

Aus der Medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert

**Beeinflussung der sarkoplasmatischen
Ca²⁺-ATPase-Aktivität
im Herz- und Skelettmuskel
durch das Ca²⁺-bindende Protein S100A1**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Juliane Bernotat
aus Kiel

Lübeck 2003

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Bjoern-Andrew Remppis

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Dendorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2004

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.12.2004

Gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Kalzium und seine Rolle als zentraler Regulator muskulärer Kontraktilität	1
1.2	Physiologische Funktion der sarkoplasmatischen Ca ²⁺ -ATPase im quergestreiften Muskel	2
1.3	Pathophysiologische Funktion der sarkoplasmatischen Ca ²⁺ -ATPase im quergestreiften Muskel	5
1.4	Regulation der SERCA-Aktivität im quergestreiften Muskel	7
1.5	S100-Proteine und S100A1	8
1.6	S100A1	11
1.7	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Chromatographische Aufreinigung von nativem Protein S100A1	14
2.2	Synthese und Reinigung von S100A1-Oligopeptiden	17
2.3	Isolation und Primärkultur ventrikulärer Kardiomyozyten	19
2.4	Chemische Permeabilisierung isolierter Kardiomyozyten	21
2.5	Fluoreszenzoptische Messung der SERCA2a-Aktivität an isolierten Kardiomyozyten	22
	2.5.1 Kalibrierung des Fura-2-Fluoreszenzsignals	23
	2.5.2 Aufzeichnung und Analyse der Daten	27
2.6	Präparation sarkoplasmatischer Vesikel aus dem Skelettmuskel der Ratte	28
2.7	Fluoreszenzoptische Messung der SERCA1-Aktivität in EDL-Membranvesikeln	30
2.8	Quantitative und qualitative Proteinanalyse	31
	2.8.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	31
	2.8.2 Polyacrylamidelektrophorese (PAGE)	32
	2.8.3 Westernblot von Polyacrylamidgelen	34
2.9	Statistische Auswertung	36
2.10	Material und Reagenzien	37
3.	Ergebnisse	40
3.1	Aufreinigung von nativem S100A1-Protein aus dem Myokard des Schweins	40
3.2	Charakterisierung der synthetisierten S100A1-Oligopeptide	41
3.3	Enzymatische Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte und des Kaninchens	42
3.4	Chemische Permeabilisierung der Zellmembran ventrikulärer Kardiomyozyten	42
3.5	Aufnahme und Detektion von S100A1-Protein in sarkolemmal permeabilisierte Zellen	43

Inhaltsverzeichnis

3.6	Fluoreszenzoptische Darstellung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme in permeabilisierte Kardiomyozyten	44
3.7	Basalmessungen und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals	45
3.8	Messung der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum des Kaninchens unter S100A1-Stimulation	46
	3.8.1 1µM natives S100A1-Protein	46
	3.8.2 1µM S100A1-Oligopeptide (N, C, H)	47
3.9	Messung der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum der Ratte unter S100A1-Stimulation	48
	3.9.1 1µM natives S100A1 Protein	48
	3.9.2 1µM S100A1 Oligopeptide (N, C, H)	49
3.10	Steigerung der Ca ²⁺ -abhängigen SERCA2a-Aktivität im Kaninchen und in der Ratte unter S100A1- Stimulation	50
	3.10.1 Kaninchen	50
	3.10.2 Ratte	51
3.11	Präparation sarkoplasmatischer Membranvesikel aus dem Skelettmuskel der Ratte	52
3.12	Messung der Kalziumaufnahme in SR-Membranvesikel des Skelettmuskels der Ratte	53
4.	Diskussion	55
4.1	Charakterisierung von S100A1-Protein und -Peptiden	55
4.2	Steigerung der SR-Kalziumaufnahme im Herzmuskel durch das Ca ²⁺ -bindende Protein S100A1	56
4.3	Steigerung der SERCA2a-Aktivität im Herzmuskel durch synthetische S100A1-Oligopeptide	59
4.4	Unveränderte Aktivität der skelettmuskulären SERCA1a durch S100A1-Protein und -Peptide	60
4.5	Differentielle Effekte von S100A1 im Herz- und Skelettmuskel	61
4.6	Pathophysiologische Bedeutung von S100A1 im Herzmuskel	62
4.7	Physiologische Bedeutung von S100A1 im Skelettmuskel	63
5.	Zusammenfassung	65
6.	Literaturverzeichnis	66
7.	Danksagung	79
8.	Curriculum vitae	80
9.	Publikationen	81

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AIEX	Anionenaustauschersäule
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
CK	Kreatinkinase
CrP	Kreatinphosphat
CsCl	Cäsiumchlorid
CSQ	Calsequestrin
DHP	Dihydropyridinrezeptor
DTT	Dithiothreitol
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
EC ₅₀	halbmaximale Geschwindigkeit
EDL	M. extensor digitorum longus
EDTA	Ethylenediamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol(bisaminoethyl)tetraessigsäure
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonsäure
HIC	hydrophobe Interaktionssäule
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IgG	Immunglobulin G
KCL	Kaliumchlorid
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M199	Medium 199
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MW	Molekulargewicht
NCX	Na ⁺ -Ca ⁺ -Austauscher
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphat-Natriumchlorid Puffer
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PVDF	Polyvinylidenelektrolytmembran
RNA	Ribonukleinsäure
RyR	Ryanodin Rezeptor
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl-sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SERCA	Sarco(endo)plasmatische Retikulum Kalzium-ATPase
SL	Sarkolemm
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	TRIS-Essigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 Kalzium und seine Rolle als zentraler Regulator muskulärer Kontraktilität

Intrazelluläres Kalzium reguliert als ubiquitär vorkommendes Signaltransduktionsmolekül in verschiedenen Zelltypen - von Prokaryonten bis zu Eukaryonten - eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Metabolismus und Kommunikation. Einen besonderen Stellenwert nimmt Kalzium darüberhinaus im Muskelgewebe als zentralen Regulator muskulärer Kontraktilität ein (Clapham, 1995; Saudavet et al., 1996). Initiiert werden die auf Zellebene stattfindenden kalziumabhängigen Prozesse prinzipiell durch einen transienten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca]_i$), gefolgt von einem raschen Abfall auf basale Normwerte (Bootmann und Berridge, 1995). Dieses reversible, zyklische Geschehen wird durch die subzelluläre Kompartimentierung des Kalziums in intrazelluläre, membranöse Speicher möglich, die über spezifische Transportproteine Kalziumströme zwischen dem Zytosol und dem Inneren der Speicher erzeugen und sich für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Kalziumhomöostase verantwortlich zeigen (Bers, 2000).

Der Großteil der durch Kalzium regulierten Prozesse wird jedoch nicht direkt über das Molekül selbst, sondern erst durch Bindung an lokalisierte, sogenannte kalziumbindende Proteine vermittelt. Durch diese Bindung wird das unspezifische Kalziumsignal in eine spezifische Wirkung des Moleküls transformiert (Clapham, 1995). Vielen dieser Proteine ist das kalziumbindende EF-Hand-Motiv gemeinsam, das erstmals 1975 beschrieben wurde (Moews und Kretsinger, 1975) und mittlerweile als charakteristisches Merkmal der Superfamilie kalziumbindender EF-Hand Proteine gilt (Donato, 1999). Unterschieden werden in der Gruppe kalziumbindender Proteine auf der einen Seite solche mit überwiegend kalziumpuffernden Eigenschaften, die aufgrund ihrer hohen Kalziumbindungskapazität die freie Kalziumkonzentration regulieren, ohne dabei eine Konformationsänderung erfahren. Am bekanntesten innerhalb dieser Gruppe ist das Parvalbumin und das im sarkoplasmatischen Retikulum befindliche Calsequestrin (Bers, 2000). Dem übrigen, kleineren Teil kalziumbindender EF-Hand Proteine obliegen Eigenschaften als intrazelluläre Kalziumsensoren, die nach Kalziumbindung eine Konformationsänderung durchlaufen und durch Bindung an Zielproteine die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration in zelluläre Aktivitäten übersetzen. Im Gegensatz zur erstgenannten Gruppe verfügen sie über eine hohe

1. Einleitung

Kalziumaffinität, gepaart mit einer niedrigen Kalziumbindungskapazität (Pozzan et al., 1994; Zimmer et al., 1995). Als bekannteste Vertreter dieser Protein-Superfamilie sind Troponin C und Calmodulin zu nennen (Bers, 2000).

Trotz der augenscheinlich zentralen Rolle von Kalzium in der Steuerung des Kontraktionsablaufes im Muskel ist mit Ausnahme von Troponin C bislang nur wenig über die spezifische, intrazelluläre Funktion von Kalziumsensorproteinen bekannt. In diesem Zusammenhang erscheint das kalziumbindende Protein S100A1 von besonderem Interesse, das, ausgestattet mit den physikochemischen Eigenschaften eines EF-Hand Kalziumsensors (Lewit-Bentley und Rety, 2000), in höchster Konzentration im Herzmuskel und langsamen Skelettmuskel exprimiert wird.

1.2 Physiologische Funktion der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase im quergestreiften Muskel

Im Herz- und Skelettmuskel werden die intrazellulären Kalziumbewegungen während der Kontraktion und Relaxation in der adulten Muskelzelle vor allem durch die zyklische Freisetzung und Wiederaufnahme von Kalzium durch das sarkoplasmatische Retikulum (SR) koordiniert, das sich als ein dreidimensionales Netzwerk durch die Zelle spannt. Um eine rasche effiziente Abfolge des Kontraktionszyklus zu gewährleisten, muss die einzelne Muskelzelle in der Lage sein, innerhalb kurzer Zeit hohe zytosolische Kalziumkonzentrationen während der Kontraktion (10^{-6} - 10^{-5} μM) auf ein niedrigeres Niveau im Rahmen der Relaxation (10^{-7} μM) zu senken. Gleichzeitig müssen diese niedrigen intrazytoplasmatischen Kalziumkonzentrationen gegenüber deutlich höheren Kalziumkonzentrationen im Extrazellulärraum und im sarkoplasmatischen Retikulum aufrechterhalten werden (Kargacin und Kargacin, 1994; Shull, 2000).

Innerhalb dieses zyklischen Kalziumumsatzes von Herz- und Skelettmuskel wird der Hauptbeitrag zur Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration von der sarko(endo)plasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA) getragen, die durch ATP-Verbrauch die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme katalysiert. Auf diese Weise kontrolliert sie nicht nur die Konzentration bzw. den Gehalt von Kalzium im sarkoplasmatischen Retikulum (SR), sondern ebenso die zytosolische Kalziumhomöostase (Abb.1.1) (Yong et al., 1999; Freestone et al., 2000).

1. Einleitung

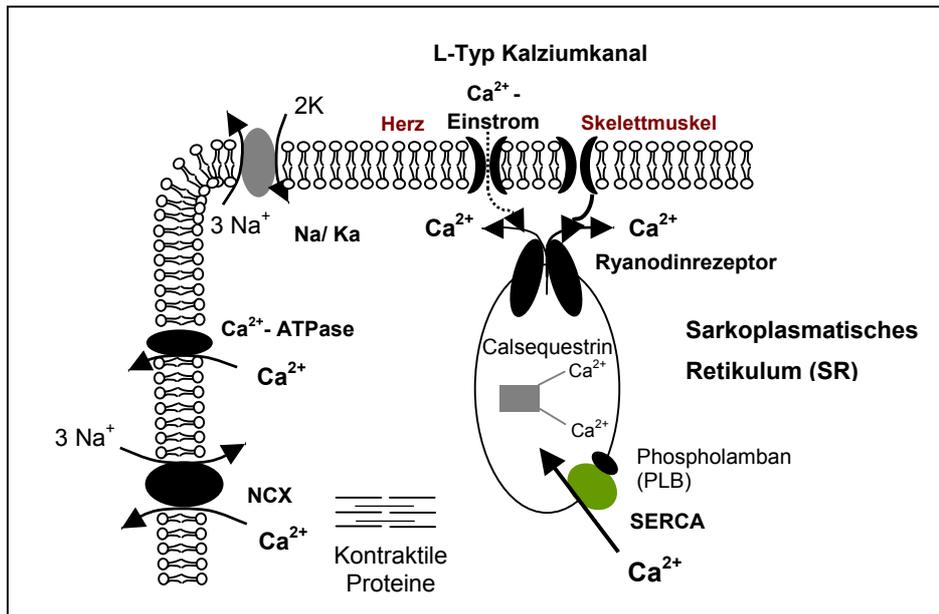


Abb.1.1

Abb.1.1: Schematische Darstellung der Regulation der intrazellulären Kalziumbewegungen in der Muskelzelle bzw. -faser:

Nach Depolarisation der Zellmembran der Muskelzelle oder -faser werden im transversaltubulären System des Sarkolems die L-Typ-Kalziumkanäle, auch bekannt als Dihydropyridinrezeptoren (DHP), aktiviert. Durch einen transsarkolemmlen Kalziumeinstrom (Herzmuskel, HM) bzw. eine mechanisch induzierte Konformationsänderung des Kalziumfreisetzungskanals (Skelettmuskel, SM) des sarkoplasmatischen Retikulums, dem Ryanodin Rezeptor (RyR), kommt es zur raschen Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Das freigesetzte Kalzium bindet an Troponin C und initiiert den Querbrückezyklus der kontraktiven Filamente.

Die Reduktion des zytosolischen Kalziums während der Relaxation erfolgt über vier verschiedene Transportsysteme: 1. die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA), 2. den sarkolemmlen Na^{2+} - Ca^{2+} -Austauscher (NCX), 3. die sarkolemmlen Ca^{2+} -ATPase und 4. einen mitochondrialen Ca^{2+} Transporter. Unter physiologischen Bedingungen übernimmt die SERCA, gefolgt vom NCX, quantitativ den Hauptanteil zur Senkung der intrazytoplasmatischen Kalziumkonzentration.

Aktiviert durch einen transsarkolemmlen Kalziumstrom (Herzmuskel) bzw. eine elektrisch induzierte Konformationsänderung (Skelettmuskel) führt eine Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den Ryanodinrezeptor (RyR) zur Muskelkontraktion, während die Kalziumwiederaufnahme zur Muskelrelaxation führt (Sommer et al., 1992). Die Relaxation einer Muskelzelle bzw. Muskelfaser und die Regeneration des Kalziums ist im entscheidendem Maße abhängig vom Rücktransport der Kalziumionen durch die sarkoplasmatische Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase (SERCA) aus dem Zytosol in das Lumen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Da die Aktivität der SERCA direkt die

1. Einleitung

Relaxationsgeschwindigkeit bestimmt (Bluhm et al., 2000) und den limitierenden Schritt der Kalziumaufnahme und -speicherung darstellt, gilt die sarko(endo)plasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) als zentrale Determinante muskulärer Kontraktilität (Carafoli, 1987; Bers und Bridge, 1989; Sommer et al., 1992; Lompre et al., 1994; Minamisawa et al., 1999).

Es handelt sich bei der sarko(endo)plasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA) um ein ~110 kDa transmembranäres Protein (MacLennan, 1970), das den größten Anteil des Proteingehaltes der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums ausmacht (Minamisawa et al., 1999). Sie zählt zur Superfamilie der hoch konservierten P-Typ-Ionen-transport-ATPasen, die während eines vektorialen Ionen-transportes einen intermediären Phosphorylierungszustand (E-P) durchlaufen (De Meis und Vianna, 1979).

Durch molekulare Analysen konnten drei verschiedene Gene für SERCA identifiziert werden mit insgesamt fünf verschiedenen Isoformen (SERCA1a und 1b, SERCA2a und 2b, SERCA3), die entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert werden (Yong et al., 1999). Die Isoformen SERCA1a und SERCA1b sind im schnellen Skelettmuskel zu finden, wobei SERCA1b in der neonatalen Entwicklung vorherrscht und SERCA1a vornehmlich erst im adulten Stadium exprimiert wird (Brandl et al., 1987). Im Herzmuskel sowie im langsamen Skelettmuskel überwiegt SERCA2a (Zarain-Herzberg et al., 1990; Wu et al., 1995), die während der Neonatalzeit ebenfalls an der Kalziumsequestration im schnell kontrahierenden Skelettmuskel beteiligt ist, aber in der weiteren Entwicklung durch die Isoform SERCA1a ersetzt wird. SERCA2b wird im nichtmuskulären Gewebe und im adulten glatten Muskel exprimiert (Lytton et al., 1989), während SERCA3 in Endothel- und Epithelzellen identifiziert werden kann. Dabei wird der höchste mRNA-Gehalt im Intestinum, in der Milz, der Lunge, dem Uterus und Gehirn gemessen (Burk et al., 1989, Hussain und Inesi, 1999).

Die funktionelle Bedeutung der Diversität der SERCA-Isoformen ist nicht vollständig geklärt, doch gemessen an der selektiven - sowohl entwicklungsabhängigen als auch gewebespezifischen - Expression, scheint es wahrscheinlich zu sein, dass insbesondere die Isoformen SERCA1a und SERCA2a über differenzierte Kalziumtransporteigenschaften verfügen und in unterschiedlichem Maße zur kontraktilen Funktion der Muskelzelle beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Kalziumtransportkapazität im Herzmuskel signifikant geringer ist als im schnell kontrahierenden Skelettmuskel. Dies liegt zum Einen an einer höheren Pumpendichte im SR, aber auch an der bis

1. Einleitung

zu dreifach geringeren Ca^{2+} - Affinität der SERCA2a im Herzmuskel gegenüber der SERCA1a im Skelettmuskel (Shigekawa et al., 1976, Cantilina et al., 1993, Wolosker et al., 1997). Dies scheint maßgeblich mit der spezifischen Interaktion zwischen SERCA2a und Phospholamban (PLB) zusammenzuhängen, da letzteres über reversible Phosphorylierung die Affinität der Pumpe zu Kalzium modulieren kann (Autry und Jones, 1997). Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass eine exogene Expression der phospholambandefizienten SERCA1a im Herzmuskelgewebe dessen Kontraktilität erhöht und die Kalziumkinetik steigert (Lalli et al., 2001).

1.3 Pathophysiologische Funktion der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase im quergestreiften Muskel

Defekte der SERCA-Expression, die im Rahmen der menschlichen Herzinsuffizienz und skelettmuskulärer Erkrankungen auftreten, und deren Auswirkungen auf die Kalziumhomöostase verdeutlichen die spezifische Funktion der SERCA für die Kontraktilität von Muskelzellen (Submillia et al., 1999; Periasamy und Huke, 2001). In den verschiedenen Stadien der menschlichen Herzinsuffizienz korreliert die diastolische Dysfunktion mit signifikanten Veränderungen des SERCA2a mRNA - und Proteingehaltes (Baker et al., 1998). Während es im Stadium der kompensierten Herzinsuffizienz zu einer Steigerung der SERCA-Expression im Vergleich zum gesunden Normalkollektiv kommt, ist im Stadium der dekompenzierten Herzinsuffizienz eine signifikante Verminderung der SERCA-Expression zu beobachten. Dies generiert in einer diastolischen Relaxationsstörung mit enddiastolisch hohen Kalziumkonzentrationen und einer Beeinträchtigung nicht nur der Lusitropie, sondern auch der Inotropie (Arai et al., 1994; Hasenfuss et al., 1994; Meyer et al., 1995; Schwinger et al., 1995; Davia et al., 1999).

Diverse Studien bestätigten den Zusammenhang zwischen charakteristischen Veränderungen der diastolischen Dysfunktion im Rahmen der menschlichen Herzinsuffizienz und der dokumentierten Verminderung der SERCA2a-Expression (Meyer et al., 1995). Ferner fanden sich skelettmuskuläre Relaxationsstörungen im Rahmen der *Brody*-Erkrankung bei reduzierter SERCA1-Aktivität (Davia et al., 1999; Dillmann, 1999; MacLennan, 2000; Shull, 2000). Diese Befunde führten zu einem wachsenden Interesse, die differentielle Regulation der SERCA-Isoformen näher zu untersuchen. Genadditionsstudien konnten anhand von kultivierten Kardiomyozyten und am Modell des

1. Einleitung

Transgens nachweisen, dass eine SERCA-Überexpression mit einer erhöhten Kontraktilität und gesteigerten Kalziumtransienten bei gleichzeitig gesteigerter Relaxation vergesellschaftet ist. Inesi et al. (1998) und Submilla et al. (1999) konnten darüberhinaus eine auf gleichem Expressionsniveau stattfindende simultane SERCA2a- und SERCA1-Überexpression in neonatalen Kardiomyozyten generieren. Es zeigte sich hierbei eine gegenüber SERCA2a zweifach gesteigerte SERCA1-Aktivität, die auf intrinsische Differenzen der Kalziumumsatzrate zurückzuführen ist. Im Tiermodell der Herzinsuffizienz gelang es Schmidt et al. (2000), durch eine adenoviral vermittelte SERCA2a-Überexpression die diastolische wie auch systolische Dysfunktion wieder zu normalisieren. Im SERCA-Transgen stellten He et al. (1997) sowie Baker et al. (1998) eine gesteigerte Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme sowie eine Zunahme der Kontraktilität fest. Ergänzende Informationen hinsichtlich Funktion und potentieller Beeinflussung der sarco(endo)plasmatischen Ca^{2+} -ATPase liefert das tierexperimentelle *Knock-out* Modell, in dem die SERCA spezifisch in ihrer Expression ausgeschaltet wird. Eine unter Periasamy et al. (1999) durchgeführte Studie zeigte, dass eine vollständige Absenz der SERCA2a einen letalen Phänotyp generiert, da keine homozygote Linie auftrat.

Auf der Basis dieser Daten scheint die SERCA die muskuläre Kontraktilität indirekt über die Menge des aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzten Kalziums zu regulieren, während die Relaxation über die Geschwindigkeit bestimmt wird, mit der das Kalzium aus dem Zytosol entfernt und in das Lumen des sarkoplasmatischen Retikulum aufgenommen wird (Shull, 2000). Da sich die SERCA als wesentliche Komponente zur Aufrechterhaltung des muskulären Kontraktionsablaufes gezeigt hat, scheint ein Eingriff in dieses streng regulierte System im Rahmen der Muskelinsuffizienz von zentraler Bedeutung zu sein. Der bisher am besten untersuchte Regulator der SERCA-Aktivität ist Phospholamban (PLB). Weitere mit dem sarkoplasmatischen Retikulum assoziierte Proteine wie z.B. S100A1 sind in diesem Zusammenhang bislang nicht näher untersucht.

