale anti-gsn-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 5% TBST-Milch verwendet. Die Inkubationszeit betrug 3h bei Raumtemperatur. Als sekundärer Antikörper wurde ein GAM-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST verwendet. Die Inkubationszeit betrug 1,5h bei Raumtemperatur.

### **6.3 Gelsolin Western blots von zytosolischen Proteinextraktionen**

Übersicht über die Gelsolin Western blots von Proteinextraktionen aus humanem und murinem Myokard- und Neokortexgewebe. Die Immunodetektion erfolgte bei den humanen Proben unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers von DK oder des monoklonalen Antikörpers von Sigma. Die Immunodetektion der murinen Proben erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper von DK. Die Reblots sind zur Qualitätskontrolle der Proteinbeladung bei der Gelelektrophorese durchgeführt worden.  $\alpha$ -Tubulin ist ein Protein, das intrazellulär, vornehmlich in der zytosolischen Fraktion vorkommt.



**Abbildung 15:** Gelelektrophorese und Western blot von humanem Myokard- und Neokortexgewebe unter Verwendung des monoklonalen anti-gsn-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500 in 5% TBST-Milch (A) und (B). Die Inkubationszeit betrug 3h bei Raumtemperatur. Als sekundärer Antikörper wurde ein GAM-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST verwendet. Die Inkubationszeit betrug 1,5h bei Raumtemperatur. Gelelektrophorese und Western blot von humanem Myokard- und Neokortexgewebe unter Verwendung des polyklonalen anti-gsn-Antikörpers in der Verdünnung 1:1000 3h bei Raumtemperatur (C) und (D). Der sekundäre GAR-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:3000 1,5h bei Raumtemperatur eingesetzt. Unter den dargestellten Western blots wurden die entsprechenden Reblots abgebildet. In allen Darstellungen sind jeweils zwei lanes mit der gleichen Proteinpräparation aufgetragen. In allen Darstellungen wurde zuerst die Ursprungsmembran gestrippt, dadurch wurden alle an die elektrophoretisch aufgetrennten und geblotteten Proteine gebundenen

Antikörper entfernt. Dann wurde die Transfermembran mit dem primären monoklonalen anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in 5% TBST-Milch 1h hybridisiert, als sekundärer Antikörper wurde ein GAM-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBST für 1h mit der Transfermembran inkubiert.

## 7. Literaturverzeichnis

Arora PD, Manolson MF, Downey GP, Sodek J, McCulloch CA, A novel model system for characterization of phagosomal maturation, acidification and intracellular collagen degradation in fibroblasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 35432-35441

Arora PD, Glogauer M, Kapus A, Kwiatkowski DJ, McCulloch CA, Gelsolin mediates collagen phagocytosis through a rac-dependent step. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 588-599

Arpin M, Pringault E, Finidori J, Garcia A, Jeltsch JM, Vandekerckhove J, Louvard D, Sequence of human Villin: a large duplicated domain homologous with other actin-severing proteins and a unique small carboxy-terminal domain related to Villin specificity. *J Cell Biol* 1988; 107: 1759-1766

Barkalow K, Witke W, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH, Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by Gelsolin and capping protein. *J Cell Biol* 1996; 134: 389-399

Barkalow KL, Falet H, Italiano JE Jr, van Vugt A, Carpenter CL, Schreiber AD, Hartwig JH, Role for phosphoinositide 3-kinase in Fc gamma RIIA-induced platelet shape change. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: 797-805

Bearer EL, Prakash JM, Manchester RD, Allen PG, VASP protects actin filaments from Gelsolin: an invitro study with implications for platelet actin reorganizations. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; 47: 351-364