1.4 Regulation der SERCA-Aktivität im quergestreiften Muskel

Im Herz- und im langsam kontrahierenden Skelettmuskel wird die Aktivität der SERCA2a durch Phospholamban (PLB) reguliert, einem kleinen Phosphoprotein, das sich in der Membran des

1. Einleitung

sarkoplasmatischen Retikulums befindet (Davies et al., 1999). Im dephosphorylierten Zustand inhibiert das 30 kDa kleine Homopentamer PLB bei submikromolaren Kalziumkonzentrationen die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität durch Minderung der Kalziumaffinität und Erhöhung der EC_{50} des Enzyms für Kalzium. Damit verursacht es eine verminderte Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (Voss et al., 1994). Infolge β -adrenerger Stimulation kommt es zu einer Disinhibition von PLB durch Phosphorylierung an den Aminosäuren Serin-16 über die cAMP-abhängige Proteinkinase A und Threonin-17 über die Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Kinase. Diese Disinhibition von PLB findet ebenfalls bei einem Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration in den mikromolaren Bereich statt. Infolge der Phosphorylierung erhöht sich die Kalziumaffinität der SERCA2a und führt zu einer gesteigerten Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum bei verkürzter Relaxationsgeschwindigkeit. Auf diese Weise moduliert Phospholamban den aktiven Transport von Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum über die SERCA2a (Abb. 1.2) (Xu et al., 1993; Frank und Kranias, 2000).

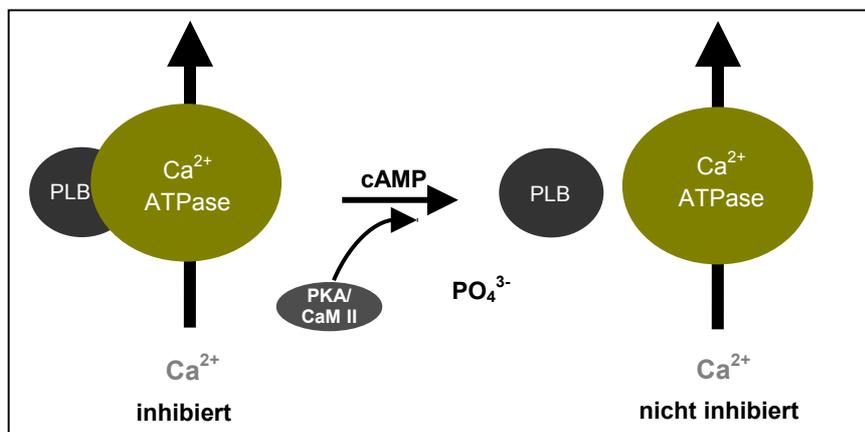


Abb.1.2

Abb.1.2: Schematische Darstellung zur Regulation der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität des sarkoplasmatischen Retikulums durch Phospholamban (über PKA- und Calmodulin-Kinase-II-abhängige Phosphorylierung).

Im Herzmuskel und im langsam kontrahierenden Skelettmuskel gilt der Phosphorylierungszustand des Phospholambans somit als zentrale Determinante der Kalziumsequestration und myokardialen Relaxation (Koss et al., 1997; Edes und Kranias 1998; Colyer und Wang, 1991). Im Gegensatz

1. Einleitung

dazu wird im schnell kontrahierenden Skelettmuskel kein Phospholamban exprimiert. Dies bedeutet, dass die Pumpkinetik der SERCA-Isoform 1 ausschliesslich vom aktuellen intrazellulären Kalziumangebot abhängig ist (MacLennan, 2000).

Da die beiden Isoformen SERCA1 und SERCA2a annähernd die gleiche Abhängigkeit von der $[Ca^{2+}]_i$ zeigen ($SERCA2a \geq SERCA1$) und Experimente belegen, dass die Umsatzrate der SERCA1 ungefähr doppelt so hoch ist wie die der SERCA2a (Submilla et al., 1999), liegt der Schluss nahe, dass es sich um einen PLB-abhängigen Effekt handelt. Verschiedene Studien haben die modulierende Funktion von PLB für die Regulation der basalen Kontraktilität im Myokard an Phospholamban *knock-out*-Mäusen herausgearbeitet. Ein PLB-Verlust in isolierten Papillarmuskeln äußert sich in einer signifikant gesteigerten Kontraktilität, hervorgerufen durch eine höhere Kraftentwicklung bei verkürzter Zuckungszeit (Bluhm et al., 2000).

1.5 S100-Proteine und S100A1

S100A1 ist ein saures kalziumbindendes Protein aus der Superfamilie kalziumbindender EF-Hand-Proteine, das eine gewebespezifische Expression in der quergestreiften Muskulatur aufweist, wobei höchste Proteinspiegel in Kardiomyozyten, gefolgt vom Skelettmuskel, gefunden werden. Die erstmalig von Moore (1965) aufgrund ihrer Löslichkeit in 100%iger Ammoniumsulfatlösung als S100 beschriebenen Proteine umfassen eine Gruppe von insgesamt neunzehn Mitgliedern und bilden damit die umfangreichste Subgruppe innerhalb der EF-Hand Proteinfamilie (Zimmer et al, 1995; Schäfer und Heizmann, 1996; Heizmann und Cox, 1998; Donato et al., 1999).

Als charakteristisch für das EF-Hand-Motiv anzusehen ist die Sekundärstruktur in Form einer repetitiven Helix-Loop-Helix Abfolge mit kalziumkomplexbildenden Eigenschaften. Diese als Leitstruktur beschriebene Sekundärstruktur wurde erstmals im dritten kalziumbindenden Motiv des Proteins Parvalbumin beschrieben und ist nunmehr namensgebend für die Proteinsuperfamilie (Abb. 1.3) (Clapham, 1995). Der Genort für S100-Proteine ist mit Ausnahme von S100B (Chr. 22) clusterförmig auf dem Chromosom 21 lokalisiert, und die Nomenklatur der Mitglieder ergibt sich aus der Abfolge ihres kodierenden DNA-Stranges in Leserichtung (Schäfer und Heizmann, 1996).

1. Einleitung

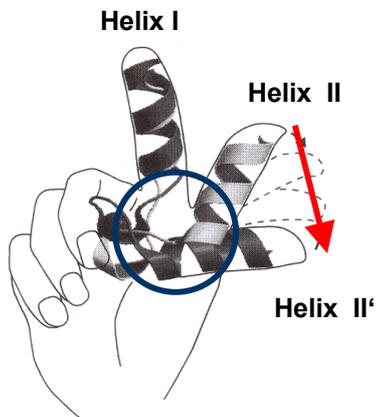


Abb.1.3

Abb.1.3:

Veranschaulichung der Sekundärstruktur der kalziumbindenden EF-Hand (α -Helix-Loop- α -Helix) nach Kretsinger (1975) in einem dreidimensionalen Schema (Lewit-Bentley und Rety, 2000). Beide α -Helices des kalziumbindenden Motivs können durch den gestreckten Zeigefinger (Helix I) und Daumen (Helix II) der rechten Hand dargestellt werden. Sie sind durch einen linearen Abschnitt (Loop, blauer Kreis) verbunden, der Kalzium in einer Bindungsnische koordinativ bindet. Die Bindung von Kalzium induziert so durch die Verlagerung der Helix II (Daumen, roter Pfeil) eine Konformationsänderung der EF-Hand.

S100-Proteine sind niedermolekulare Proteine mit einer Größe von 8-13k Da, die innerhalb der Zelle Dimere bilden, nachdem sie primär als Monomer exprimiert werden (Donato 1999). Dies konnte über molekular-strukturelle Untersuchungen im NMR gezeigt werden (Drohat et al., 1998). Das Monomer verfügt charakteristischerweise über zwei kalziumbindende Domänen, die durch einen kalziumbindenden Loop miteinander verbunden und jeweils von hydrophoben Enden flankiert sind (Abb. 1.4). Infolge von Kalziumbindung kommt es zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins, die für die Interaktion mit Zielproteinen notwendig ist. Dabei gruppieren sich die hydrophoben Enden – N- (N) und C- (C) Terminal – des jeweiligen Monomers zusammen mit ihrer verbindenden Untereinheit, der sogenannten Scharnier-Region - auch als *Hinge Region* (H) bezeichnet – an der Oberfläche des Gesamtmoleküls. Es wird angenommen, dass die Hinge Region (H) für die spezifische Interaktion eines S100-Proteins mit seinem Zielprotein verantwortlich ist und die Interaktion durch die hydrophoben N- und C-terminalen Pole stabilisiert wird (Abb 1.5). Die N-terminale EF-Hand des Moleküls ist spezifisch für S100-Proteine, wohingegen das C-terminale-Ende allen Mitgliedern der EF-Hand-Proteinfamilie gemein ist (Heizmann und Cox, 1998).

1. Einleitung

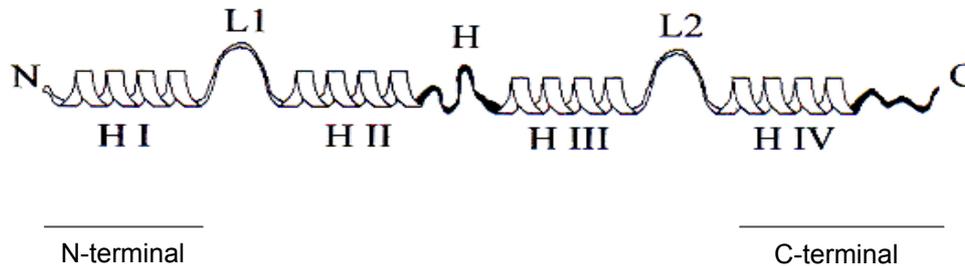


Abb.1.4

Abb.1.4 verdeutlicht die typische Sekundärstruktur einer monomeren S100 Untereinheit (Donato, 1991). Jedes Monomer besteht aus zwei kalziumbindenden EF-Hand-Motiven (Helix-Loop-Helix; H I-L1-H II, H III-L2-H IV), die durch eine Scharnierregion (Hinge; H) getrennt werden. Deutlich sind die Loops (L1, L2) beider EF-Hände zu erkennen, die Kalzium koordinativ binden. Die Enden des Monomers (N- und C-terminal) weisen im Gegensatz zur Scharnierregion eine ausgeprägte Hydrophobizität auf und dienen unter anderem der Stabilisation des Dimers.

S100-Proteine verfügen in ihrer Rolle als kalziumbindende Proteine über eine hohe Kalziumaffinität (Baudier und Gerard, 1986) und registrieren als intrazelluläre Kalziumrezeptoren Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration (Zimmer et al, 1995). Im Zusammenhang mit ihrer gewebespezifischen Expression sind sie aufgrund dieser Eigenschaft in der Lage, ein ubiquitäres Signal – Kalzium als unspezifischer *second messenger* (engl.) - in eine gewebetypische Antwort zu transformieren (Berchthold et al, 2000).

Zum Einen werden S100-Proteinen allgemeine biologische Aktivitäten wie intrazelluläre Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Zellkommunikation und Organisation des Zytoskeletts zugeschrieben. Zum Anderen konnte im Zusammenhang mit verschiedenen spezifischen, extrakardialen Erkrankungen eine Dysregulation in der Expression verschiedener S100-Proteine nachgewiesen werden: Eine veränderte Expression des neuronal spezifischen S100B scheint an der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise der Alzheimer Erkrankung beteiligt zu sein, während S100A4 und A6 eine zentrale Funktion in der Metastasierungskaskade des Mammakarzinoms einnehmen und S100A8 und A9 eine Rolle innerhalb inflammatorischer Prozesse zugeschrieben wird (Heizmann und Cox, 1998).

1. Einleitung

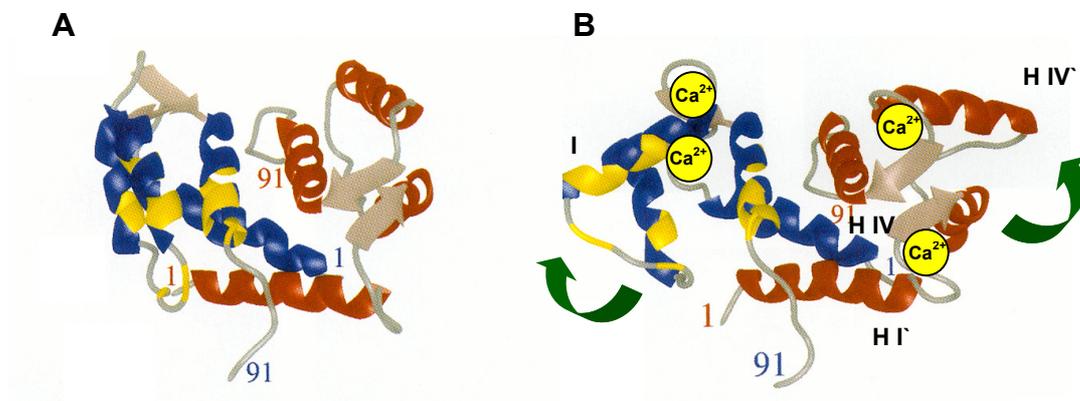


Abb.1.5

Abb.1.5 veranschaulicht die dreidimensionale Struktur von S100A1. Zwei homologe Untereinheiten (blau und orange) bilden je ein antiparalleles, kompaktes Homodimer (25×25×49 Angström). Jede Untereinheit verfügt über zwei EF-Hände, die durch eine Scharnierregion getrennt sind. Die kalziumbindenden Loops der EF-Hände sind durch dunkelgrüne Pfeile markiert. Das Dimer wird durch die antiparallele Überkreuzung der Helix I' und IV' beider Dimere stabilisiert. B verdeutlicht die Konformationsänderung des Dimers nach Kalziumbindung (gelbe Kugeln). Deutlich ist die Auswärtsbewegung der Helix IV' und I' zu erkennen (grüne Pfeile), die die hydrophoben Epitope des Moleküls freilegen (Wang, 2001).

1.6 S100A1

S100A1 ist ein Kalziumsensorprotein, welches sowohl kalziumabhängig als auch kalziumunabhängig mit seinen Zielproteinen interagiert (Landar et al., 1998). Seine Form als symmetrisches, antiparalleles Homodimer (25 × 25 × 49 Angström) bildet es aus zwei monomeren α -Untereinheiten. Stabilisiert wird das Dimer über eine kovalente Disulfidbrücke und intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen (Abb. 1.5) (Heizmann und Cox, 1998).

Untersuchungen im frühen embryonalen Entwicklungsstadium des Herzens zeigen eine enge zeitliche und örtliche Korrelation zwischen der Expression von S100A1 und der Entstehung der Herzhöhlen und ihrer Trennung in Vorhöfe und Ventrikel (Kiewitz et al., 2000). Dieses differentielle Expressionsverhalten ändert sich während der Entwicklung nicht, was Studien zur Transkription und Translation des S100A1-Genes zeigen. Im adulten Herzen lassen sich im linken Ventrikel die höchsten mRNA- und Protein-Konzentrationen nachweisen (Remppis et al., 1996). Einen weiteren Aspekt zur differentiellen Expression und zur funktionellen Bedeutung im Rahmen der

1. Einleitung

Muskelkontraktilität liefert das S100A1-Expressionsmuster im Verlauf der Entwicklung der Herzinsuffizienz. Im Stadium der kompensierten Herzinsuffizienz, die sich makroskopisch als Hypertrophie präsentiert, lässt sich eine gesteigerte S100A1-Expression nachweisen, wohingegen im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz eine signifikante Reduktion des Proteingehaltes nachzuweisen ist (Remppis et al., 1996). Über die intrazelluläre Verteilung von S100A1 ist bis heute bekannt, dass sich im Skelettmuskel und Herzmuskel eine Kolo-kalisation mit dem sarkoplasmatischen Retikulum findet; im Herzen zusätzlich mit dem Sarkolemm und dem kontraktilem Apparat (Haimoto und Kato, 1988; Berchthold et al., 2000; Maco et al., 2000; Arcuri et al., 2002).

Um die funktionelle Bedeutung der differentiellen Expression des Proteins S100A1 zu verstehen, wurden im Herzmuskelgewebe im Wesentlichen funktionelle Studien durchgeführt, die eine Überexpression des Proteins zum Ziel hatten.

Als Ergebnis zeigte sich, dass sowohl nach adenoviralem Gentransfer in Kaninchenmyokard *in vivo* als auch *in vitro* in isolierte Kaninchen- und Rattenkardiomyozyten eine Steigerung der Kontraktilität und der Kalziumtransienten zu beobachten war (Pleger, 1999; Most et al., 2001; Remppis et al., 2002). Diese Beobachtungen konnten Most et al. (2003a) im transgenen Tiermodell *in vivo* weiter verifizieren, da die transgenen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant gesteigerte Kontraktilität aufwiesen, während Du et al. (2002) im *knock-out*-Modell *in vivo* eine entsprechend verminderte Kontraktilität erreichten.

Über die Funktion des Proteins S100A1 im Skelettmuskel ist bis heute bekannt, dass es im rekonstitutiven *Lipid-Bilayer* die Aktivität des Ryanodin-Rezeptors mit einer sekundär vermehrten Kalziumfreisetzung steigert (Treves et al., 1997). Fano et al. (1989) zeigten einen vergleichbaren Effekt an skelettmuskulären Vesikeln der Ratte, an denen eine Stimulation der Ca^{2+} -induzierten Kalziumfreisetzung unter dem S100A1-Heterodimer zu beobachten war. Most et al. (2002) fanden ferner heraus, dass das Protein sowohl in seiner nativen Form als auch in Form eines Peptidmodells, bestehend aus der zentralen Linkerregion und dem N- sowie C-terminalen Ende, in Saponin-permeabilisierten Muskelfasern zu einer gesteigerten Kalziumfreisetzung über den Ryanodin-Rezeptor führt. Adhikari und Wang (2001) konnten demonstrieren, dass das Protein

1. Einleitung

S100A1 die Kalziumsensitivität und -kooperativität des kontraktiven Apparates im Skelettmuskel beeinflusst.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die intrazelluläre Kalziumhomöostase wird durch die Expression und Funktion zahlreicher Proteine gesteuert. Einen besonderen Stellenwert haben dabei zum Einen sog. kalziumbindende Proteine wie S100A1, die als intrazelluläre Kalziumsensoren Veränderungen des zytosolischen Kalziumgehaltes registrieren und Ca^{2+} -abhängig durch Interaktion mit spezifischen Zielproteinen grundlegende Zellfunktionen modellieren, und zum Anderen sarkoplasmatische Proteine wie die sarkoendoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die für die zyklische Aufnahme und Freisetzung der Kalziumionen in das sarkoplasmatische Retikulum (SR), dem intrazellulären Kalziumspeicher, verantwortlich sind (Periasamy und Huke, 2001).

Da S100A1 einerseits mit dem sarkoplasmatischen Retikulum des quergestreiften Muskels kolokalisiert (Haimoto und Kato, 1988) und andererseits S100A1 mit SERCA und Phospholamban eine direkte Proteininteraktion eingeht (Kiewitz et al., 2003), wurde von unserer Arbeitsgruppe die Hypothese generiert, dass S100A1 seine kontraktionssteigernden Effekte über eine Beeinflussung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Transienten vermittelt. Daher wurde die vorliegende Arbeit mit dem Ziel durchgeführt, erstmals den Effekt von S100A1 auf die SERCA-Aktivität zu untersuchen und so möglicherweise weitere Aufschlüsse über die molekularen Funktionen dieses hochkonservierten Ca^{2+} -bindenden Proteins im Rahmen der Muskelphysiologie zu gewinnen.

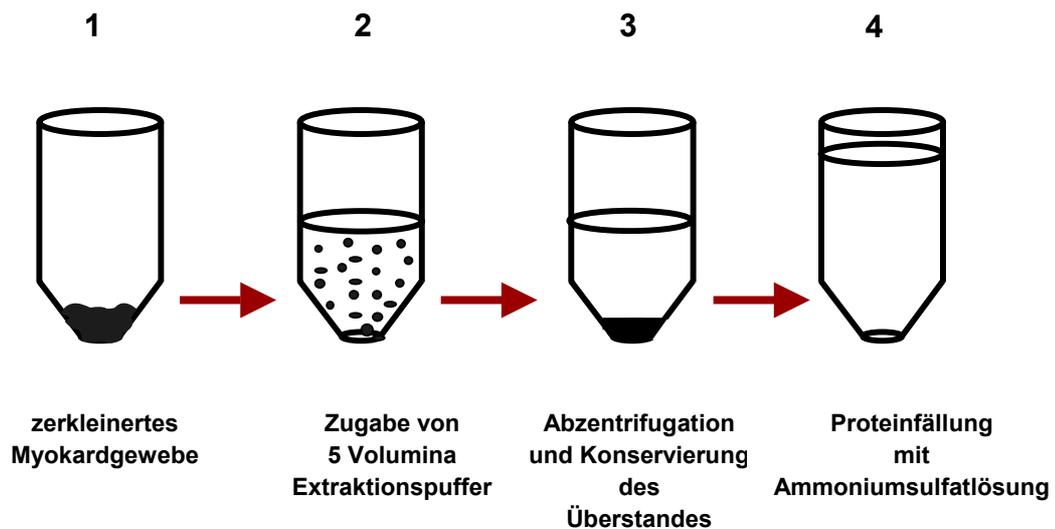
2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Chromatographische Aufreinigung von nativem Protein S100A1

Natives S100A1-Protein wurde aus ventrikulärem Myokard des Schweins aufgereinigt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Proteins widersteht es einer Fällung mit Ammoniumsulfat und kann so von der hydrophilen Fraktion der myokardialen Proteine getrennt werden. Durch eine EGTA-abhängige Elution der kalziuminduzierten, spezifischen Interaktionen des Proteins mit einer hydrophoben Säulenmatrix ist eine weitere Reinigung möglich. In einem letzten Schritt erfolgt die Gewinnung einer hochreinen Proteinfraktion durch Verwendung eines Anionenaustauschers, der EGTA und höhermolekulare Verunreinigungen entfernt.

Schema: *Extraktion von nativem S100A1 Protein*



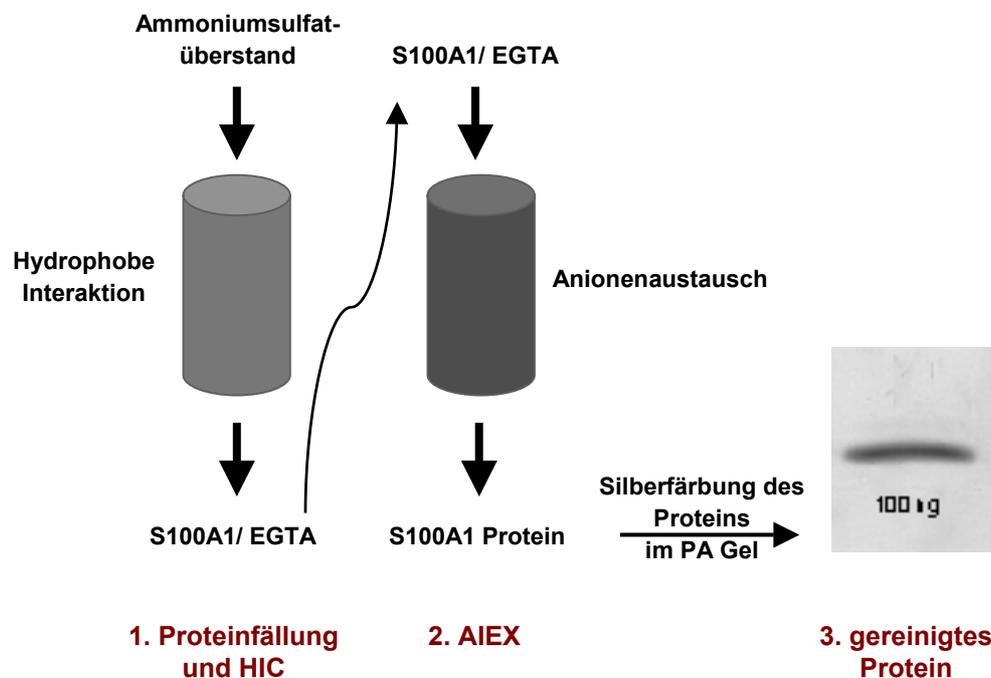
Extraktion aus Schweinemyokard

Schweineherzen zur Aufreinigung von nativem S100A1 Protein wurden freundlicherweise vom Fleischversorgungszentrum Lübeck zur Verfügung gestellt. Direkt nach Entnahme der Herzen wurden die Koronarien mit eisgekühlter 0,9%iger NaCl-Lösung perfundiert und anschließend gekühlt zur weiteren Verarbeitung transportiert. Das Myokardgewebe wurde zunächst in fünf Volumina (v/w) Extraktionspuffer (25 mM Tris, 50 mM KCL, 5 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen, mit einem Mixer zerkleinert und dann mit einem Ultraschall Sonifyer homogenisiert. Dann folgte ein Zentrifugationsschritt mit 20.000 g für 10 min bei 4°C (Heraeus Zentrifuge, Heraeus Holding

2. Material und Methoden

GmbH, Hanau). Zur Proteinfällung wurde der Überstand zu gleichen Teilen (1/1) mit gesättigter 100%iger (4 M) Ammoniumsulfatlösung vermischt, so dass sich eine Endkonzentration von 2 M ergab. Nach fünfzehnminütiger Äquilibrierung bei Raumtemperatur wurde das Gemisch wiederum bei 20.000 g für 30 min zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig vom Pellet getrennt.

Schema: *Aufreinigung des nativen Proteins S100A1*



Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)

Der Überstand der Ammoniumsulfatfällung, der das native S100A1 Protein enthält, wurde im nächsten Schritt zunächst über einen Filter der Porengröße 0,45 µm von Salzkristallen befreit und dann auf eine hydrophobe Interaktionssäule (HiTrap Octyl-Sepharose-Säule, Volumen 100 ml, Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit 10 Säulenvolumina (entsprechend 10 ml) der kalziumhaltigen Pufferlösung A (25 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,5)

2. Material und Methoden

(1ml/min) äquilibriert, um die hydrophobe Interaktion von kalziumgesättigtem S100A1 mit der Säulenmatrix zu maximieren. Die gebundene Proteinfraction wurde dann durch einen Stufengradienten mit Pufferlösung B (25 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, pH 9,5) mit 4 Säulenvolumina eluiert (1 ml/min) und konnte anhand der Proteinabsorption bei 280 nm kontrolliert werden. Alle beschriebenen Reinigungsschritte wurden mit dem High Performace Liquid Chromatography (HPLC) Äkta Purifier System (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt und mit der Software Unicorn 2.20™ analysiert.

Anionenaustauscherchromatographie (AIEX)

Das native Protein S100A1 wurde in 5 ml Aliquots gesammelt und über einen folgenden Chromatographieschritt weiter aufgereinigt, um das EGTA sowie höhermolekulare Verunreinigungen zu entfernen. Dies erfolgte über eine HiTrapQ Anionenaustauschersäule (AIEX) (Pharmacia, Freiburg). Nach Probenauftragung wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina Puffer C (25 mM Tris-HCl, pH 7,5) mit einer Flussrate von 2 ml/min äquilibriert und das native Protein anschliessend über einen Gradienten von 0% auf 40% mit Pufferlösung D (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,5) mit einer Flussrate von 5 ml/min eluiert. Die folgende Reinigung der Säule erfolgte über Spülung mit 100% Puffer B. Das Protein wurde im Anschluß gegen PBS dialysiert und in Aliquots bis zur weiteren experimentellen Verwendung bei -80°C gelagert. Die isolierte Proteinfraction wurde mittels Western Blot identifiziert und die Reinheit durch eine kommerzielle Silberfärbung (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach elektrophoretischer Trennung (SDS-PAGE) überprüft.

Kopplung von S100A1 Protein an den Farbstoff Rhodamin

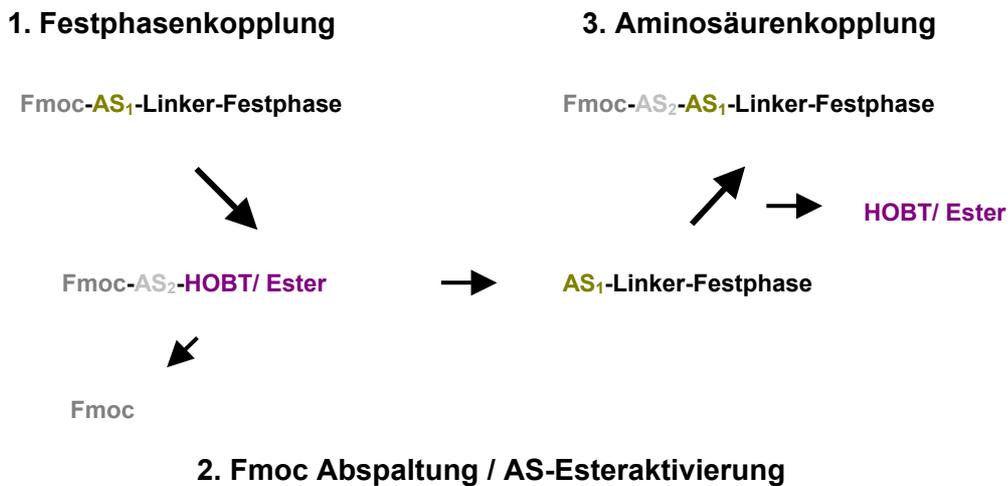
Ein kleiner Teil des Proteins S100A1 wurde von der Fa. Eurogentec am N-terminalen Ende mit dem kommerziell erhältlichen rot-fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin gekoppelt.

2. Material und Methoden

2.2 Synthese und Reinigung von S100A1-Oligopeptiden

S100A1-Oligopeptide wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec (Belgien) auf der Basis der Solid phase peptide synthesis (SPPS) Methode nach Modifikation des Standardprotokolls hergestellt. Die erste Aminosäure (AS) der zu synthetisierenden Peptidkette wurde dazu C-terminal an eine speziell entwickelte Festphase (solid phase) gekoppelt. Die Kettenverlängerung am Fluorene-methoxy-carbonyl (Fmoc) geschützten N- α Terminus durch Bildung einer Peptidbrücke erfolgte nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe und Esteraktivierung der Carboxyl- α -Gruppe einer zweiten AS. Die Anwendung der Fmoc-Strategie erlaubte die fortlaufende Kettenverlängerung bei kontinuierlichem Durchfluss der Reagenzien (continuous flow) und gestattete gleichzeitig eine spektroskopische Kontrolle der Kettenverlängerung.

Schema: *Herstellung von S100A1 Oligopeptiden*



Versuchsdurchführung

Über eine Amidbindung erfolgte die C-terminale Kopplung der ersten AS an die hydrophile Festphasenmatrix aus Polyethylene glycol aminopropyl (PEGA) unter Verwendung eines säurelabilen Linkers nach H. Rink (1987); dem sog. Ringlinker. Als Lösungsmittel für sämtliche Reaktionsschritte (AS Kopplung; Fmoc Abspaltung und Waschschrte) diente N,N-Dimethylformamid (DMF). Um die erste Aminosäure an die PEGA-Festphase zu koppeln, wurde 10 min mit 20% Piperidinlösung gespült, um die Schutzgruppe (Fmoc) des Rinklinkers abzuspalten.

2. Material und Methoden

Im Anschluss daran wurde dreimal mit DMF gewaschen und die Carboxylgruppe der ersten AS durch Bildung eines reaktiven Hydroxybenztriazol (HOBT)-Esters durch Behandlung mit 10% O-Benzothiazol-1-yl-N', N', N', N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) aktiviert. Nach Zugabe der aktivierten AS und Bildung der Peptidbindung zwischen Linker und AS wurde wiederum dreimal mit DMF gewaschen. Um die Fmoc-Gruppe abspalten zu können, wurde die gekoppelte AS erneut mit Piperidin behandelt, um so die Ankopplung der zweiten AS vorzubereiten. Diese Schritte wurden bis zum Erreichen der gewünschten endgültigen Kettenlänge für jede weitere AS wiederholt. Die Abspaltung der Fmoc Gruppen wurde fortlaufend gleichzeitig UV-spektroskopisch (300 - 320 nm) mitverfolgt. Zur endgültigen Abspaltung der Oligipeptidkette von der Festphase wurde Trifluoressigsäure (TFA) benutzt. Um unerwünschte Veränderungen der reaktiven Gruppen der Peptidylreste durch die Säurebehandlung zu vermeiden, wurde die Säure in einem Gemisch aus Wasser, Phenol, Thioanisol und EDT gelöst; sog. Reagenz K (TFA/Wasser/Phenol/Thioanisol/EDT [82.5:5:5:5:2.5]). Die gelösten Peptide wurden erneut in DMF gereinigt und so Proben für die weitere Analyse gewonnen. Die korrekte Masse der synthetisierten Peptide wurden massenspektroskopisch mit der *time-lag focusing* (TLF) *time of flight* (TOF) *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) Methode durch die Firma Eurogentec überprüft. Die Reinheit und Primärsequenz wurde mit der *high performance liquid chromatography* (HPLC) bzw. dem Erdmann-Abbau (Phenylisothiocyanat (PITC)-Methode) überprüft. Die getesteten Peptide wurden lyophilisiert und bis zur weiteren experimentellen Verwendung in Aliquots bei -80°C gelagert (5 mM Peptide, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) w/v, 10 mM HEPES, pH 7,0).

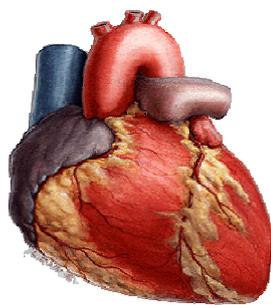
2. Material und Methoden

2.3 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten des Kaninchens und der Ratte

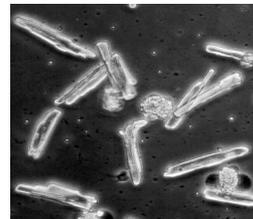
Ventrikuläre Kardiomyozyten des Kaninchens und der Ratte wurden über aorto-koronare retrograde Perfusion durch einen Kollagenaseverdau aus dem Herzmuskelverband gelöst und im Anschluss durch eine Kalziumtoleration als vitale Kardiomyozyten von den restlichen Zellen separiert.

Schema:

Zellisolation



1. Kollagenaseverdau
des Herzens



2. Primärkultur adulter
Kardiomyozyten

Versuchsdurchführung

Die Isolation der Kardiomyozyten wurde im Wesentlichen nach dem Protokoll von H. M. Piper durchgeführt (Piper et al., 1990). Die Kaninchen (New Zealand; 1,5-2 kg KG; 4 Monate) erhielten eine intravenöse letale Dosis von Thiopenthal in die rechte Ohrvene, und nach Erlöschen sämtlicher Schutz- und Schmerzreflexe wurde das noch schlagende Herz über eine bilaterale Thorakotomie entnommen. Männliche Wistar-Ratten wurden intraperitoneal mit einer Überdosis Pentobarbital terminal anästhesiert. Daraufhin erfolgte die Kanülierung des Aortenstumpfes, und das Herz wurde mit einer auf Körpertemperatur (37°C) erwärmten, kalziumfreien Nährlösung (AC Medium: 5,4 mM KCL, 3,5 mM MgSO₄, 0,05 mM NaPyruvat, 20 mM NaHCO₃, 11 mM Glucose, 20 mM HEPES, 23,5 mM NaGlutamat, 4,87 mM NaAzetat, 10 mM EDTA, 0,5 mM Phenol Rot, 15 mM 2,3-Butanedionemonoxime, 20 mM Kreatinin, 15 mM Kreatinphosphat, 15 mM Taurin, 271 U/ml Insulin, pH 7,2) in einem offenen Kreislauf retrograd koronar perfundiert. Die Flussrate im Kaninchen betrug 12 ml/min, in der Ratte 4 ml/min. Nach zehnminütiger Perfusion wurde der

2. Material und Methoden

Kreislauf geschlossen und das Medium mit Kollagenase Typ I (100U/ml) versetzt. Der Verdau erfolgte über einen Zeitraum von insgesamt 30 (Kaninchen) bzw. 15 Minuten (Ratte). Anschließend wurde die Perfusion gestoppt. Dann wurde das verdaute Herz abgenommen und der linke Ventrikel vom restlichen Herzmuskelgewebe separiert. Das Myokard wurde in einer Kulturschale mit einem Volumen von ca. 5 ml AC Medium rasch in ca. 2 mm große Stückchen zerteilt. Unter Zuhilfenahme einer 5000 μ l Pipette (Eppendorf) wurde durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren der verdauten Myokardstückchen eine Zellsuspension hergestellt, die dann über ein Nylonmaschennetz (Porengröße \varnothing 50 μ m) gefiltert werden konnte. Der folgende Arbeitsschritt umfasste die Kalziumtoleration mit einer dichteabhängigen Sedimentation unter der Zielsetzung, die vitalen Kardiomyozyten von lysierten Zellen sowie Bindegewebszellen (Nicht-Kardiomyozyten) zu trennen. Dazu wurde zunächst die zellhaltige Lösung in einem 50 ml Falcon™ Röhrchen mit kalziumhaltigem (10^{-8} M) AC Medium versetzt und im Zellkulturschrank (Hera Cell, Heraeus) inkubiert (37°C, p_{H₂O} 47 mmHg, 95% O₂, 5% CO₂). Die kalziumtoleranten und damit vitalen Kardiomyozyten dieses ersten Schrittes waren bereits nach ca. 5 Minuten aufgrund ihrer höheren Sedimentationsgeschwindigkeit als weiches Zellpellet zu identifizieren. Die restlichen Zellen (Zelllysate und Nicht-Kardiomyozyten) waren zu diesem Zeitpunkt aufgrund ihrer geringeren Dichte noch im Überstand gelöst. Nach Separation von Pellet und Überstand wurde das Pellet erneut in kalziumhaltiges (10^{-7} M) AC Medium gegeben und der Tolerationsprozess bei stufenweise ansteigenden extrazellulären Kalziumkonzentrationen (5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4}) in gleicher Weise bis zu einer Endkonzentration von 1,8 mM weiter geführt. Die durch diesen Vorgang isolierten vitalen Kardiomyozyten wurden in modifiziertem Medium 199 (Sigma) resuspendiert und standardisiert in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

2. Material und Methoden

2.4 Chemische Permeabilisierung isolierter Kardiomyozyten

Durch Zugabe des chemischen Detergenz β -escin zu den isolierten Kardiomyozyten wurden selektiv Poren in der Zellmembran erzeugt, um funktionelle Untersuchungen an der Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums zu ermöglichen. Die Grösse der so geschaffenen Poren betrug im Durchmesser ca. 10nm. Die spezifische Wirkung von β -escin auf das Sarkolemm rührt daher, dass es Cholesterinmoleküle komplexiert und deren Gehalt in der Zellmembran bis zu 10fach höher ist als in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Durch dieses Verfahren ist es möglich, Kalziumbewegungen durch direkte Untersuchungen am SR zu erfassen, ohne die Integrität des SR oder den Proteingehalt sarkoplasmatischer Proteine durch die Permeabilisierung funktionell zu verändern. Ebenso wenig kommt es zu einer veränderten Membranfluidität des sarkoplasmatischen Retikulums (Abb.2.1 a-b) (Thelestam und Mollby, 1979).

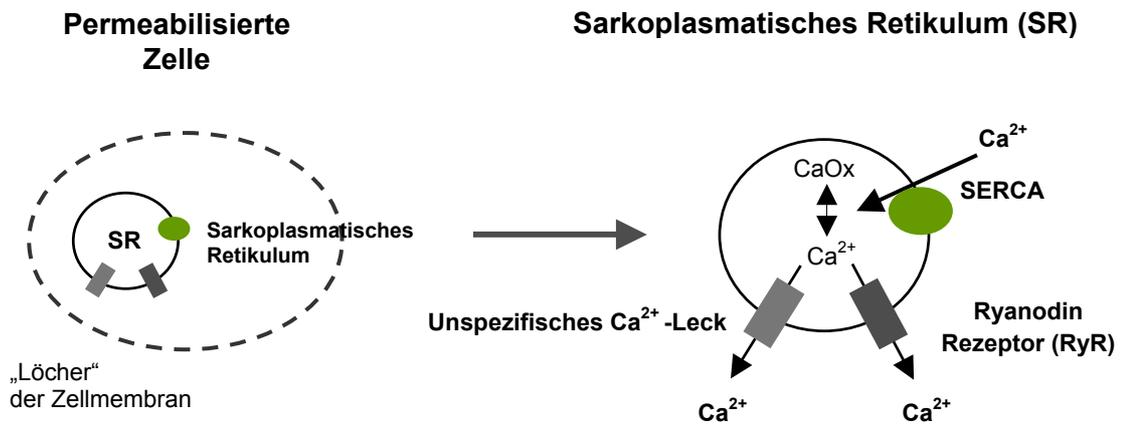


Abb.2.1a

Abb.2.1b

Abb.2.1a-b: Graphische Darstellung des Kalziumstromes über der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums nach chemischer Permeabilisierung der Zellmembran

Abb. 2.1a zeigt schematisch eine β -escin behandelte Zelle, deren äussere Zellmembran selektiv permeabilisiert wurde, Abb. 2.1b das vergrößert dargestellte sarkoplasmatische Retikulum (SR) unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen: nach Aufnahme von Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) durch die SERCA wird es im Lumen des SRs von Oxalat präzipitiert, welches sich über einen unspezifischen Anionentransporter im SR anreichert. Durch Zugabe von Ruthenium Rot wird die Öffnung des Ryanodin Rezeptors, dem sarkoplasmatischen Kalziumfreisetzungskanal, selektiv verhindert. Darüberhinaus besteht noch ein unspezifisches, nicht weiter differenziertes Kalziumleck.

2. Material und Methoden

2.5 Fluoreszenzoptische Messung der SERCA2a-Aktivität an isolierten Kardiomyozyten

Die Menge des in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommenen Kalziums wurde über die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des kalziumsensitiven Farbstoffes Fura-2 bestimmt. Fura-2 ist einer der sensitivsten Fluoreszenzindikatoren für Kalzium. Entwickelt wurde Fura-2 aus dem Kalziumkomplexbildner BAPTA, einem EGTA-Analogon. Fura-2 besitzt eine hohe Fluoreszenzintensität, zeigt eine starke Änderung im Absorptionsspektrum bei Kalziumbindung und zeichnet sich durch eine hohe Selektivität für Kalzium gegenüber anderen zweiwertigen Ionen aus. Seine Absorptionsmaxima befinden sich nahe dem UV-Bereich mit einem Extinktionskoeffizienten im Rahmen von $2\text{-}3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die K_D , die Dissoziationskonstante für den Kalzium-Fura-2-Komplex liegt bei 135 - 300nm und zeigt eine starke Abhängigkeit von der Ionenstärke des verwendeten Mediums (Uto et al., 1991). Durch die Bindung von Kalzium kommt es zu einer Verschiebung aus einem Bereich höherer zu einem Bereich geringerer Anregungswellenlänge. Das Anregungsmaximum für den freien Farbstoff liegt bei 370 - 380nm und bei 340nm nach Bindung von Kalzium. Die Emissionsmaxima des freien und des kalziumgebundenen Farbstoffes liegen mit 512 bzw. 505 nm so nah beieinander, dass eine gemeinsame Emissionsmessung bei 510 nm erfolgt (Abb.2.2) (Kargacin et al., 1988). Setzt man die Emissionsintensitäten nach dualer Anregung als Quotienten in Beziehung zueinander - sogenannte *Ratio* (engl.) -, lässt sich die Kalziumkonzentration gemäß folgender Gleichung bestimmen (Grynkiewicz et al, 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} = \beta \times K_D \times R - R_{\text{min}} / R_{\text{max}} - R$$

R_{min} stellte dabei die minimale Ratio bzw. das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei z.B. 340 und 380 nm Anregungswellenlängen in einer kalziumfreien Lösung dar. R_{max} stellt entsprechend die maximale Ratio dar, bei der der gesamte Farbstoff mit Kalzium gesättigt vorliegt. Die K_D ist die Dissoziationskonstante des Kalzium-Farbstoff-Komplexes und β ein Korrekturfaktor, der sich aus dem Fluoreszenzsignal bei der Wellenlänge des ungebundenen Farbstoffs in kalziumfreier und in kalziumgesättigter Lösung ergibt. Der grosse Vorteil dieser *Ratio* - Technik besteht im Wesentlichen in ihrer Unabhängigkeit gegenüber der tatsächlichen Farbstoffkonzentration (Smith et al., 2000).