Bray D and White JG, Cortical flow in animal cells. *Science* 1988; 239: 883-888

- Burtnick LD, Koepf EK, Grimes J, Jones EY, Stuart DI, McLaughlin PJ, Robinson RC, The crystal structure of plasma Gelsolin: Implications for actin severing, capping and nucleation. *Cell* 1997; 90: 661-670
- Choe H, Burtnick LD, Mejillano M, Yin HL, Robinson RC, Choe S, The calcium activation of Gelsolin: insights from the 3A structure of the G4-G6/ actin complex. *J Mol Biol* 2002; 324: 691-702
- Cunningham CC, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. *Science* 1991; 251: 1233-1236
- Dahl B, Schiodt FV, Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM, Plasma Gelsolin is reduced in trauma patients. *Shock* 1999; 12: 102-104
- Dahl B, The extracellular actin scavenger system in trauma and major surgery. *Acta Orthopaedica* 2005; 76
- Dörner K, Proteine und Metaboliten. In: Dörner K, Hrsg. *Klinische Chemie und Hämatologie* Stuttgart, New York: Thieme, 2001: 98
- Dörner K, Muskelerkrankungen. In: Dörner K, Hrsg. *Klinische Chemie und Hämatologie* Stuttgart, New York: Thieme, 2003: 470-472
- Ehrlich HP, Allison GM, Page MJ, Kolton WA, Graham M, Increased Gelsolin expression and retarded collagen lattice contraction with smooth muscle cells from Crohn's diseased intestine. *J Cell Physiol* 2000; 182: 303-309
- Erukhimov JA, Tang ZL, Johnson BA, Donahoe MP, Razzack JA, Gibson KF, Lee WM, Wasserloos KJ, Watkins SA, Pitt BR, Actin-containing sera from patients with adult respiratory distress syndrome are toxic to sheep pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 288-294
- Falet H, Barkalow KL, Pivniouk VI, Barnes MJ, Geha RS, Hartwig JH, Roles of SLP-76, phosphoinositide 3-kinase and Gelsolin in the platelet shape changes

initiated by the collagen receptor GPVI/FcR gamma-chain complex. *Blood* 2000; 96: 3786-3792

Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW, Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1381-1385

Harms C, Bösel J, Lautenschlager M, Harms U, Braun JS, Hörtnagl H, Dirnagl U, Kwiatkowski DJ, Fink K, Endres M, Neuronal Gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization. *Mol Cell Neurosci* 2004; 25: 69-82

Irobi E, Burtnick LD, Urosev D, Narayan K, Robinson RC, From the first to the second domain of Gelsolin: a common path on surface of actin? *FEBS Lett* 2003; 552: 86-90

Ito H, Kambe H, Kimura Y, Nakamura H, Hayashi E, Kishimoto T, Kishimoto S, Yamamoto H, Depression of plasma Gelsolin level during acute liver injury. *Gastroenterology* 1992; 102: 1686-1692

Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG, Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 15540-15545

Kamada S, Kusano H, Fujita H, Ohtsu M, Koya RC, Kuzumaki N, Tsujimoto Y, A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8532-8537

Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MHT, Yu H, Shi T, Beldegrun AS, Horvath S, Figlin R, Using tumormarkers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 2005; 173: 1496-1501

Kiselar JG, Janmey PA, Almo SC, Chance MR, Structural analysis of Gelsolin using synchrotron protein footprinting. *Mol Cell Proteomics* 2003a; 2: 1120-1132

- Kiselar JG, Janmey PA, Almo SC, Chance MR, Visualizing the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of Gelsolin by using synchrotron footprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003b; 100: 3942-3947
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT, Caspase-3 generated fragment of Gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; 278: 294-298
- Kumar N and Khurana S, Identification of a functional switch for actin severing by cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* 2004; 279: 24915-24918
- Kwiatkowski DJ, Stossel TP, Orkin SH, Mole JE, Colten HR, Yin HL, Plasma and cytoplasmic Gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature* 1986; 323: 455-458
- Kwiatkowski DJ, Mehl R, Yin HL, Genomic organization and biosynthesis of secreted and cytoplasmic forms of Gelsolin. *J Cell Biol* 1988a; 106: 375-384
- Kwiatkowski DJ, Mehl R, Izumo S, Nadal-Grinard B, Yin HL, Muscle is the major source of plasma Gelsolin. *J Biol Chem* 1988b; 263: 8239-8243
- Kwiatkowski DJ, Janmey PA, Yin HL, Identification of critical functional and regulatory domains in Gelsolin. *J Cell Biol* 1989; 108: 1717-1726
- Lamb JA, Allen PG, Tuan BY, Janmey PA, Modulation of Gelsolin function. Activation at low pH overrides  $\text{Ca}^{2+}$  requirement. *J Biol Chem* 1993; 268: 8999-9004
- Lee WM, Reines D, Watt GH, Cook JA, Wise WC, Halushka PV, Galbraith RM, Alterations in Gc-levels and complexing in septic shock. *Circ Shock* 1989; 28: 249-255