2. Material und Methoden

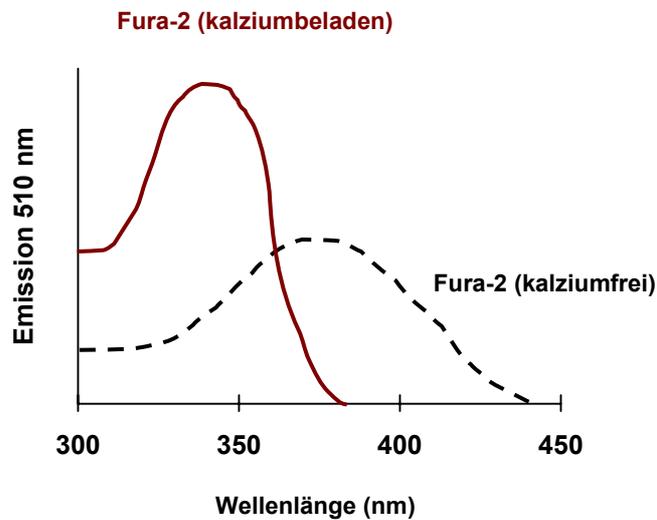


Abb.2.2

Abb.2.2: Fluoreszenzspektrum von Fura-2

Das gezeigte Fluoreszenzspektrum verdeutlicht den Effekt der Kalziumbindung auf das Fluoreszenzverhalten von Fura-2. Im kalzium-gesättigten Zustand liegt das Maximum der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von ca. 340nm, im kalziumfreien Zustand bei 380nm (gemessen bei 510nm). Der Schnittpunkt beider Spektren bei 360nm veranschaulicht den sogenannten isobestischen Punkt, bei dem die Emission des Farbstoffes unabhängig von seiner Kalziumsättigung erfolgt und als ein Maß für die Farbstoffkonzentration genutzt werden kann.

2.5.1 Kalibrierung des Fura-2 Fluoreszenzsignals

Da das Verhältnis zwischen der freien Kalziumkonzentration und der Fluoreszenzintensität nicht linear, sondern sigmoidal verläuft, erfordert die korrekte Darstellung der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) über die Änderung des Fluoreszenzsignals von Fura-2 eine Kalibrierung des Fluoreszenzsignals. Dabei werden der minimale (R_{\min}) und maximale (R_{\max}) Fluoreszenz-Quotient sowie die Werte für die K_D und den Korrekturfaktor β bestimmt, um anschließend anhand der Grynkiewicz-Gleichung das Fluoreszenzsignal in eine bestimmte Kalziumkonzentration umrechnen zu können (Abb. 2.3).

Entsprechende Lösungen zur Messung der maximalen R_{\max} und minimalen Fluoreszenz R_{\min} Ratio wurden zusammengestellt (10 mM EGTA, 5 mM ATP, 5 μ M Ruthenium Red, 1×10^6 Zellen/ml). Die in der Lösung enthaltenen Kardiomyozyten hatten in dieser Konzentration keinen Einfluss auf die Bestimmung von R_{\max} und R_{\min} .

2. Material und Methoden

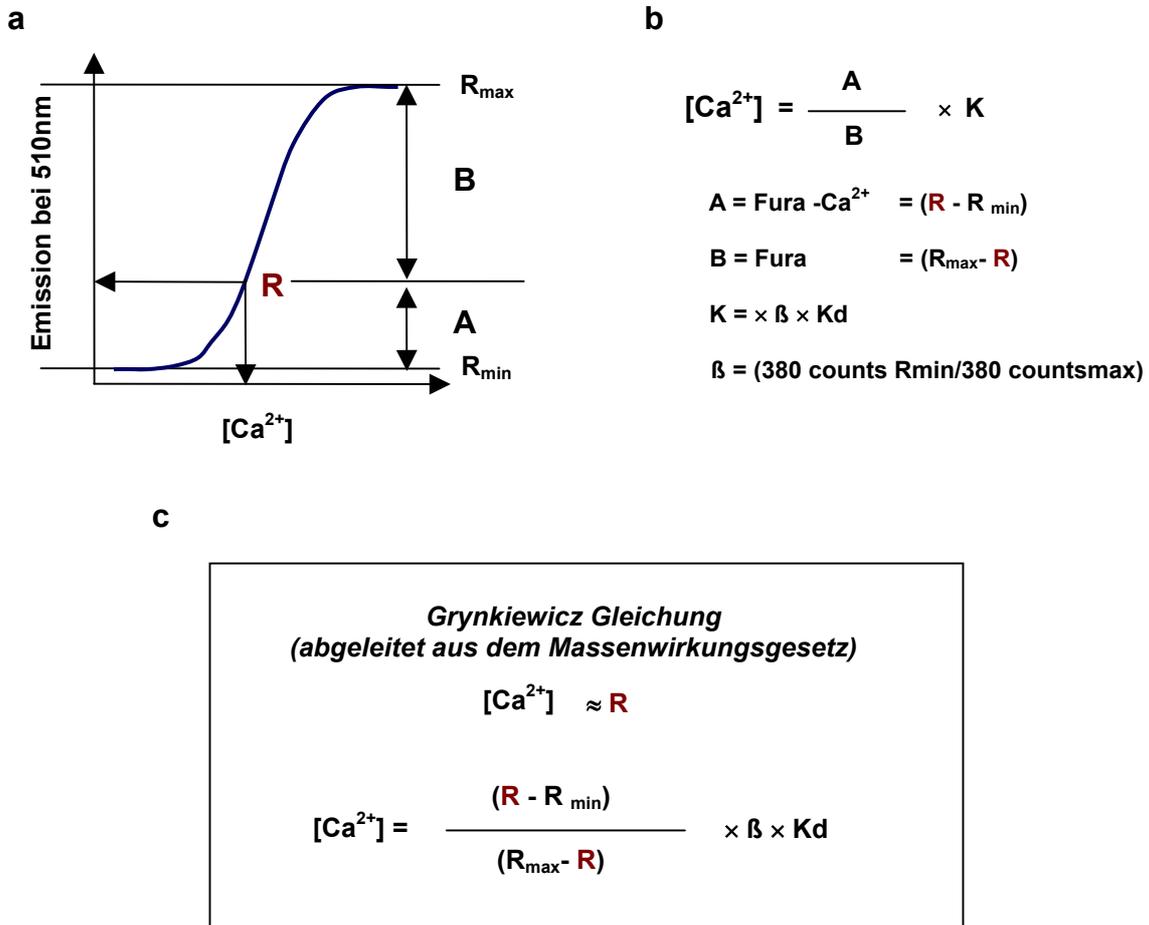


Abb.2.3

Abb.2.3: Veranschaulichung der Grynkiewicz-Gleichung und ihrer Verwendung für die Kalibrierung und Messung des Fura-2-Fluoreszenzsignals

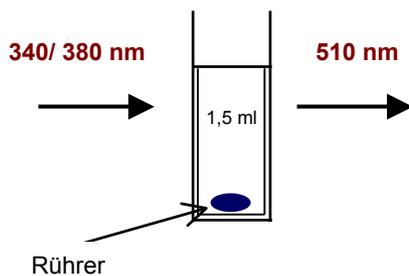
Das proportionale Verhältnis zwischen Kalzium und dem Fura-2-Quotienten (*Fura-Ratio*) ist nicht linear, sondern verläuft sigmoidal mit einer Sättigungscharakteristik (a). Um das aktuelle gemessene Fura-2-Fluoreszenzsignal (**R**) nach der Grynkiewicz-Gleichung (c) in eine bestimmte Kalziumkonzentration umrechnen zu können, benötigt man die durch die Kalibrierung bestimmten Werte für R_{\min} und R_{\max} , sowie die Konstanten β (Korrekturfaktor) und die K_D (Dissoziationskonstante). Der aktuelle Fluoreszenzwert **R** kann hierbei als Quotient aus der Intensität des kalziumgebundenen Farbstoffs **A** (ermittelt als Differenz aus $R_{\max} - R$) und des freien Farbstoffs **B** (ermittelt als Differenz aus $R - R_{\min}$) dargestellt werden (b).

Unter den während der Experimente vorliegenden Bedingungen betrug die Affinitätskonstante von Fura-2 für Kalzium 110 ± 20 nM und der Korrekturfaktor (β) war $14,0 \pm 0,1$ in Anlehnung an die Messungen von Grynkiewicz et al. (1985) und Kargacin et al. (1988). Die Bindungskonstante von S100A1 für Kalzium wurde von Baudier et al. (1986) übernommen.

2. Material und Methoden

Schema: *Fluoreszenzmessung*

Suspension β -escin permeabilisierter
Kardiomyozyten (10^6 Zellen/ml)/
EDL-Vesikel



Mock (\cong Zytosolische) Lösung
(Konzentration in mM)

120	KCl
5	ATP
15	CrP
1	Mg
25	Hepes
10	Oxalat
0,05	EGTA
0,01	Fura-2 (Salz)
0,005	Ruthenium Rot
0,02	FCCP
0,02	Oligomycin

pH 7,0 (20°C)

Versuchsdurchführung

Die Untersuchung der SERCA2-Aktivität fand an chemisch permeabilisierten Kardiomyozyten der Ratte und des Kaninchens in Form einer quantitativen Bestimmung der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum der jeweilig untersuchten Zellpopulation statt. Diese Experimente wurden ebenfalls an präparierten SR-Vesikeln des Skelettmuskels durchgeführt. Als chemisches Detergenz wurde β -escin verwendet. Die Untersuchung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 1500 μ l mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 /ml. Ein Aliquot an Zellen mit der angegebenen Konzentration wurde mit 0,1 mg/ml 100 μ M β -escin versetzt und für wenige Minuten leicht geschüttelt. Durch Zentrifugation mit nachfolgender Resuspension in einer das intrazelluläre Milieu imitierenden Lösung (*Mock* Lösung: 0,05 M EGTA, 100 mM KCl, 25 mM Hepes, 1 mM $MgCl_2$, 40 mM NaCl, pH 7,0) ist das Detergenz entfernt worden. Die Zellsuspension wurde in eine Küvette gegeben und folgende Lösungen wurden hinzugesetzt bis zu einem Gesamtvolumen von 1500 μ l: 10 mM Oxalat, 1 mM $MgCl_2$, 10 μ M Fura-2, 5 mM ATP/CrP-Lösung (20 mM ATP, 40 mM Kreatinphosphat, 0,05 M EGTA, 25 mM Hepes, 100 mM KCl, 19,75 mM $MgCl_2$), 5 μ M Ruthenium Red und je 20 μ M der mitochondrialen Inhibitoren Oligomycin und Carbonylcyanid. Die Zellen

2. Material und Methoden

wurden durch vorsichtiges Rühren in Suspension gehalten, und das Fura-2-Fluoreszenzsignal wurde bei 30 Hz mit einem *Spinning wheel* (engl.) Spektrophotometer aufgezeichnet (Cairn research, UK).

Die Affinitätskonstanten für ATP und Kreatinphosphat (CrP) wurden nach Fabiato und Fabiato (1979) und von Miller und Smith (1984) übernommen. Korrekturen für die Ionenstärke, Details der pH-Messungen und Berücksichtigung der EGTA-Reinheit sowie die Prinzipien der Berechnung sind ebenfalls bei Miller und Smith (1984) beschrieben. Die freie Mg^{2+} -Konzentration betrug in allen Lösungen 0,9 – 1,0 mM. Ruthenium Red wurde in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt, um das Kalziumleck über den Ryanodinrezeptor (RyR) zu blockieren (Smith et al., 2000), da vorherige Experimente gezeigt hatten, dass Ruthenium Red in einem höheren Konzentrationsbereich die Aktivität der Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums vermindert (Kargacin et al., 1988). Zudem reduzierten 5 μ M Ruthenium Red das Fluoreszenzsignal von Fura-2 in beiden Exzitationswellenlängen gleichermaßen. Ein Effekt auf die Dissoziationskonstanten K_D und β konnte nicht beobachtet werden (Smith et al., 2000).

Die Experimente wurden mit 5 μ l einer 10 mM $CaCl_2$ -Stocklösung (0,4 mM) gestartet und im weiteren Verlauf durch repetitive Gaben von jeweils 10 μ l der 10 mM $CaCl_2$ -Stocklösung (0,8 mM) fortgeführt. Dieses Vorgehen konnte im Mittel dreimalig wiederholt werden. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (20 - 22° C) durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.5.2 Aufzeichnung und Analyse der Daten

Das Fluoreszenzsignal der gemessenen *Ratio* des 340/380 Fluoreszenzsignals sowie jeweils die einzelnen Signale der 340 und 380 nm Wellenlängen wurden bei –3 dB mit 30 Hz gefiltert und für spätere Analysen bei 10 Hz digitalisiert.

Die aufgezeichneten Daten wurden anschließend unter Verwendung des Computerprogramms Origin, Version 5.0, Microcal, zunächst graphisch in einer Exponentialfunktion als Abnahme der freien Kalziumkonzentration über die Zeit dargestellt (Smith et al., 2000).

Dabei entspricht τ der Steigung der in Abb. 2.4 dargestellten Exponentialfunktion, die sich nach halblogarithmischer Darstellung als Gerade darstellte. τ wird als Geschwindigkeit gemessen und in ms angegeben.

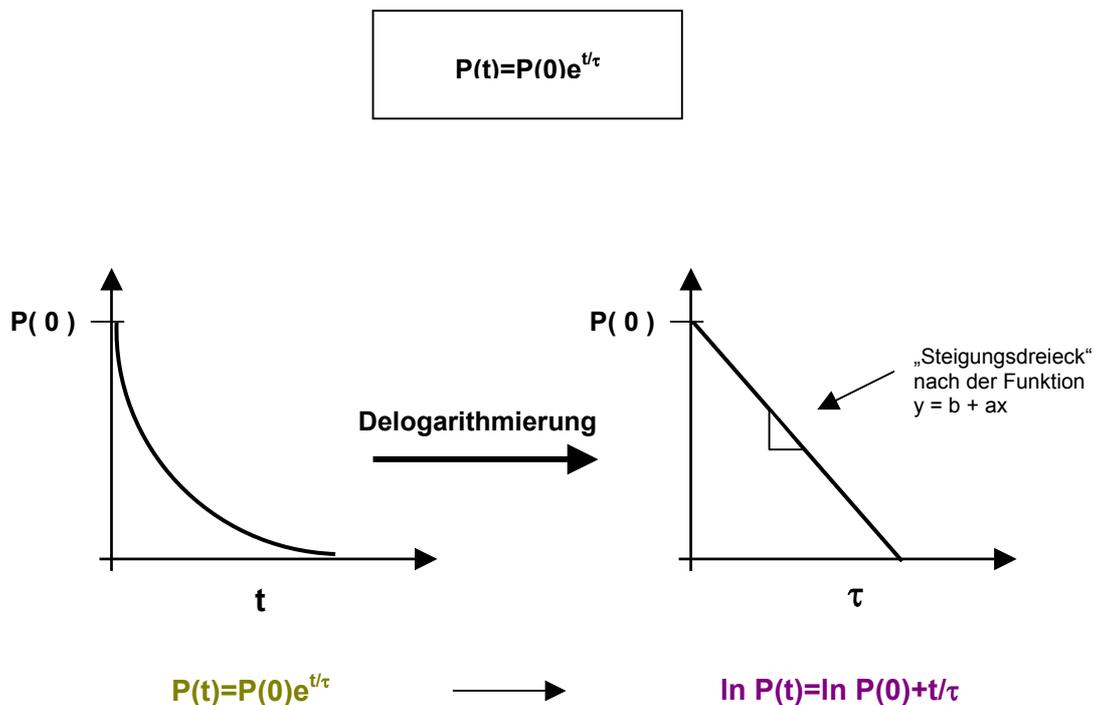


Abb.2.4

Abb.2.4: Transformation der Exponentialfunktion

Zur Veranschaulichung kann eine Delogarithmierung der Exponentialfunktion durchgeführt werden, nach der sich die Kalziumaufnahme bzw. der Abfall der Fluoreszenz als lineare Gleichung darstellt. Dann entspricht die Steigung der Geraden der Zeitkonstanten τ (ms).

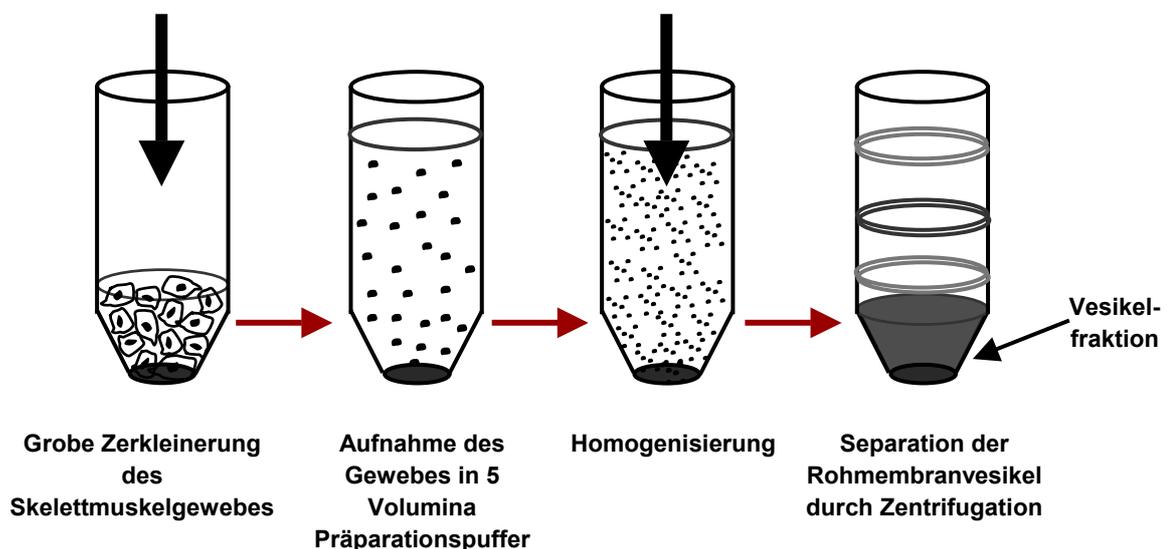
2. Material und Methoden

2.6 Präparation sarkoplasmatischer Vesikel aus dem Skelettmuskel der Ratte

Die Präparation vesikulärer Membranen aus dem M. extensor digitorum longus der Ratte (EDL-Vesikel), einem schnell zuckenden Muskel, erfolgte über verschiedene Zentrifugationsschritte. Sämtliche Präparationsschritte nach der Materialgewinnung wurden bei einer Temperatur von ca. 4 – 5°C in einem Kühlraum durchgeführt. Ebenso wurden sämtliche Zentrifugationsschritte in 4°C temperierten Zentrifugen durchgeführt.

Schema:

SR- Vesikel Präparation



Versuchsdurchführung

Das Skelettmuskelgewebe der Ratte wurde nach vorheriger terminaler Anästhesierung mit Pentobarbital von Wistar-Ratten aus dem M. extensor digitorum longus gewonnen. Das Muskelgewebe wurde zerkleinert und in 5 Volumina frisch hergestelltem, 4°C temperiertem Präparationspuffer (300 mM Saccharose, 1 mM PMSF, 20 mM PIPES, pH 7,4) aufgenommen. Mit einem Waring Blender wurde das Myokard zur Zerstörung der Gewebsintegrität bei mittlerer Drehzahl für ca. 3-4 min zerkleinert. Mit einem Ultra Turrax mit dem Dispergiereinsatz S 25 KR-18 G erfolgte eine weitergehende Zerkleinerung bei höchster Drehzahl für 20 - 30 sec. mit ca. 10 - 20 Durchgängen. Durch diese Zerkleinerungsschritte wurde ein Homogenat mit frei in Lösung

2. Material und Methoden

vorliegenden zellulären und subzellulären Strukturen erzeugt. Diese Suspension wurde mit dem gleichen Volumen Gefrierpuffer (400 mM Saccharose, 5 mM HEPES, 5 mM Tris, pH 7,2) verdünnt und zur weiteren Präparation der Rohmembranvesikelpräparation bereitgestellt.

Die weitere Präparation der gewonnenen Homogenate des sarkoplasmatischen Retikulums wurde wie bei Schwinger et al. (1995) beschrieben durchgeführt. Bei der Aufarbeitung der Homogenate zur Rohmembranvesikelpräparation wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 8000 rpm (Beckmann-Zentrifuge, München) aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes die kontraktile Elemente, Mitochondrien sowie Zelltrümmer und –kerne abgetrennt. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand zur weiteren Verwendung konserviert. Der Überstand wurde über 4 - 5 Lagen Gaze gefiltert und anschließend erneut für 60 min mit 35000 rpm abzentrifugiert (Beckmann-Ultrazentrifuge, München). Der Überstand wurde verworfen, während das Sediment, bestehend aus Anteilen des sarkoplasmatischen Retikulums und sarkolemmaler Membranen, in Gefrierpuffer resuspendiert (ca. 5 mg/ml Protein) und bis zur Versuchsdurchführung bei – 80°C gelagert wurde.

Der Proteingehalt wurde mit dem DC Assay (Bio Rad, USA) bestimmt und lag bei 15 µg/µl (s. Kapitel 2.8).

2. Material und Methoden

2.7 Fluoreszenzoptische Messung der SERCA1-Aktivität in EDL-Membranvesikeln

Die Messung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme in skelettmuskuläre SR-Vesikel des M. extensor digitorum longus (EDL-Vesikel) erfolgte wie bereits unter Punkt 2.5 für permeabilisierte Kardiomyozyten des Kaninchens und der Ratte beschrieben, indem die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des kalziumsensitiven Farbstoffes Fura-2 bestimmt wurde.

Versuchsdurchführung

150 µg der präparierten sarkoplasmatischen Membranvesikel wurden in 1,5 ml einer Reaktionslösung [*Mock* Lösung: 0,05 M EGTA, 120 mM KCl, 25 mM Hepes, 1 mM MgCl₂, 5 mM ATP/ CrP-Lösung (20 mM ATP, 40 mM Kreatinphosphat, 0,05 M EGTA, 25 mM Hepes, 100 mM KCl, 19,75 mM MgCl₂)] suspendiert und mit 10 µM Fura-2, 5 µM Ruthenium Red und je 20 µM der mitochondrialen Inhibitoren Oligomycin und Carbonylcyanid äquilibriert und vorsichtig gerührt.

Die Messungen wurden durch Addition von 67 µM CaCl₂ gestartet, wodurch es zu einem Anstieg der freien Kalziumkonzentration im Reaktionsvolumen von ~ 50 - 100 nM auf 500 nM kam. Die folgende Abnahme des Fura-2-Fluoreszenzsignals (340/380nm) signalisierte die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme und wurde bei -3 dB bei 30 Hz mit einem *Spinning wheel* (engl.) Spektrophotometer für die spätere Analyse aufgezeichnet (Cairn research, UK).

Die Rate der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme pro Zeiteinheit wurde über die Zeitkonstante Tau (τ) der extrasarkoplasmatischen Kalziumabnahme gewonnen. Die Beziehung zwischen der gegebenen Kalziumkonzentration und der resultierenden Fluoreszenz-*ratio* (engl.) wurde mit verschiedenen Kalibrierungsexperimenten in Anlehnung an Grynkiewicz et al. (1985) erstellt, wie bereits unter Punkt 2.5.1 beschrieben.

Um die Effekte von S100A1 zu untersuchen, wurden die Vesikel vor der Messung für eine Stunde mit 1 µM S100A1 Protein präinkubiert. Als Kontrolle diente PBS-Puffer, in dem das Protein nach der Aufreinigung aus dem Schweinmyokard gelöst worden war.

2. Material und Methoden

2.8 Quantitative und qualitative Proteinanalyse

2.8.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung wurde der DC Protein Assay der Firma Bio Rad, USA (Lowry et al., 1951) verwendet. Als Standardprotein diente bovines Serumalbumin (BSA, Sigma) in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mg. Die Proben wurden entsprechend verdünnt, um den entsprechenden Konzentrationsbereich erreichen zu können.

Versuchsdurchführung

50 µl der Probenlösung sowie der Standardlösung wurden in verschiedene Reagenzgläser pipettiert und mit 250 µl Reagenz A versehen (alkalische Kupfertartrat-Lösung), das zuvor mit einem Anteil von 2% des Reagenz S (Detergens) versetzt wurde. Die Lösungen wurden gründlich vermischt und es folgte die Zugabe von 2 ml Reagenz B (verdünntes Folin-Reagenz). Nach einem Zeitraum von 15 Minuten wurde die Auswertung bei einer Wellenlänge von 750 nm vorgenommen.

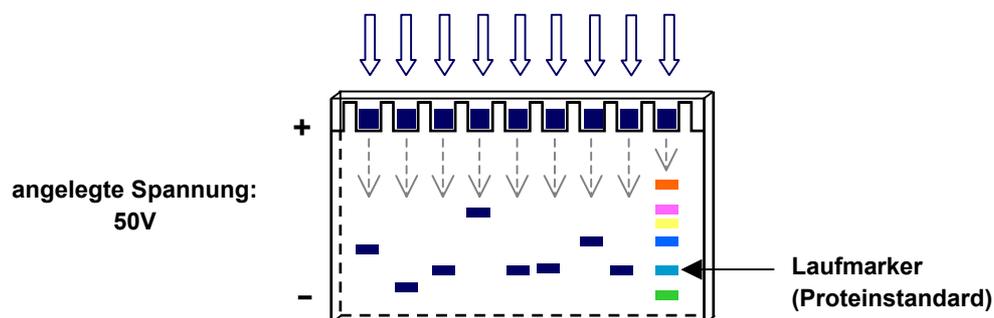
2. Material und Methoden

2.8.2 Polyacrylamidelektrophorese (PAGE)

In der Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes voneinander aufgetrennt und anschließend im Western Blot dargestellt.

Die Auftrennung von Proteinen im niedermolekularen Bereich, wie beispielsweise kalziumbindende Proteine der S100-Familie und Phospholamban, erforderte eine Modifikation herkömmlicher Elektrophoresetechniken (Lämmli, 1970), da ein Puffersystem, bestehend aus Tris und Glycin, keine Auftrennung von Proteinen mit einer Größe von 1 bis 100 kDa erlaubt. Aus diesem Grund wurde ein modifiziertes Puffersystem verwendet, welches Taurin statt Tricin benutzt (U. Redweick, Abt. Klinische Chemie, Kinderspital Zürich). Dieses System zeichnet sich durch eine hohe Auflösung mit geringerer Wärmeentwicklung und Artefaktbildung aus.

Schema: *Polyacrylamidgelelektrophorese*



Versuchsdurchführung

Die zu verwendenden Glasplatten wurden gereinigt und in entsprechende Halterungen eingefügt, dann die Lösungen für Trenngel (Stammlösung: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8) und Sammelgel (Stammlösung: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8) angesetzt. Dabei enthielt das Trenngel einen Anteil von 15% Monomerlösung (29,1% Polyacrylamid, 0,9% Bis), das Sammelgel einen Anteil von 5%. Nach Zugabe von 10% APS zum Trenngelgemisch wurde es kurz und zügig durchmischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Das Trenngel wurde mit 70%igem Ethanol überschichtet, um einen glatten Oberrand zu gewährleisten. Das Auspolymerisieren erfolgte bei Raumtemperatur für 30

2. Material und Methoden

Minuten. Das Ethanol wurde danach abgegossen. Nach Zugabe von 10% APS zum Sammelgelgemisch wurde es über das Trenngel geschichtet und der Probentaschenkamm eingelegt.

Bevor die Proben in die Probentaschen des Gels gegeben wurden, wurden sie mit Probenpuffer (0,5M Tris-HCl, 5% SDS, 10% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 5% Mercaptoethanol, pH 6,8) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Anschließend wurden sie für 5 Minuten gekocht. S100A1 enthaltende Proben wurden weiter mit Iodacitamid und DTT vorbehandelt, um die Dimerisierung des Proteins zu unterbinden bzw. die vorhandenen Disulfidbrücken zu sprengen.

Nach dem Abkühlen konnten je nach Taschengröße 5 - 20 µl des Probenansatzes und eines Lauf- sowie eines biotinylierten Färbestands aufgetragen werden.

Die Gelelektrophorese fand in einer Höfer-Kammer (Fa. LKB, Bromma, Schweden) bei einer konstanten Stromstärke von durchschnittlich 50 Volt statt (Elektrophoresepuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M Taurin, 0,1% SDS). Der Vorgang wurde gestoppt, sobald sich die Probe im unteren Drittel des Gels befand. Dabei richtete sich die Zeitdauer der Elektrophorese nach der Größe des entsprechenden Proteins. Kleine Proteine benötigen im Gegensatz zu Proteinen über 100 kDa eine geringere Laufzeit, um aufgetrennt zu werden.

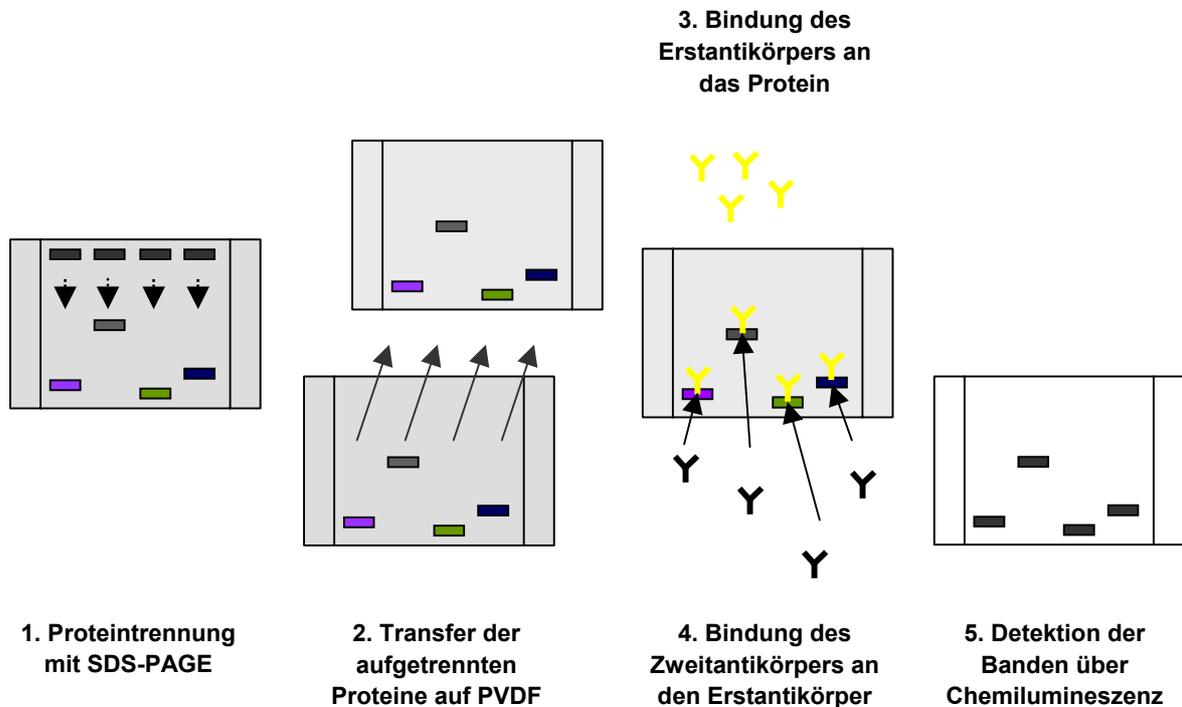
2. Material und Methoden

2.8.3 Westernblot von Polyacrylamidgelen

Der Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen wurde in einem Tankblotsystem der ETH Zürich durchgeführt, da vorherige Versuche im herkömmlichen Semi-dry-Verfahren (Towbin et al., 1979) gezeigt hatten, dass hydrophobe kalziumbindende Proteine in diesem Verfahren nicht ausreichend transferiert werden können, da sie mit Acrylamid in Wechselwirkung treten.

Durch die Verwendung von Chemilumineszenz kann die Sensitivität von Westernblots gegenüber den herkömmlichen Systemen wie z.B. Chlornaphthol erheblich gesteigert werden (Albrecht et al., 1979). Unser Labor verwendete Chemikalien der Fa. Tropix (Western Light Plus TM Chemilumineszenz Detection System). Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf einer Reaktion, die zwischen dem sekundäntikörpergekoppeltem Biotin und streptavidingekoppelter alkalischer Phosphatase stattfindet, und von CSPD[®] unter Lichtentwicklung umgesetzt wird.

Schema: Quantitative Proteinanalyse über Western Blot



2. Material und Methoden

Versuchsdurchführung

Das Polyacrylamidgel wurde zurechtgeschnitten, ebenso die PVDF-Membran und das Whatman-Filterpapier. Dabei diente vorgefärbter Proteinstandard als Laufmarker zur Erkennung des focussierten Bereiches. Vor Gebrauch musste die PVDF-Membran mit 100% Methanol für wenige Sekunden aktiviert und anschließend in Tankblotpuffer (20% Methanol, 15 mM Taurin, 15 mM Tris) äquilibriert werden.

Die PVDF-Membran und das Polyacrylamidgel wurden übereinander gelegt und, von jeweils drei Lagen Whatman-Filterpapier umgeben, in die Tankblotkammer (Tankblot-Kammer, E. Wetzler, Laborgerätebau, Zürich, Schweiz) getaucht, wobei die Membran auf der Seite der Anode zu liegen kam.

Der Proteintransfer fand bei einer konstanten Spannung von 50 Volt über einen Zeitraum von 2 Stunden statt. Im Anschluss erfolgte die spezifische Anfärbung von Antigenen auf Blotmembranen nach dem hier aufgeführten Protokoll:

- dreimaliges Waschen der PVDF-Membran für jeweils 10 Minuten in 10% Waschpuffer (25mM Tris 1,5M NaCl, 10mM CaCl₂)
- Inkubation in Blockierpuffer (0,2% I-Block™, 10% Waschpuffer, 0,1% Tween-20) für min. 60 Minuten, optimal über Nacht
- Inkubation mit Primärantikörper [Anti-S100A1:SA5632 (Eurogentec), polyklonal, 1/5000 bis 1/100000 verdünnt] bei Raumtemperatur für 45 Minuten
- dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten in Blockierpuffer
- Inkubation mit biotinkoppeltem Sekundärantikörper [Ziege-Anti-IgG-Kaninchen (Dianova), 1/40000 verdünnt] bei Raumtemperatur für 45 Minuten
- dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten in Blockierpuffer
- Inkubation mit alkalischem Assaypuffer (100mM Tris, 100mM NaCl, ph 9.5) für 5 Minuten bei Raumtemperatur

2. Material und Methoden

Die Membran wurde danach auf eine durchsichtige Plastikfolie gelegt und mit 3 ml des alkalischen Phosphatase Substrates CDP-Star™ gleichmäßig benetzt. Nach 5-minütiger Reaktionszeit erfolgte der spezifische Proteinnachweis durch Belichtung eines handelsüblichen, chemilumineszenzsensiblen Blattfilms. Die Filmentwicklung erfolgte in einem Entwickler der Firma Agfa, Belgien.

2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sämtlicher Experimente sind als arithmetischer Mittelwert (MW) und der dazugehörigen Standardabweichung des Mittelwertes (STABWN) aus den jeweiligen Einzelwerten (n = Anzahl der Experimente) berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Testes für verbundene bzw. unverbundene Stichproben ermittelt. Ein p -Wert von $< 0,05$ im zweiseitigen Student's t-Test wurde als signifikant angesehen.

2. Material und Methoden

2.10 Material und Reagenzien

Adenosintriphosphat (ATP), Sigma

Agfa-Chemilumineszenz, Agfa

Ammoniumsulfat, Sigma

Anti - S100A1 - Antikörper, polyklonal, Eurogentec (Primärantikörper)

Anti - PLB – Antikörper, Upstate

APS, Sigma

2,3-Butanedione Monoxime (BDM), Sigma

β-escin, Sigma

Bis, Sigma

Calciumchlorid (CaCl₂), Sigma

Carbogen (O₂ 95%/CO₂ 5%), Dezernat Technik Universität Lübeck

Carbonylcyanid, Calbiochem

CDP-Star™, Applied Biosystems

DC Assay Proteinassay, Bio Rad

Dimethylsulfoxid (DMSO), Novabiochem

DTT, Sigma

EDT, Sigma

Ethanol, Apotheke der Universität Lübeck

Ethylenediamintetraacetat (EDTA), Sigma

Ethylenglykol(bisaminoethyl)tetraessigsäure (EGTA), Sigma

Fura-2, Molecular Probes

Gaze

Glucose, Sigma

Glycin, Sigma

Glycerin, Sigma

I-Block™, Applied Biosystems

Insulin, Hoechst

Iodacetamid, Merck

2. Material und Methoden

Kaliumchlorid (KCL), Sigma

Kollagenase Typ I, Worthington

Kreatinin, Sigma

Kreatinphosphat (CrP), Sigma

Kulturschalen, Greiner

Magnesiumchlorid ($MgCl_2$), Sigma

Magnesiumsulfat ($MgSO_4$), Sigma

Medium 199, Sigma

Mercaptoethanol, Merck

Methanol, Merck

Multi-Mark Standard, Invitrogen

MOPS, Merck

N,N-Dimethylformamid (DMF), Novabiochem

N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonsäure (HEPES), Sigma

NADH, Sigma

Natriumacid (NaN_3), Sigma

Natriumacetat (Na Acetat), Sigma

Natriumbicarbonat ($NaHCO_3$), Sigma

Natriumchlorid (NaCl), Sigma

Natriumglutamat (Na Glutamat), Sigma

Natriumhydrogencarbonat (Na_2HCO_3), Sigma

Natriumpyruvat (Na Pyruvat), Sigma

O-Bezothiazol-1-yl-N', N', N'-tettramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU)

Oligomycin, Calbiochem

Oxalat, Sigma

PBS, Sigma

Phenol, Merck

Phenol Rot, Sigma

Phosphoenolpyruvat (PEP), Sigma

Piperidinsäure, Novabiochem

2. Material und Methoden

PIPES, Sigma

PMSF, Sigma

Polyacrylamid, Merck

Polyethylene-glycol-aminopropyl (PEGA), Novabiochem

PVDF Membran, Millipore

Pyruvatkinase/ Laktatdehydrogenase Mixtur, Sigma

Ruthenium Red, Sigma

Saccharose, Sigma

Salzsäure (HCl), Apotheke der Universität Lübeck

SDS,

Taurin, Sigma

Thioanisol, Merck

Thiopental, Merck

Triethanolamin-HCL (TEA), Sigma Trifluoressigsäure (TFA), Merck

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), Sigma

Tween 20, BioRad

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 Aufreinigung von nativem S100A1-Protein aus dem Myokard des Schweins

Unter Verwendung des von Ehlermann et al. (2000) entworfenen Reinigungsprotokolls für S100A1 aus dem Myokard des Schweins konnten aus einer Menge von 100 g ventrikulärem Myokard 2 mg des nativen Proteins S100A1 mit einem Reinheitsgrad von > 95% gewonnen werden. Der Proteingehalt nach der Aufreinigung wurde mit Hilfe des DC Protein Assay der Firma Bio Rad, USA, standardisiert bestimmt und anschließend der Reinheitsgrad der aufgereinigten Proteinfraktion mit einer hochsensitiven Silberfärbung überprüft, wie in Abb.3.1a dargestellt. Auf Höhe der 6.5 kDa Bande des Proteinstandards stellt sich das durch die denaturierenden Bedingungen des Gellaufs entstandene S100A1-Monomer dar.

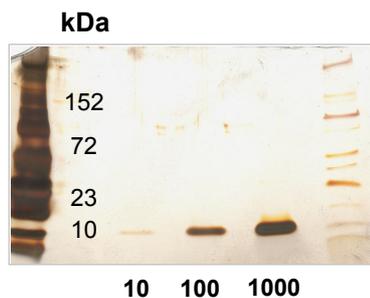


Abb. 3.1a

Abb.3.1a: Silberfärbung des aufgereinigten Proteins S100A1

Repräsentative Silberfärbung des aufgereinigten Proteins S100A1 in einem Konzentrationsbereich von 10, 100 und 1000 ng als Verdünnungsreihe, die den Reinheitsgrad des Proteins dokumentiert.

Die Spezifität der Aufreinigung konnte mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung eines spezifischen, polyklonalen Antikörpers belegt werden (Abb. 3.1b). Die oberhalb des S100A1-Monomers gelegene Bande stellt keine unspezifische Antikörperreaktion dar; es handelt sich dabei um das S100A1-Dimer.

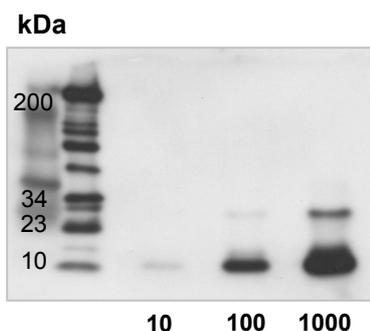


Abb. 3.1b

Abb. 3.1b: Western Blot des aufgereinigten Proteins S100A1

Repräsentative Darstellung des Protein-nachweis des aufgereinigten Proteins S100A1 in einem Konzentrationsbereich von 10, 100 und 1000 ng. Als schwache Bande ist das S100A1 Dimer oberhalb der 23 kDa Bande zu erkennen.

3. Ergebnisse

3.2 Charakterisierung der synthetisierten S100A1-Oligopeptide

Nach Synthese der S100A1-Oligopeptide (N, C, H) wurde ihre Masse spektroskopisch und ihre Reinheit zunächst mit Hilfe der HPLC Technik in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec, Niederlande, überprüft. Der Reinheitsgrad der synthetisierten Oligopeptide konnte zusätzlich noch durch eine hochsensitive Silberfärbung dokumentiert werden, wie Abb. 3.2a zeigt.

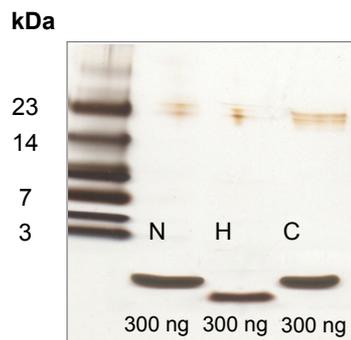


Abb. 3.2 Silberfärbung der synthetisierten Oligopeptide

Repräsentative Darstellung einer hochsensitiven Silberfärbung der drei Oligopeptide des N-terminalen (N), C-terminalen (C) Endes und der zentralen Linkerregion (*hinge region*) in einem Konzentrationsbereich von 300 ng.

Abb. 3.2

Im Folgenden sind schematisch die Aminosäuresequenzen (aa) und die Molekulargewichte der drei synthetisierten Oligopeptide im Vergleich zur Primärsequenz des humanen Proteins S100A1 abgebildet.

Protein	: MGSELETAMETLINVFHAHSGKEGDKYKLSKKELKELLQTELSGFLDAQKDVIDAVDKVM									
(aa)	1	10	20	30	40	50				
Peptide	: GSELETAMETLINVF					: LSGFLDAQKDVIDA				
	N-terminal (N) (aa: 2-16)					Hinge-region (H) (aa: 42-54)				
	M.W. 1652					M.W. 1377				
Protein	: KELDENGDFQEVDFQEVVVLVAALTVACNFFWENS									
(aa)	60	70	80	90						
Peptide	: YVVLVAALTVACNFFWENS									
	C-terminal (C) (aa : 75-94)									

3. Ergebnisse

3.3 Enzymatische Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte und des Kaninchens

Mit Hilfe eines enzymatischen Isolationsprotokolls nach Piper et al. (1990) gelang es, durchschnittlich $15,0 \pm 2,0 \times 10^6$ kalziumtolerante ventrikuläre Kardiomyozyten aus einem Kaninchenherz bzw. 8×10^6 Kardiomyozyten aus einem Rattenherz zu isolieren. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung im inversen Phasenkontrast zeigten die vitalen Kardiomyozyten die typische rechteckig- bis backsteinförmige Morphologie mit der charakteristischen Querstreifung (Abb. 3.3a und 3.3b).

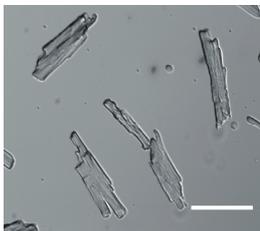


Abb. 3.3a

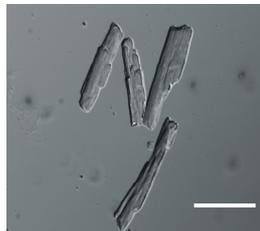


Abb. 3.3b

Abb. 3.3a/b

Repräsentative Aufnahme ventrikulärer Kardiomyozyten des Kaninchens (Abb. 3.1a) und der Ratte (Abb. 3.1b) nach enzymatischer Isolation und Kalziumtoleration (Vergrößerung 10fach, Balken 80 μM).

3.4 Chemische Permeabilisierung der Zellmembran ventrikulärer Kardiomyozyten

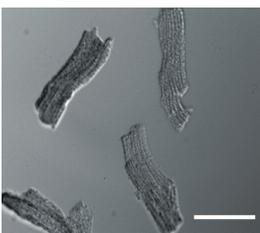


Abb. 3.4a

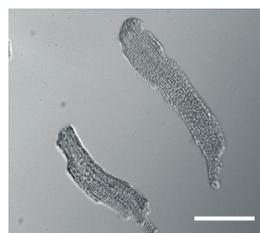


Abb. 3.4b

Abb. 3.4a/b

Repräsentative Aufnahme ventrikulärer Kardiomyozyten des Kaninchens (Abb. 3.4a) und der Ratte (Abb. 3.4b) nach Permeabilisierung mit β -escin (Vergrößerung 10fach, Balken 80 μM).