- Lee WM and Galbraith R, The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med* 1992; 326: 1335-1341
- Leifeld L, Fink K, Debska G, Fielenbach M, Schmitz V, Sauerbruch T, Spengler U, Anti-apoptotic function of Gelsolin in Fas antibody-induced liver failure in vivo. *Am J Pathol* 2006; 168: 778-785
- Lind SE, Smith DB, Janmey PA, Stossel TP, Role of plasma Gelsolin and the vitamine D-binding protein in clearing actin from the circulation. *J Clin Invest* 1986; 79: 736-742
- Lind SE, Smith DB, Janmey PA, Stossel TP, Depression of Gelsolin levels and detection of Gelsolin-actin complexes in plasma of patients with acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 429-434
- Lipiena I, Czaplewski C, Janmey PA, Liwo A, Molecular dynamics study of a Gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biopolymers* 2003; 71: 49-70
- Liu YT and Yin HL, Identification of the binding partners for flightless I, a novel protein bridging the leucine-rich repeat and the Gelsolin superfamily. *J Biol Chem* 1998; 273: 7920-7927
- Lueck A, Brown D, Kwiatkowski DJ, The actin-binding proteins adseverin and Gelsolin are both highly expressed but differentially localized in kidney and intestine. *J Cell Sci* 1998; 111: 3633-3643
- Marks PW, Arai M, Bandura JL, Kwiatkowski DJ, Advillin (p92): a new member of the Gelsolin/Villin family of actin regulatory proteins. *J Cell Sci* 1998; 111: 2129-2136
- McGough AM, Staiger CJ, Min JK, Simonetti KD, The Gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett* 2003; 552: 75-81

- McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG, Structure of Gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 1993; 364: 685-692
- Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, DiNubile MJ, Relationship of admission plasma Gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. Decreased SLIM1 expression and increased Gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1673-1683
- Narayan K, Chumnarnsilpa S, Choe H, Irobe E, Urosev D, Lindberg U, Schutt CE, Burtnick LD, Robinson RC, Activation in isolation: exposure of the actin-binding site in the C-terminal half of Gelsolin does not require actin. *FEBS Lett.* 2003 25; 552: 82-85
- Ohtsu M, Sakai N, Fujita H, Kashiwagi M, Gasa S, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Sakiyama Y, Kobayashi K, Kuzumaki N, Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein Gelsolin. *EMBO J* 1997; 16: 4650-4656
- Pestonjamas KN, Pope RK, Wulfschlegel JD, Luna EJ, Supervillin (p205): a novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the Villin/Gelsolin superfamily. *J Cell Biol* 1997; 139: 1255-1269
- Pilz A, Moseley H, Peters J, Abbott C, Comparative mapping of mouse chromosome 2 and human chromosome 9q: the genes for Gelsolin and dopamine beta-hydroxylase map to mouse chromosome 2. *Genomics* 1992; 12: 715-719
- Prendergast GC and Ziff EB, Mbh 1: a novel Gelsolin/Severin-related protein which binds actin in vitro and exhibits nuclear localization in vivo. *EMBO J* 1991; 10: 757-766
- Rothenbach PA, Dahl B, Schwartz JJ, O'Keefe GE, Yamamoto M, Lee WM, Horton JW, Yin HL, Turnage RH, Recombinant plasma Gelsolin infusion attenuates

burn-induced pulmonary microvascular dysfunction. *J Appl Physiol* 2004; 96: 25-31

Scarborough VD, Bradford HR, Ganguly P, Aggregation of platelet by muscle actin: a multivalent interaction model of platelet aggregation by ADP. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 100: 1314-1319