Bis zur chemischen Permeabilisierung der Zellmembran (Sarkolemm) wurden die Kardiomyozyten in einer kalziumfreien Nährlösung bei 4°C aufbewahrt. Für die weitere experimentelle Verwendung wurden jeweils zellhaltige Aliquots entnommen und durch Zugabe des Detergens β -escin sarkolemmal gehäutet. Durch Zugabe von Adenosin triphosphat (ATP) und Creatinphosphat (CrP) wurde dabei einerseits die Ausbildung einer Kontraktur der Zellen verhindert, so dass keine Verkürzung und Abrundung der Zellen erfolgte (Abb. 3.4a und 3.4b). Andererseits wurde damit die

3. Ergebnisse

Aufrechterhaltung der ATP-abhängigen Zellfunktionen gewährleistet. Aufgrund der spezifischen Komplexierung der Cholesterinmoleküle im Sarkolemm durch β -escin zeigte sich morphologisch lediglich ein veränderter spezifischer Brechungsindex, der zu einer Transparenzminderung im lichtmikroskopischen Bild führte. Im Vergleich der Abb. 3.3a und b mit Abb. 3.4a und b zeigt sich die erhaltene Zellmorphologie nach Permeabilisierung der Zellmembran.

3.5 Aufnahme und Detektion von S100A1-Protein in sarkolemmal permeabilisierte Zellen

Um den freien Zugang des S100A1-Proteins zum sarkoplasmatischen Retikulum nach Permeabilisierung des Sarkolemm zu demonstrieren, wurden die gehäuteten Zellen mit Rhodamin-gekoppeltem ($1 \mu\text{M}$) S100A1-Protein für eine Dauer von 1 Minute inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal gespült. Es zeigte sich eine intrazelluläre Anreicherung des Proteins nach fluoreszenzoptischer Anregung des Farbstoffs (Extinktion 550 nm) (Abb.3.5a-c).

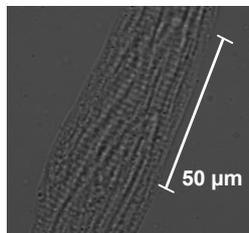


Abb.3.5a

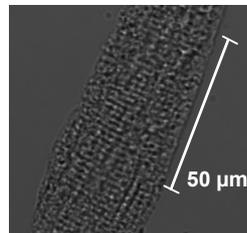


Abb.3.5b

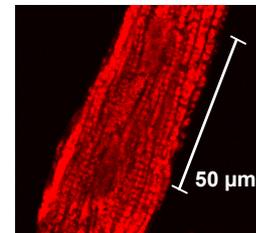


Abb.3.5c

Abb.3.5a-c: Ausschnitt eines repräsentativen adulten Kardiomyozyten (40fache Vergrößerung)

Abb.3.5a: direkt nach der Isolation

Abb.3.5b: nach Permeabilisierung mit β -escin

Abb.3.5c: mit Rhodamin gekoppeltem S100A1

Unter stärkerer Vergrößerung lässt sich erkennen, dass es zu einer gleichmäßigen, intrazellulären Verteilung des zugeführten Proteins unter Aussparung des Zellkerns gekommen ist (Abb. 3.5c).

3. Ergebnisse

3.6 Fluoreszenzoptische Darstellung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme in permeabilisierte Kardiomyozyten

Nach Dokumentation der intrazellulären Aufnahme von S100A1-Protein in die gehäuteten Kardiomyozyten wurde der Einfluss des Proteins auf die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme bzw. Aktivität der SERCA untersucht. Die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme wurde fluoreszenzoptisch indirekt durch die Messung der Abnahme der zytosolischen Kalziumkonzentration bestimmt. Da die Abnahme der Fluoreszenz innerhalb des Systems direkt proportional zur Abnahme der freien Kalziumkonzentration verläuft, ließ sich das registrierte Fluoreszenzsignal als Abnahme der freien Kalziumkonzentration entsprechend der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) der untersuchten Kardiomyozyten definieren. Im verwendeten System zeigte sich eine charakteristische fluoreszenzoptische Darstellung der Kalziumabnahme über die Zeit mit einem raschen Anstieg der freien Kalziumkonzentration direkt nach Kalziumaddition und darauffolgend einer kontinuierlichen Abnahme bis zum *steady-state* (engl.), welches leicht über Null lag.

Um eine Pufferung von Kalzium durch das Protein S100A1 auszuschließen, wurde zusätzlich ein synthetisches S100A1-Peptidmodell verwendet, das keine Kalziumbindungsdomänen enthält. Die synthetisierten Peptide setzen sich aus der zentralen Linkerregion (*hinge-region*), die die beiden kalziumbindenden Loops des S100A1-Proteins verbindet, und dem C- sowie N-terminalen Ende zusammen. Dabei repräsentieren die synthetischen Oligopeptide diejenigen Regionen des Proteins, die für die Interaktion des nativen Proteins mit seinen Zielproteinen verantwortlich gemacht werden.

Die Untersuchungen zur Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum der β -escin gehäuteten Kardiomyozyten der Ratte und des Kaninchens unter S100A1 wurden jeweils in einer Konzentration von 1 μ M sowohl des nativen Proteins als auch der synthetisierten Oligopeptide nach einer durchschnittlichen Präinkubationszeit von 1 Stunde durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.7 Basalmessungen und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

Zunächst fanden an den gehäuteten Kardiomyozyten des Kaninchens und der Ratte Basalmessungen ohne Zugabe von S100A1 statt, um das System zu charakterisieren (Abb.3.6). Durch Zugabe entsprechender Kalziumlösungen mit definierten Kalziumkonzentrationen erfolgte die Kalibrierung des Systems durch Bestimmung von R_{\min} und R_{\max} , die nach Fabiato und Fabiato (1979 und 1988) berechnet wurden. Anhand dieser Daten wurde später das Fluoreszenzsignal in Kalzium umgerechnet, wobei diese Werte für die spätere Auswertung der gewonnenen Daten notwendig waren. Dabei entspricht R_{\min} einer minimalen und R_{\max} einer maximalen Sättigung des Fura-2-Farbstoffes mit Kalzium.

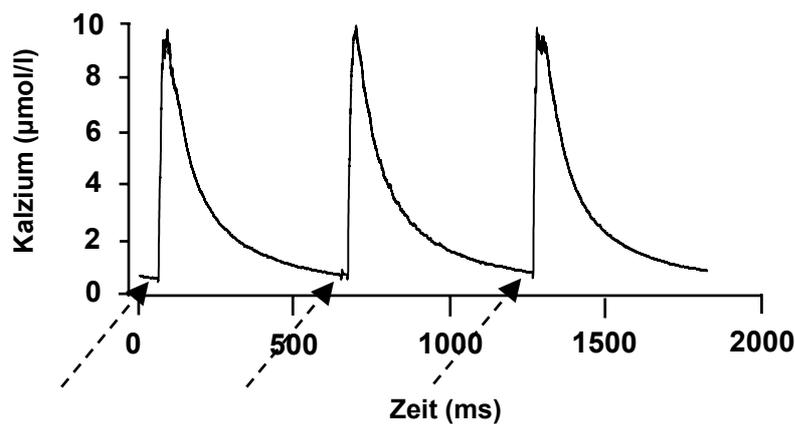


Abb.3.6

Abb.3.6: Originalaufzeichnung der Kalziumsequestration in das sarkoplasmatische Retikulum

Darstellung der repetitiven Kalziumaufnahme über die Zeit. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der additionalen Kalziumzugabe vom 10 μl (100 mM Stock). Durch das intrasarkoplasmatisch angereicherte Oxalat mit Ausbildung von Ca-Ox-Komplexen nach Aufnahme von Kalzium in das SR, kommt es zu reproduzierbaren, gleichförmig verlaufenden Kurvenverläufen.

3. Ergebnisse

3.8 Messung der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum des Kaninchens unter S100A1-Stimulation

3.8.1 1 μ M natives Protein S100A1

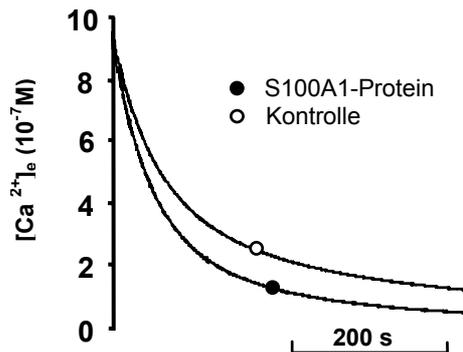


Abb.3.7a

Abb.3.7a

Repräsentative Darstellung der gemessenen Kalziumaufnahme über die Zeit nach einstündiger Präinkubation mit 1 μ M nativem S100A1-Protein im Vergleich zur Kontrolle (Kaninchen).

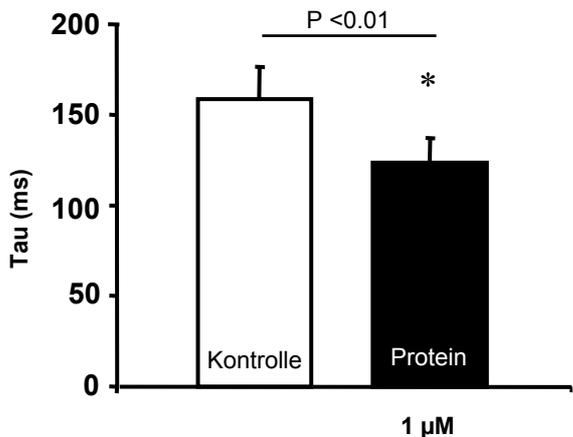


Abb.3.7b

Abb.3.7b

Darstellung der gemittelten Tauwerte (in ms) der durchgeführten Versuche (n=5) im Vergleich zur Kontrolle. Unter S100A1-Protein zeigte sich eine signifikante Steigerung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme im Vergleich zur Kontrolle von 28,73%, $p < 0.01$.

Abb. 3.7a zeigt exemplarisch die Veränderung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme unter Einflussnahme von S100A1-Protein. Deutlich ist die unter 1 μ M nativem S100A1-Protein auftretende beschleunigte Abnahme der freien zytosolischen Kalziumkonzentration zu erkennen, die einer Aufnahme des Kalziums in das sarkoplasmatische Retikulum der untersuchten Kaninchenkardiomyozyten entspricht.

Abb. 3.7b entspricht einer graphischen Darstellung der Mittelwertes der gemessenen Tauwerte der Kontrolle ($157,47 \pm 34,77$ ms) im Vergleich zu 1 μ M S100A1-Protein ($122,32 \pm 27,01$ ms). Im Vergleich zur Kontrolle ist eine signifikante Steigerung der intrasarkoplasmatischen Kalziumaufnahme um 28,73% ($p < 0.01$) zu beobachten.

3. Ergebnisse

3.8.2 1 μM S100A1 Oligopeptide (N, C, H)

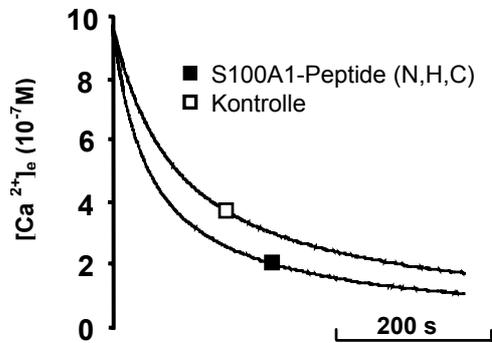


Abb.3.8a

Abb.3.8a

Repräsentative Darstellung der gemessenen Kalziumaufnahme über die Zeit nach einstündiger Präinkubation mit 1 μM Peptiden (N,C,H) im Vergleich zur Kontrolle (Kaninchen).

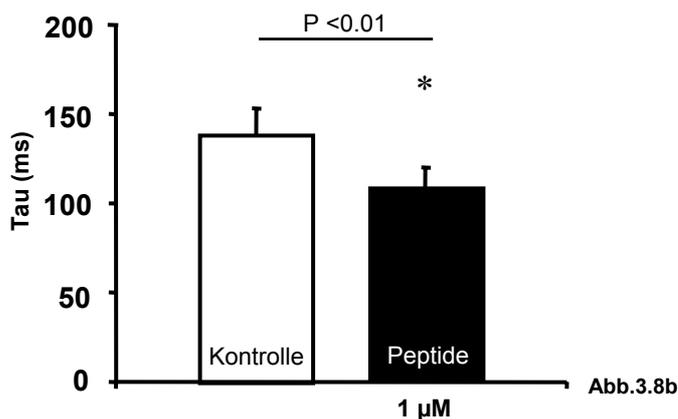


Abb.3.8b

Abb.3.8b

Darstellung der gemittelten Tauwerte (in ms) der durchgeführten Versuche (n=6) im Vergleich zur Kontrolle. Unter S100A1-Protein zeigte sich eine signifikante Steigerung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme im Vergleich zur Kontrolle von 28,37 %, $p < 0.01$.

Insgesamt wurden $n = 6$ Versuche zur Darstellung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme an gehäuteten Kardiomyozyten des Kaninchens durchgeführt, nachdem sie mit den S100A1 Peptiden des N- (N) und C- (C) terminalen Endes sowie der Hinge-Region (H) präinkubiert worden waren. Abb. 3.8a demonstriert den charakteristischen Zeitverlauf der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme mit einer beschleunigten Aufnahme des zugegebenen Kalziums unter 1 μM der eingesetzten Peptide gegenüber der Kontrolle. Abb.3.8b stellt in graphischer Form den Mittelwert der gemessenen Tauwerte unter S100A1 ($138,58 \pm 32,96$ ms) und der Kontrolle ($107,94 \pm 25,67$) dar. Nach Mittelung und Darstellung der gemessenen Tauwerte ergibt sich dabei eine Steigerung um 28,37% mit einer Signifikanz von $p < 0.01$.

3. Ergebnisse

3.9 Messung der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum der Ratte unter S100A1-Stimulation

3.9.1 1 μ M natives S100A1 Protein

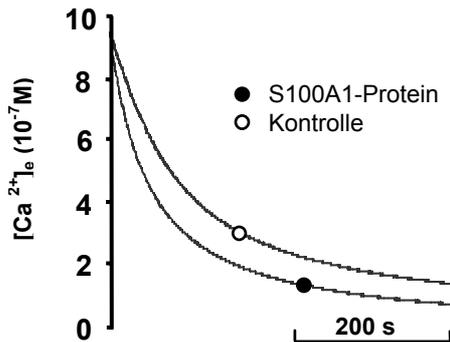


Abb.3.9a

Abb.3.9a

Repräsentative Darstellung der gemessenen Kalziumaufnahme über die Zeit nach einstündiger Präinkubation mit 1 μ M Protein S100A1 im Vergleich zur Kontrolle (Ratte).

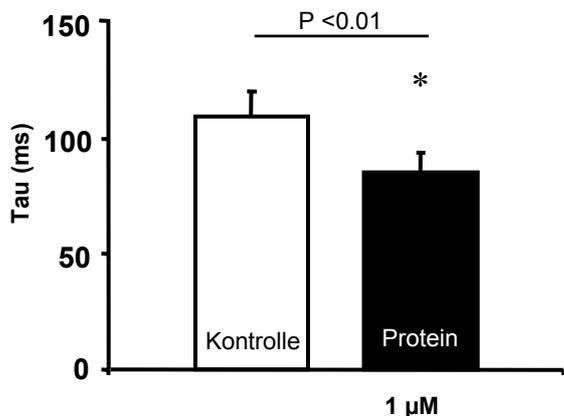


Abb.3.9b

Abb.3.9b

Darstellung der gemittelten Tauwerte (in ms) der durchgeführten Versuche (n=5) im Vergleich zur Kontrolle. Unter S100A1-Protein zeigte sich eine signifikante Steigerung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme im Vergleich zur Kontrolle von 28,32%, $p < 0.01$.

In Anlehnung an die bereits geschilderten Experimente zur Messung der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum gehäuteter Kaninchenkardiomyozyten wurde ebenfalls eine Beeinflussung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme unter S100A1-Stimulation an isolierten, gehäuteten Kardiomyozyten der Ratte untersucht. Nach Präinkubation mit 1 μ M S100A1 in Form des nativen Proteins zeigte sich vergleichbar wie bei Kaninchenkardiomyozyten (Abb.3.9a) eine gesteigerte sarkoplasmatische Kalziumaufnahme. Nach Mittelung der gemessenen Tauwerte zeigt sich unter 1 μ M nativem Protein S100A1 ($109,26 \pm 21,29$ ms) gemäß Abb. 3.9b eine signifikante

3. Ergebnisse

Steigerung der intrasarkoplasmatischen Kalziumaufnahme um 28,32% im Vergleich zur Kontrolle (85,36±16,63ms).

3.9.2 1 μ M S100A1 Oligopeptide (N, C, H)

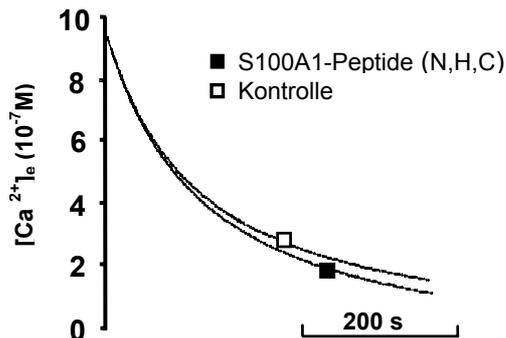


Abb.3.10a

Repräsentative Darstellung der gemessenen Kalziumaufnahme über die Zeit nach einstündiger Präinkubation mit 1 μ M Oligopeptiden (N,C,H) S100A1 im Vergleich zur Kontrolle (Ratte).

Abb.3.10a

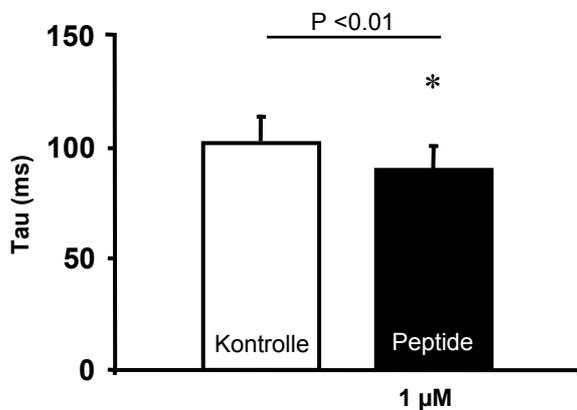


Abb.3.10b

Abb.3.10b

Darstellung der gemittelten Tauwerte (in ms) der durchgeführten Versuche (n=5) im Vergleich zur Kontrolle. Unter S100A1-Protein zeigte sich eine signifikante Steigerung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme im Vergleich zur Kontrolle von 13,52 %, $p < 0.03$.

Auch bei Verwendung der drei synthetischen Oligopeptide (N, C, H), die stellvertretend für das Gesamtprotein an den isolierten, gehäuteten Kardiomyozyten der Ratte eingesetzt wurden, konnte eine Stimulation der Kalziumsequestration durch eine gesteigerte Abnahme der freien Kalziumkonzentration im Messsystems aufgezeigt werden (Abb.3.10a). Unter Berücksichtigung der gemittelten Daten ergibt sich ebenfalls eine signifikante ($p < 0.03$) Beeinflussung der Kalziumaufnahme unter 1 μ M S100A1-Oligopeptiden (85,28±28,34) von 13,52% gegenüber der Kontrolle (96,81±32,18), wie in Abb. 3.10b dargestellt.

3. Ergebnisse

3.10 Steigerung der Ca^{2+} -abhängigen SERCA2a-Aktivität im Kaninchen und in der Ratte unter S100A1-Stimulation

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellzahl und der Zeit konnte die Kalziumaufnahme pro Zeiteinheit bzw. die Aktivität der sarko(endo)plasmatischen Kalziumpumpe (SERCA) pro Zelle berechnet werden.

3.10.1 Kaninchen

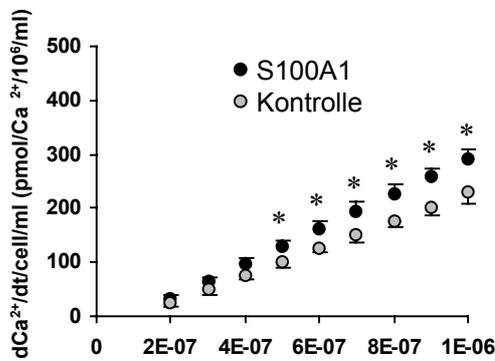


Abb.3.11a

Abb.3.11a

Berechnete Steigerung der Ca^{2+} -abhängigen SERCA2a-Aktivität im Kaninchen unter 1 μM nativem Protein S100A1 im Vergleich zur Kontrolle (n=8).

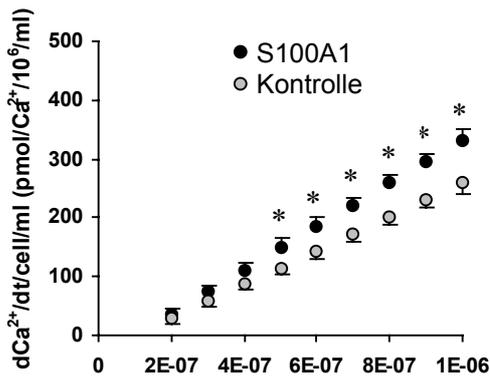


Abb.3.11b

Abb.3.11b

Berechnete Steigerung der Ca^{2+} -abhängigen SERCA2a-Aktivität im Kaninchen unter 1 μM S100A1-Oligopeptiden (N, H, C) im Vergleich zur Kontrolle (n=8).

3. Ergebnisse

3.10.2 Ratte

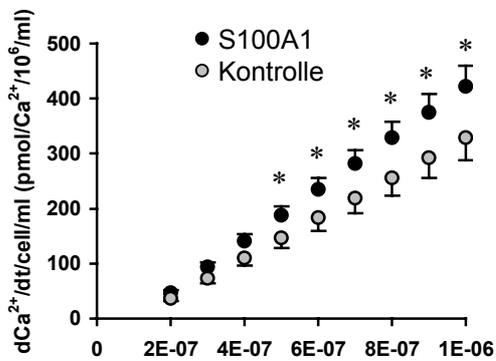


Abb.3.12a

Abb.3.12a

Berechnete Steigerung der Ca²⁺-abhängigen SERCA2a-Aktivität in der Ratte unter 1 µM nativem Protein S100A1 im Vergleich zur Kontrolle (n=8).