Serrander L, Skarman P, Rasmussen B, Witke W, Lew DP, Krause KH, Stendahl O, Nüße O, Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils. *J Immunol* 2000; 165: 2451-2457

Shieh DB, Godleski J, Herndon JE 2<sup>nd</sup>, Azuma T, Mercer H, Sugarbaker DJ, Kwiatkowski DJ, Cell motility as a prognostic factor in stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 1999; 85: 47-57

Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopoulos N, Yin HL, Hayoz D, Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 2004; 62: 2614-2623

Smith DB, Janmey PA, Lind SE, Circulating actin-gelsolin complexes following oleic acid-induced lung injury. *Am J Pathol* 1988; 130: 261-267

Somiari RI, Sullivan A, Russel S, Somiari S, Hu H, Jordan R, George A, Katenhusen R, Buchowiecka A, Arciero C, Brzeski H, Hooke J, Shriver C, High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics* 2003; 3: 1863–1873

Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM, Decreased plasma Gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock and myonecrosis. *Crit Care Med* 1997; 25: 594-598

Sun H, Lin K, Yin HL, Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding. *J Cell Biol* 1997; 138: 811-820

Sun HQ, Yamamoto M, Meijllano M, Yin HL, Gelsolin a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem* 1999; 274: 33179-33182

Swissprot, 2006: Humanes Gelsolin. URL: <http://www.expasy.org/uniprot/P06396/> (25.07.2006)

Swissprot, 2006: Murines Gelsolin. URL: <http://www.expasy.org/uniprot/P13020/> (25.07.2006)

Thompson CC, Ashcroft FJ, Patel S, Saraga G, Vimalachandran D, Prime W, Campbell F, Dodson A, Jenkins RE, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T, Yin HL, Costello E, 2006: Pancreatic cancer cells overexpress Gelsolin family capping proteins which contribute to their cell motility.

URL:<http://gut.bmjournals.com/cgi/content/abstract/gut.2005.083691v1> (02.11.2006)

Thor AD, Edgerton SM, Liu S, Moore DH 2<sup>nd</sup>, Kwiatkowski DJ, Gelsolin as a negative prognostic factor and effector of motility in erbB-2-positive epidermal growth factor receptor-positive breast cancers. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2415-2424

Vouyiouklis DA and Brophy PJ, A novel Gelsolin isoform expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *J Neurochem* 1997; 69: 995-1005

Witke W, Sharpe AH, Hartwig JH, Azuma T, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Hemostatic, inflammatory and fibroblast responses are blunted in mice lacking Gelsolin. *Cell* 1995; 81: 41-51

Witke W, Li W, Kwiatkowski DJ, Southwick FS, Comparisons of CapG and Gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis and vesicle rocketing. *J Cell Biol* 2001; 154: 775-784

- Yang J, Moravec CS, Sussman MA, DiPaola NR, Fu D, Hawthorn L, Mitchell CA, Young JB, Francis GS, McCarthy PM, Bond M, Decreased SLIM1 expression and increased Gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation* 2000; 102: 3046-3052
- Yin HL and Stossel TP, Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by Gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 1979; 281: 583-586
- Yin HL, Kwiatkowski DJ, Mole JE, Cole FS, Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of Gelsolin. *J Biol Chem* 1984; 259: 5271-5276
- Yin HL and Janmey PA, Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 761-789

## 8. Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. med. Klaus Fink, der mit pädagogischem Geschick und fachlich qualifizierter Anleitung diese Dissertation erst ermöglicht hat. Seine stete Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. med. Henning Krep, der als Initiator die vielen technischen und formalen Hindernisse am Anfang dieser Arbeit aus dem Weg räumen konnte.

Bei Frau Hannelore Burisch möchte ich mich für Ihre Hilfsbereitschaft und die unzähligen wertvollen Ratschläge aus Ihrem großen labortechnischen Erfahrungsschatz bedanken.

Bei Herrn Dr. med. Uli Heister, den beteiligten Notärzten und Rettungsassistenten möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für die ausdauernde Unterstützung und Motivation bedanken.