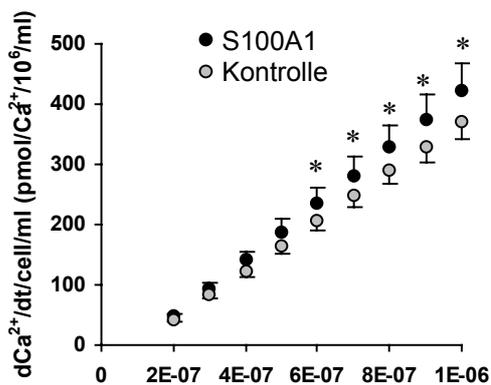


Abb.3.12b

Abb.3.12b

Berechnete Steigerung der Ca²⁺-abhängigen SERCA2a-Aktivität in der Ratte unter 1µM S100A1-Oligopeptiden (N, H, C) im Vergleich zur Kontrolle (n=8).

Abb.3.11a-b und Abb. 3.12a-b zeigen die berechnete sarkoendoplasmatische Kalziumaufnahme im Kaninchen und in der Ratte unter S100A1-Stimulation. Gezeigt werden sowohl S100A1-Protein als auch S100A1-Oligopeptide jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Veranschaulicht wird in dieser Darstellung die kalziumabhängige Aktivität der SERCA, die sich unter zunehmenden Kalziumkonzentrationen steigert und zu einer gesteigerten Kalziumaufnahme in das SR führt.

1µM S100A in Form des nativen Proteins und in Form der Oligopeptide (N,C,H) führten jeweils zu einer gesteigerten sarkoplasmatische Kalziumaufnahme pro Zelle - repräsentativ für eine gesteigerte SERCA2a-Aktivität (Abb.3.11a-b). Diese Beobachtung zeigte sich ebenfalls in

3. Ergebnisse

Kardiomyozyten der Ratte, die zuvor entweder mit 1 μM nativem Protein S100A1 oder mit 1 μM der Oligopeptide (N,H,C) präinkubiert worden waren, gegenüber der Kontrolle (Abb.3.12a-b). In Kardiomyozyten der Ratte ließ sich außerdem eine insgesamt erhöhte Gesamtaktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase im Vergleich mit Kaninchenkardiomyozyten beobachten.

Bezogen auf die Einzelzelle ergibt sich damit eine signifikante Steigerung der kalziumabhängigen Aktivität bei den mit S100A1 stimulierten Kardiomyozyten, wobei sich kein Unterschied zwischen den Effekten des nativen Proteins und der Oligopeptide zeigt.

3.11 Präparation sarkoplasmatischer Membranvesikel aus dem Skelettmuskel der Ratte

Die Herstellung sarkoplasmatischer Membranvesikel-Fractionen nach dem Protokoll von Chu et al. (1988) lieferte eine Proteinausbeute von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Volumen. Im Westernblot ließ sich nachweisen, dass das endogen exprimierte Protein S100A1 vollständig im Überstand der Präparation verblieb und kein natives Protein in der Vesikel-Fraktion mehr enthalten war.

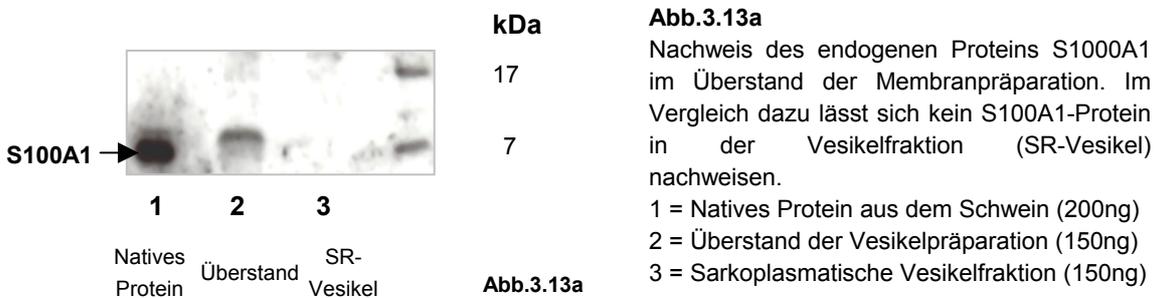
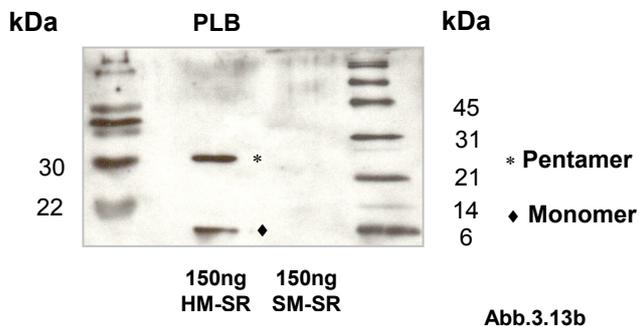


Abb. 3.13a reflektiert die Proteinanalyse als Qualitätskontrolle der gewonnenen Rohmembranvesikel-Fractionen. Als Positivkontrolle diente natives S100A1-Protein aus dem Myokard des Schweins. Durch den Nachweis, dass sich kein endogenes Protein S100A1 innerhalb der sarkoplasmatischen Membranfraktionen fand, konnte eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch eine physiologische Kontamination mit endogenem Protein ausgeschlossen werden.

3. Ergebnisse



Im Western Blot (Abb. 3.13b) der gewonnenen Membranvesikelfractionen zeigte sich, wie erwartet, dass Phospholamban lediglich in den Membranvesikeln des Herzmuskels, nicht hingegen im Skelettmuskel nachzuweisen war. Aufgrund dieser Konstellation konnte eine Interaktion zwischen PLB und der SERCA1 im schnellen Skelettmuskel ausgeschlossen werden.

3.12 Messung der Kalziumaufnahme in SR-Membranvesikel des Skelettmuskels der Ratte

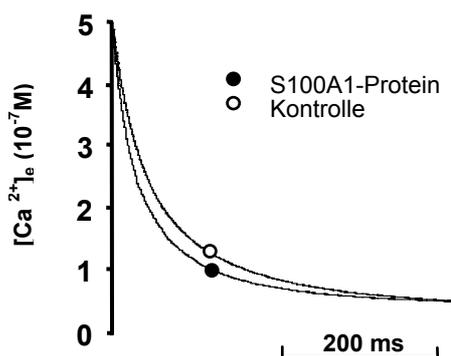


Abb.3.14a

3. Ergebnisse

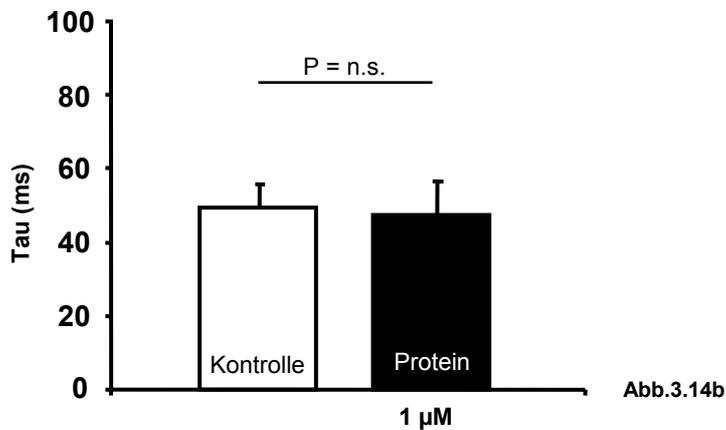


Abb.3.14b

Darstellung der gemittelten Tauwerte (in ms) der durchgeführten Versuche (n=5) im Vergleich zur Kontrolle. Unter S100A1-Protein zeigt sich keine signifikante Steigerung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme im Vergleich zur Kontrolle (p = n.s.).

Die Untersuchung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme an präparierten Membranvesikeln aus dem schnellen Skelettmuskel (*M. extensor digitorum longus*) erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Smith et al. (2000), das Experimente an isolierten Kardiomyozyten des Kaninchens und der Ratte beschreibt. Es zeigt sich, dass nach einstündiger Inkubation mit 1 µM nativem S100A1-Protein die Kalziumaufnahme in die sarkoplasmatischen Membranvesikel gesteigert werden konnte (Abb. 3.14a). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war dies statistisch jedoch nicht signifikant, wie in Abb. 3.14b dargestellt ist.

4. Diskussion

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einfluss des kalziumbindenden Proteins S100A1 auf die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme bzw. Aktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA) im quergestreiften Muskel zu untersuchen. Die positiv inotrope Wirkung von S100A1 (Most et al., 2003a) sowie die zentrale Rolle der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA) im Herz- und Skelettmuskel bildeten hierbei den Ausgangspunkt der durchgeführten Studie, die im Wesentlichen auf einer fluoreszenzoptischen Messung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme basierte (Smith et al., 2000).

4.1 Charakterisierung von S100A1-Protein und -Peptiden

Um funktionellen Effekte von S100A1 auf die SR-Kalziumaufnahme zu untersuchen, wurde natives Protein S100A1 aus linksventrikulärem Schweinemyokard aufgereinigt und dessen Reinheitsgrad mit Hilfe einer hochsensitiven Silberfärbung dokumentiert, während die Spezifität des Proteins durch einen Western Blot unter Verwendung eines spezifischen S100A1-Antikörpers nachgewiesen werden konnte. Diese Methodik wurde gewählt, da kommerziell erhältliches S100A1-Protein aus zerebralem Gewebe aufgereinigt wird und relevante Kontaminationen mit anderen, neuronal exprimierten S100 Proteinen (z.B. S100B) enthält (unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe PD Dr. Remppis). Aufgrund der Kontamination dieser Proben sind deshalb spezifische Untersuchungen zum isolierten Effekt von S100A1 nicht möglich.

Trotz Berücksichtigung der kalziumbindenden Eigenschaften von S100A1 bei Berechnung der notwendigen EGTA-Menge zur Pufferung der freien Kalziumkonzentration (Fabiato und Fabiato, 1979) wurde eine zusätzliche Untersuchung der SR-Kalziumaufnahme unter Verwendung eines synthetischen S100A1 Peptidmodells durchgeführt, für das bereits äquivalente Effekte im Vergleich zum nativen Protein gezeigt werden konnten (Most et al., 1999). Unter Berücksichtigung der dreidimensionalen Struktur der S100-Proteine wurden die EF-Hand-Kalziummotive gezielt eliminiert und nur diejenigen Bereiche der Primärstruktur für die Synthese ausgewählt, die aufgrund der Oberflächenanalyse des Moleküls für eine Interaktion mit Zielproteinen in Frage kommen (Drohat et al., 1998). Das Modell aus drei S100A1-Oligopeptiden umfasste etwa 45% der Primärsequenz des nativen Proteins. Der entsprechende Nachweis der korrekten Peptidmasse bzw. -sequenz wurde von der Fa. Eurogentec mit Hilfe der *time-lag focusing* (TLF) *time of flight*

4. Diskussion

(TOF) *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) Methode bzw. der *high performance liquid chromatographie* (HPLC) in Kombination mit einem Edmann-Abbau erbracht. Um die Reinheit der kommerziell gelieferten Peptide zu testen, wurde im Anschluss eine Silberfärbung der S100A1- Oligopeptide durchgeführt. Mit Hilfe dieser Charakterisierungen konnte daher die Reinheit bzw. die strukturelle Integrität der Proteine bzw. Peptide als wesentliche Voraussetzung zur weiteren Verwendung in den funktionellen Experimenten nachgewiesen werden.

4.2 Steigerung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme im Herzmuskel durch das Ca²⁺-bindende Protein S100A1

Um den Einfluss von S100A1 auf die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme bzw. SERCA2a-Aktivität im Myokard zu untersuchen, wurde eine fluoreszenzoptische Messung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme in sarkolemmal permeabilisierte Herzmuskelzellen verwendet. Hierfür wurden ventrikuläre Herzmuskelzellen enzymatisch isoliert und die äußere Zellmembran durch den Gebrauch von β -escin selektiv permeabilisiert. Die derartig hervorgerufene Porenbildung in der äußeren Zellmembran ermöglichte somit einen freien Zugang von Makromolekülen in das Zellinnere bzw. einen freien Zugang von S100A1 zum SR. Der unter dem Begriff der „Häutung“ bekannte Prozess beruht auf einer sarkolemmalen Porenbildung durch Komplexbildung der Cholesterinmoleküle. Aufgrund des hohen Gehaltes an Cholesterinmolekülen in der Zellmembran im Gegensatz zur geringen Cholesterinkonzentration in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) wurde auf diese Weise eine spezifische Permeabilisierung der Zellmembran erreicht, ohne die Funktion und Struktur des sarkoplasmatischen Retikulums wesentlich zu beeinflussen (Thelestam und Mollby, 1979). Der damit verbundene Verlust der strukturellen Integrität der äußeren Zellbarriere und des Zytosols erforderte die Suspension der isolierten Herzmuskelzellen in einer Lösung, die aufgrund ihrer ionalen Zusammensetzung das Intrazellulärmilieu imitiert - sog. (*Mock-*) *Lösung* (engl.). Der Zusatz eines ATP regenerierenden Systems (Kreatinkinase/ Kreatinphosphat) verhinderte einen Abfall der energiereichen Phosphate. Der mikroskopische Vergleich der frisch isolierten Zellen vor und nach Permeabilisierung zeigte, dass sich die Zellmorphologie durch das *Skinnen* nicht verändert hatte. Dieser Umstand dokumentierte, dass eine funktionelle Beeinflussung der zellulären Kalziumregulation, die sich in einer Kontraktur der Zellen gezeigt hätte, nicht stattgefunden hatte. Um eine Inhibition der SERCA-

4. Diskussion

Aktivität durch einen Anstieg der freien intrasarkoplasmatischen Kalziumkonzentration zu vermeiden, wurde der Kalziumkomplexbildner Oxalat eingesetzt, der über einen speziellen, nicht weiter differenzierten Transporter die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums passiert und sich dort spezifisch anreichert. Durch die nach Überschreiten des Löslichkeitsproduktes entstehenden Kalzium-Oxalatkomplexe innerhalb des Lumens im sarkoplasmatischen Retikulum wurde die Kalziumkonzentration künstlich niedrig gehalten.

Mit Hilfe der beschriebenen Methode war es möglich, erstmalig eine Beeinflussung der Funktion der kardialen SERCA-Isoform durch S100A1 nachzuweisen. Aufgrund der vergleichbaren SERCA2a-Pumpkinetik im Menschen und Kaninchen wurde die Studie an isolierten Kardiomyozyten des Kaninchens durchgeführt. Zudem fanden Experimente an adulten Kardiomyozyten der Ratte statt, die im Vergleich zum Kaninchen eine höhere SERCA-Pumpendichte im SR aufweisen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Aktivität der Kalziumtransport-ATPase (SERCA2a) unter Zugabe von 1 μM nativem S100A1-Protein in Kardiomyozyten des Kaninchens und in Kardiomyozyten der Ratte signifikant gesteigert wurde. Da die Permeabilisierung der Zellen mit einem weitgehenden Verlust des endogenen S100A1-Gehaltes einherging, kann daher die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Steigerung der SERCA2a-Aktivität bzw. der gemessenen Kalziumaufnahme spezifisch auf die exogene Zugabe des aufgereinigten Proteins zurückzuführen war. Im menschlichem Herzmuskelgewebe, ebenso wie im Kaninchen- und Schweinemyokard ist die sarko(endo)plasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) zu 60% - 70% an der diastolischen Kalziumsequestration beteiligt, der übrige Anteil wird über den Na-Ca-Austauscher (NCX) bzw. alternative Wege aus dem Zytosol entfernt. Im Vergleich dazu wird in der Ratte und der Maus mit 90% ein deutlich höherer Anteil des diastolischen Kalziumgehaltes während der Relaxationsphase in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) aufgenommen - als Folge einer deutlich höheren Gesamtaktivität der SERCA (Bers, 2000). Erklärt wird dieser Effekt durch Prozesse, die auf der Translationsebene stattfinden und über eine differentielle Expression letztendlich zu einer unterschiedlichen Dichte der Ca^{2+} -ATPase Moleküle in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) führen. Trotz einer höheren SR-Pumpendichte von 54,6 $\mu\text{mol/kg wet wt}$ im Rattenmyokard im Vergleich zum Kaninchen (7,7 $\mu\text{mol/kg wet wt}$) war der relative Anstieg der SR-Kalziumaufnahme in beiden Modellen nicht signifikant verschieden. Dies

4. Diskussion

könnte auf die Oxalatbeladung des sarkoplasmatischen Retikulums zurückzuführen sein, die eine schnellere kalziumabhängige Inhibition der SERCA im Rattenmyokard verhindert und somit differentielle Effekte von S100A1 möglicherweise kuptiert.

Neben der Beeinflussung der SERCA2a-Aktivität durch S100A1 könnte die gesteigerte SR-Kalziumaufnahme partiell jedoch auch durch eine Reduktion des *SR-leaks* im verwandten Modell erklärt werden. Dieses setzt sich zum einen aus der Spontanöffnung der Ryanodinrezeptoren, einem sogenannten SERCA *reverse mode* (engl.) und einer unspezifischen Durchlässigkeit der sarkoplasmatischen Lipidmembran zusammen. Hierbei wäre eine Zunahme der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme auch als Folge einer möglichen Reduktion der Spontanöffnung der Ryanodinrezeptoren durch S100A1 erklärbar. In dem gewählten Versuchsablauf konnte jedoch durch Zugabe von Ruthenium Red - einem spezifischen Inhibitor des Ryanodinrezeptors - dieser Bestandteil des Lecks bereits ausgeschaltet werden. In gleicher Weise könnte eine Beschleunigung der SR Kalziumaufnahme auch durch eine verminderte Aktivität des von Bers (1999) postulierten SERCA *reverse mode* hervorgerufen werden, bei dem ATP durch den Ausstrom von Kalzium aus dem SR durch die Kalziumpumpe gebildet wird. Aufgrund der hohen ATP-Konzentration in der *mock-solution* ist jedoch ein Auftreten dieses Effektes als unwahrscheinlich zu betrachten. Die Verminderung der unspezifischen Durchlässigkeit der SR-Lipidmembran durch S100A1 könnte ebenfalls zur Erklärung des beobachteten Effektes herangezogen werden. Jedoch erscheint ein solcher Mechanismus unter Berücksichtigung der geringen Größe des S100A1-Moleküls unwahrscheinlich. Zudem verhindert die bereits oben beschriebene Wirkung von Oxalat weitgehend einen *leak*-bedingten Verlust von Kalzium aus dem SR.

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen ist deshalb von einer gesteigerten Aktivität der SERCA2a durch S100A1 als Ursache der beschleunigten SR-Kalziumaufnahme auszugehen, zumal bislang kein weiterer Mechanismus der SR-Kalziumaufnahme bekannt ist. Ob es sich dabei um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt, muss in weiteren Experimenten überprüft werden. Neben einer potentiellen Modulation des SR Kalzium-*leaks* erfordert der mögliche Verlust endogener Modulatoren der SERCA-Aktivität durch Permeabilisierung der Zellwand eine Berücksichtigung im Rahmen der experimentell gewonnenen Daten. Die beschleunigte SR-

4. Diskussion

Kalziumaufnahme durch S100A1 in intakten Herzmuskelzellen könnte möglicherweise durch intrinsische Inhibitoren wiederum abgeschwächt bzw. aufgehoben werden.

Die gewonnenen Daten belegen somit erstmals die funktionelle Bedeutung der Befunde von Haimoto und Kato (1988), die eine Kollokalisierung von S100A1 mit dem longitudinalen SR beschrieben. Ebenso korreliert die Steigerung der Amplitude der Kalziumtransienten in S100A1 transfizierten Kardiomyozyten (Most et al., 2001; Remppis et al., 2002) mit einem erhöhten Kalziumgehalt des sarkoplasmatischen Retikulums infolge einer gesteigerten ATPase-Aktivität, wie die vorliegenden Ergebnisse belegen. Auch der beschleunigte Abfall der Transienten (Most et al., 2001, Remppis et al., 2002) ist mit einer Steigerung der SERCA-Aktivität vereinbar. Jedoch findet eine mögliche Aktivierung der Na-Ca-Austauscher-Aktivität durch S100A1 in der experimentellen Anordnung keine Berücksichtigung, die in intakten Herzmuskelzellen zusätzlich zu einer beschleunigten zytosolischen Kalziumelimination beitragen könnte.

4.3 Steigerung der SERCA2a-Aktivität im Herzmuskel durch synthetische S100A1-Oligopeptide

Um eine potentielle extrasarkoplasmatische Kalziumpufferung durch das Protein S100A1 ausschließen zu können, die ebenfalls zu einer beschleunigten sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme führen könnte, wurde ein synthetisches S100A1-Peptidmodell ohne Kalziumbindungsdomänen eingesetzt. Das Modell aus drei einzelnen S100A1-Peptiden umfaßt ca. 45% der Primärsequenz des nativen Proteins. Unter Berücksichtigung der dreidimensionalen Struktur der S100-Proteine wurden beide EF-Hand-Kalziummotive gezielt eliminiert und nur diejenigen Bereiche der Primärstruktur für die Synthese ausgewählt, die aufgrund der Oberflächenanalyse des Moleküls für eine Interaktion mit Zielproteinen in Frage kommen (Drohat et al., 1998; Osterloh et al., 1998). In Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec wurden die S100A1-Peptide unter Verwendung einer eigens dafür entwickelten Festphase synthetisiert.

Es zeigte sich, dass bei Verwendung des Peptidmodells in einem Konzentrationsbereich von 1 μM eine signifikante Steigerung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme in isolierte, permeabilisierte Kardiomyozyten des Kaninchens (um 28,32%) und der Ratte (um 13,52%) zu beobachten war. Wie frühere Studien bereits belegen waren die Effekte der Oligopeptide (N, H, C) denen des nativen Proteins gleichwertig (Most et al., 1999 und 2000). Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern,

4. Diskussion

dass die durch S100A1 hervorgerufenen Effekte an das Vorhandensein von mindestens einem der verwendeten Peptide gebunden sein müssen. Basierend auf dieser Beobachtung kann die für das native Protein beschriebene Wirkung in adulten Kardiomyozyten deshalb nicht auf einen kalziumpuffernden Effekt zurückgeführt, sondern muss als Folge einer Beschleunigung der SR-Kalziumaufnahme durch S100A1 angesehen werden. Die signifikante, jedoch geringere prozentuale Aktivitätssteigerung der Ca^{2+} -ATPase in Zellen der Ratte unter Einsatz der Peptide könnte vor dem Hintergrund der unterschiedlichen SERCA2a-Pumpendichte im Vergleich zum Kaninchen auf die fehlende Kalziumabhängigkeit der Peptidwirkung zurückgeführt werden. Darüberhinaus könnte dieses Ergebnis auch durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Einzelpeptide im Vergleich zum Gesamtprotein gedeutet werden.

4.4 Unveränderte Aktivität der skelettmuskulären SERCA1 durch S100A1-Protein und -Peptide

Aufgrund ihrer Größe (>1mm) waren isolierte Skelettmuskelfasern des Extensor digitorum longus (EDL) für die von Smith et al. (2000) etablierte Technik der fluoreszenzoptischen Messung der SERCA-Aktivität nicht geeignet. So wählten wir eine Modifikation der Methode, in der die Aktivität der SERCA1 an präparierten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums des EDL bestimmt wurde. Vor Versuchsbeginn konnte durch Proteinanalysen im Western Blot nachgewiesen werden, dass nach Präparation der sarkoplasmatischen Vesikelfraktion kein endogenes S100A1 Protein mehr in der Vesikelfraktion enthalten war. Damit konnte eine Beeinflussung der Untersuchungen durch endogenes S100A1 ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu den Wirkungen im Herzmuskel zeigte sich, dass die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme bzw. Aktivität der Ca^{2+} -ATPase (Isoform 1a) des schnell kontrahierenden Skelettmuskels unter dem Einfluss von nativem S100A1 Protein und den Oligopeptiden nicht beeinflusst wurde. Somit kann vor dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse gefolgert werden, dass die beobachtete Steigerung der isometrischen Kontraktionskraft im schnell zuckenden Skelettmuskel (Most et al., 2002) durch das Protein S100A1 nicht auf einer Veränderung der SERCA1a-Aktivität, sondern auf eine gesteigerte Kalziumfreisetzung über den Ryanodinrezeptor (Treves et al., 1997) zurückzuführen ist. Da die Präparation von SR-Membranvesikeln jedoch mit

4. Diskussion

einem Verlust an zytosolischen Modulatoren sowie der strukturellen Integrität der Zelle bzw. der mikroanatomischen SR-Architektur einhergeht, kann die ausbleibende Wirkung von S100A1 möglicherweise auch durch fehlende potentielle Kofaktoren (zytosolische Modulatoren/Struktur) erklärt werden.

4.5 Differentielle Effekte von S100A1 im Herz- und Skelettmuskel

In der Zusammenschau der Befunde weist sowohl das S100A1 Protein als auch das trunkierte Peptidmodell eine differentielle Beeinflussung der kardialen und skelettmuskulären SERCA-Isoformen auf.

Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Beeinflussung beider SERCA-Isoformen könnten zum Einen in der unterschiedlichen Primärsequenz beider Kalziumpumpen und zum Anderen in die auf SERCA2a beschränkte Regulation durch das inhibitorische Protein Phospholamban (PLB) zu suchen sein. Im unphosphorylierten Zustand vermindert es die SERCA2a-Aktivität, während diese Inhibition durch Proteinkinase A (PKA)-abhängige oder Kalzium/Calmodulin (CamKinase)-abhängige Phosphorylierung oder einen Anstieg der freien Kalziumkonzentration aufgehoben werden kann (Bluhm et al., 2000). Denkbar wäre hierbei eine direkte Interaktion von S100A1 mit SERCA2a bzw. eine disinhibitorische Bindung an Phospholamban, die zu einer Steigerung der SERCA2a-Aktivität führen könnte. Andererseits wäre eine phospholambanunabhängige, kalziuminduzierte Disaggregation der kardialen Ca^{2+} -Pumpe möglich, die ebenfalls mit einer Zunahme der SERCA2a-Aktivität einhergehen könnte. Unter Berücksichtigung der fehlenden Phospholambanexpression im schnellen Skelettmuskel könnte dieser Umstand die fehlende S100A1-Wirkung erklären. In gleicher Weise könnte aufgrund der unterschiedlichen Primärsequenzen beider SR-Kalziumpumpen ein fehlendes Bindungsmotiv für S100A1 in der SERCA1-Isoform als eine Erklärung für den ausbleibenden S100A-Effekt herangezogen werden. Darüberhinaus ergibt sich aus der Phospholambandefizienz im Skelettmuskel eine stetige maximale Pumpaktivität, die durch S100A1 gegebenenfalls nicht weiter steigerbar ist. Dies geht mit der physiologischen Funktion des schnell kontrahierenden Muskels einher, der im Gegensatz zum langsam kontrahierenden Herzmuskel keine phospholambanabhängige Regulation aufweist. Im Herzmuskel hingegen korrelieren die PLB-Expression und der hohe endogene S100A1 Gehalt mit der Möglichkeit, die SERCA-Aktivität zu regulieren.

4. Diskussion

4.6 Pathophysiologische Bedeutung von S100A1 im Herzmuskel

In den letzten Jahren konnte der Nachweis geführt werden, dass die Expressionshöhe von S100A1 mit der kontraktile Funktion des Herzens kausal korreliert. Während in einem Modell kompensierter myokardialer Hypertrophie eine signifikante Überexpression von S100A1 zu dokumentieren ist, zeigt sich im Myokard von Patienten mit transplantationspflichtiger Herzinsuffizienz eine signifikante Minderexpression dieses Ca^{2+} -bindenden Proteins (Remppis et al., 1996; Ehlermann et al., 2000). Untersuchungen an einem S100A1 transgenen Mausmodell konnten schließlich belegen, dass die Überexpression von S100A1 zu einer dauerhaften Steigerung der Herzfunktion führt, ohne die sonst mit einer positiv inotropen Therapie verknüpften toxischen Effekte auf das Myokard aufzuweisen (Most et al., 2003b). Diese Befunde legen daher nahe, dass die Manipulation der S100A1-Expression als neue therapeutische Option zur Behandlung der Herzinsuffizienz in greifbare Nähe gerückt ist.

Es gilt bereits seit längerem als allgemein akzeptiert, dass die verminderte Aktivität der SERCA (Ca^{2+} -ATPase des sarkoendoplasmatischen Retikulums), die beim Menschen den größten Beitrag zur diastolischen Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol leistet, im Rahmen der Herzinsuffizienz signifikant vermindert ist (Hasenfuss et al., 1994; Hasenfuss et al., 1997). International wird nach wie vor aufgrund widersprüchlicher klinischer Studien sehr kontrovers diskutiert, inwiefern die Aktivitätsminderung dieser wichtigen Ca^{2+} -Pumpe mit einer verminderten Proteinexpression der Pumpe selbst oder aber mit einer veränderten Regulation der Pumpe durch andere Proteine korreliert ist. Aufgrund der in dieser Arbeit präsentierten Daten kann nun erstmals schlüssig argumentiert werden, dass die beobachtete Minderaktivität der SERCA auch in einer veränderten Regulation von S100A1 begründet liegt, die bislang wegen methodischer Gründe übersehen wurde, da S100A1 bei allen verwendeten Membranreinigungsverfahren aufgrund der Verwendung von EDTA während der Präparation ausgewaschen wurde. Da nun belegt werden konnte, dass S100A1 in zwei unabhängigen Tiermodellen mit unterschiedlicher Ca^{2+} -Homöostase (Ratte, Kaninchen) die Aktivität der SERCA signifikant steigert, kann zudem die Hypothese formuliert werden, dass eine Manipulation der S100A1-Expression ebenso wie eine Überexpression von SERCA eine grundlegende Therapie der Herzinsuffizienz darstellen könnte, da hiermit ein zentraler pathophysiologischer Mechanismus der Herzinsuffizienz korrigiert wird.

4. Diskussion

4.7 Physiologische Bedeutung von S100A1 im Skelettmuskel

Im quergestreiften Skelettmuskel werden zwei verschiedene Fasertypen unterschieden: die langsam zuckenden Typ I Fasern und die schnellen Typ II Zuckungsfasern. Für S100A1 ist bekannt, dass der endogene Gehalt im schnellen Skelettmuskel dreifach niedriger ist als der im langsamen Skelettmuskel. Diese Änderung des Expressionsniveaus findet bei der Differenzierung des schnell kontrahierenden Skelettmuskels statt. Nach ca. 21 Tagen der Entwicklung präsentiert sich ein deutlich reduzierter S100A1 mRNA-Gehalt im schnell kontrahierenden Skelettmuskel, wohingegen die Expression im langsam kontrahierenden Sklettmuskel unverändert bleibt (Zimmer, 1991).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der sarko(endo)plasmatischen Ca^{2+} -ATPase des schnell kontrahierenden Skelettmuskel unter dem Einfluss des kalziumbindenden Proteins S100A1 nicht verändert wird.

Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass sich aufgrund der geringen endogenen S100A1-Expression eine Interaktion mit der SERCA1a nicht demaskiert oder aber, dass aufgrund von strukturellen Eigenschaften, wie beispielsweise der Phospholambandefizienz im schnell kontrahierenden Skelettmuskel, keine Interaktion zwischen der SERCA-Isoform des schnell kontrahierenden Skelettmuskels und S100A1 stattfindet. Dieser Punkt scheint von besonderem Interesse vor dem Hintergrund, dass sich nicht nur das S100A1-Expressionsniveau während der Differenzierung vom neonatalen zum adulten Stadium, sondern auch die spezifische Expression der SERCA-Isoformen im schnell kontrahierenden Skelettmuskel verändern. So konnte gezeigt werden, dass in der Neonatalzeit die SERCA-Isoform 2a exprimiert wird und im Laufe der Entwicklung durch die Isoform 1a ersetzt wird, die nicht durch das Phosphoprotein Phospholamban moduliert wird (Yong et al., 1999).

Die vorliegende Studie zeigt somit, dass die physiologische Bedeutung von S100A1 für die Kontraktilität des schnell kontrahierenden Skelettmuskels weniger im Zusammenhang mit einer Modulation der SERCA zu sehen ist. Vielmehr unterstützen die vorliegenden Daten die These, dass, unter dem Aspekt der nachgewiesenen Kollokalisierung von S100A1 mit dem SR, der dokumentierte positive Effekt von S100A1 auf den kontraktilen Status des schnell zuckenden Skelettmuskels im Wesentlichen über eine Interaktion von S100A1 mit dem Ryanodin-Rezeptor zu erklären ist, wie in der Literatur bereits vermutet wurde (Zimmer 1991; Treves et a.l, 1997; Most et

4. Diskussion

al., 2003a). Infolge dieser Interaktion wird die Kontraktilität im schnell kontrahierenden Skelettmuskel durch S100A1 über die erhöhte Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum via Ryanodin Rezeptor reguliert, indem durch das konsekutiv erhöhte intrazelluläre Kalziumangebot die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der SERCA verstärkt wird.

5. Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Das kalziumbindende Protein S100A1 wird spezifisch im quergestreiften Muskel exprimiert und steigert die Kontraktionskraft im Herz- und Skelettmuskel. Unklar ist jedoch bislang, über welche Mechanismen das Protein S100A1 seine Effekte entfaltet.

Aufgrund der Kolo-kalisation von S100A1 mit dem longitudinalen sarkoplasmatischen Retikulum im quergestreiften Muskel und der zentralen Funktion der SERCA in der Regulation der Muskelkraft bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, die Beeinflussung der Aktivität der SERCA im Herz- und Skelettmuskel durch S100A1 zu untersuchen. Mit Hilfe fluoreszenzoptischer, biophysikalischer Methoden wurde deshalb der Einfluss von S100A1-Protein und einem synthetischen S100A1-Peptidmodell auf die Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum von Herz- und Skelettmuskel bestimmt.

Mit Hilfe der beschriebenen Methodik konnte erstmalig gezeigt werden, dass das kalziumbindende Protein S100A1 ebenso wie eine äquimolare Mischung aus synthetisch hergestellten Peptiden des N- und C-terminalen Endes sowie der zentralen *hinge-region* (engl.) die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme in zellulären Herzmuskelpräparaten der Ratte und des Kaninchens signifikant steigert. Im Gegensatz hierzu konnte eine Beeinflussung der sarkoendoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase im Skelettmuskel mit der dargestellten Methodik ausgeschlossen werden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass S100A1 eine differentielle Wirkung auf die verschiedenen SERCA-Isoformen des quergestreiften Muskels entfaltet.

Vor dem Hintergrund der positiv inotropen und lusitropen Wirkung von S100A1 im Herzmuskel (Most et al., 2003) unterbreitet die Beschleunigung der sarkoplasmatischen Kalziumaufnahme durch S100A1 einen molekularen Ansatz zum Verständnis dieser Wirkungen, da die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme direkt die Relaxationsgeschwindigkeit (lusitroper Effekt) und der sarkoplasmatische Kalziumgehalt indirekt die Kontraktilität (inotroper Effekt) bestimmt.

Somit war es erstmalig möglich, dem morphologischen Befund der Kolo-kalisation von S100A1 mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) eine physiologische Bedeutung zuzuordnen und die Bedeutung von S100A1 als einen zentralen Regulator der muskulären Funktion weiter zu erhärten.

6. Literaturverzeichnis

6. Literaturverzeichnis

Albrecht S, Zimmermann T, Brandl H, Saeger HD, Distler W: Chemilumineszenz am Rande der Jahrtausendwende – von der Jahrmarktskuriosität zum unentbehrlichen Werkzeug der Laboratoriumsdiagnostik. *J Lab Med* 21, 191-204 (1997)

Adhikari BB und Wang K: S100A1 modulates skeletal muscle contraction by desensitizing calcium activation of isometric tension, stiffness and ATPase. *FEBS Letters* 497, 95-98 (2001)

Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 74, 555-564 (1994)

Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R, Donato R: Annexin V, annexin VI, S100A1 and S100B in developing and adult avian skeletal muscles. *Neuroscience* 109, 371-388 (2002)

Autry JM und Jones LR: Functional co-expression of the canine cardiac Ca^{2+} pump and phospholamban in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells reveals new insights on ATPase regulation. *J Biol Chem* 272, 15872-15880 (1997)

Baker DL, Hashimoto K, Grupp IL, Ji Y, Reed T, Loukianov E, Grupp G, Bhagwat A, Hoit B, Walsh R, Marban E, Periasamy M: Target overexpression of the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} - ATPase Increases Cardiac Contractility in Transgenic Mouse Hearts. *Circ Res* 83, 1205-1214 (1998)

Baudier J und Gerard D: Ions binding to S100 proteins. II. Conformational studies and calcium-induced conformational changes in S100 alpha alpha protein: the effect of acidic pH and calcium incubation on subunit exchange in S100a (alpha beta) protein. *J Biol Chem* 261, 8204-8212 (1986)

Bers DM und Bridge JHB: Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity. *Circ Res* 65, 334-342 (1989)

6. Literaturverzeichnis

Bers DM und Perez-Reyes E: Ca^{2+} channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release. *Cardiovasc Res* 42, 339-60 (1999)

Bers DM: Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. *Circ Res* 87, 275-281 (2000)

Berchthold MW, Brinkmeier H, Müntener M: Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. *Physiological Reviews* 80, 1216-1251 (2000)

Bluhm WF, Kranias EG, Dillmann WH, Meyer M: Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H249-H255 (2000)

Bootman MD und Berridge MJ: The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83, 675-678 (1995)

Brandl CJ, Green NM, Korczak B, MacLennan: Two Ca^{2+} -ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* 44, 597-607 (1986)

Burk SE, Lytton J, MacLennan DH: cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca^{2+} pump. *J Biol Chem* 264, 18561-18568 (1989)

Cantilina T; Sagara Y, Inesi G: Comparative studies of cardiac and skeletal sarcoplasmic reticulum ATPase. *J Biol Chem* 268, 17018-17025 (1993)

Carafoli E: Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem.* 56, 395-433 (1987)

Chu A, Dixon MC, Saito A, Seiler S, Fleischner S: Isolation of sarcoplasmic reticulum fractions referable to longitudinal tubules and junctional terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. *Methods in Enzymologie* 157, 36-46 (1988)

6. Literaturverzeichnis

Clapham DE: Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature* 22, 634-635 (1995)

Colyer J und Wang JH: Dependence of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump Activity on the Phosphorylation Status of Phospholamban. *J Biol Chem* 266, 17486-17493 (1991)

Davia K, Hajjar RJ, Terracciano N, Kent NS, Ranu HK, O`Gara P, Rosenzweig A, Harding SE: Functional alterations in adult rat myocytes after overexpression of phospholamban with use of adenovirus. *Physiol Genomics* 1, 41-50 (1999)

De Meis L und Vianna AL: Energy interconversion by the Ca^{2+} dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 48, 275-292 (1979)

Dillmann WH: Calcium regulatory proteins and their alteration by transgenic approaches. *Am J Cardiol* 83, H89-H91 (1999)

Donato R: Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1450, 191-231 (1999)

Drohat AC, Baldisseri DM, Rustandi RR, Weber DJ: Solution structure of calcium-bound rat S100B (beta beta) as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 37, 2729-2740 (1998).

Du XJ, Cole TJ, Tennis N, Gao XM, Kontgen F, Kemp BE, Heierhorst J: Impaired cardiac contractility response to hemodynamic stress in S100A1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 22, 2821-2829 (2002).

Ehlerman P, Remppis A, Most P, Bernotat J, Heizmann CW, Katus HA: Purification of the Ca^{2+} -binding protein S100A1 from myocardium and recombinant *Escherichia coli*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 737, 39-45 (2000)

6. Literaturverzeichnis

Ehlermann P, Remppis A, Guddat O, Weimann J, Schnabel PA, Motsch J, Heizmann CW, Katus HA: Right ventricular upregulation of the Ca^{2+} binding protein S100A1 S100A1 in chronic pulmonary hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1500, 249-255 (2000)

Edes I und Kranias EG: Ca^{2+} - ATPases/ Pumps. *Cell Physiology Source Book*, Second Edition, 225-236 (1998)

Fabiato A und Fabiato F: Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol (Paris)* 75, 463-505 (1979)

Fabiato A: Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods in Enzymology* 157, 378-417 (1988)

Fano G, Marsili V, Angelella P, Aisa MC, Giambanco I, Donato R: S-100a0 protein stimulates Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release from isolated sarcoplasmic reticulum vesicles. *FEBS Lett* 255(2), 381-384 (1989)

Frank K und Kranias EG: Phospholamban and cardiac contractility. *Ann Med.* 32, 572-578 (2000)

Freestone NS, Ribaric S, Scheuermann M, Mauser U, Paul M, Vetter R: Differential lusitropic responsiveness to α -adrenergic stimulation in rat atrial and ventricular cardiac myocytes. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 441, 78-87 (2000)

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450 (1985)

Haimoto H und Kato K: S100a0 ($\alpha\alpha$) protein in cardiac muscle. Isolation from human cardiac muscle and ultrastructural localization. *Eur J Biochem* 171, 409-415 (1988)

6. Literaturverzeichnis

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H: Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} - ATPase in failing and non-failing human myocardium. *Circ Res* 75, 434-442 (1994)

Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H: Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 92, Suppl. 1, 87-93 (1997)

He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, Choi DJ, Rockmann HA, McDonough PM, Bluhm WF, Meyer M, Sayen R, Swanson E, Dillmann WH: Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 100(2), 380-389 (1997)

Heiny JA: Excitation- Contraction Coupling in Skeletal Muscle: *Physiology Source Book*, 805-816 (1998)

Heizmann CW und Cox JA: New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca^{2+} -, Zn^{2+} - and Cu^{2+} -binding protein family. *BioMetals* 11, 383-397 (1998)

Hove-Madson L und Bers DM: Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Uptake and Thapsigargin Sensitivity in Permeabilized Rabbit and Rat Ventricular Myocytes. *Circ Res* 73, 820-828 (1993)

Hussain A und Inesi G: Involvement of Sarco/ endoplasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase in Cell Function and the Celular Consequence of Their Inhibition. *J Membrane Biol* 172, 91-99 (1999)

Inesi G, Lewis D, Submilla C, Nandi A, Strock C, Huff KW, Rogers TB, Johns DC, Kessler PD, Ordahl CP: Cell-specific promotor in adenovirus vector for transgenic expression of SERCA1 ATPase in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 274, C645-C653 (1998)

Kargacin GJ, Ali Z and Kargacin ME: Ruthenium Red reduces the Ca sensitivity of Ca uptake into cardiac sarcoplasmic reticulum. *Plügers Archiv* 436, 338-342 (1988)

6. Literaturverzeichnis

Kargacin ME und Kargacin GJ: Methods for determining cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump kinetics from fura 2 measurements. *Am J Physiol* 267, C1145-C1151 (1994)

Kargacin ME, Scheid CR, Honeyman TW: Continuous monitoring of Ca^{2+} uptake in membrane vesicles with fura-2. *Am J Physiol* 245, C694-C698 (1988)

Kargacin ME, Ali Z, Kargacin GJ: Anti-Phospholamban and protein kinase A alter the Ca^{2+} sensitivity and maximum velocity of Ca^{2+} uptake by the cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem* 331, 245-249 (1998)

Kiewitz R, Lyons GE, Schäfer BW, Heizmann CW: Transcriptional regulation of S100A1 and expression during mouse heart development. *Biochim Biophys Acta* 1498, 207-219 (2000)

Kiewitz R, Acklin C, Schafer BW, Maco B, Uhrig B, Wuytack F, Erne P, Heizmann CW: Ca^{2+} -dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum ATPase2a and phospholamban in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun* 306 (2), 550-557 (2003)

Koss KL, Grupp IL, Kranias EG: The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardiol* 92, 17-24 (1997)

Lalli MJ, Yong JI, Prasad V, Hashimoto K, Plank D, Babu GJ, Kirkpatrick D, Walsh RA, Sussman M, Yatani A, Marbán E, Periasamy M: Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) 1a Structurally Substitutes for SERCA2a in the Cardiac Sarcoplasmic Reticulum and Increases Cardiac Ca^{2+} Handling Capacity. *Circ Res* 89, 160-167 (2001)

Laemmli UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)

Landar A, Rustandi RR, Weber DJ, Zimmer DB: S100A1 utilizes different mechanisms for interacting with calcium-independent target proteins. *Biochemistry* 37, 17429-17438 (1998)

6. Literaturverzeichnis

Lewit-Bentley A und Rety S: EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10, 637-43 (2000)

Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM: β -adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca^{2+} -ATPase activity in guinea-pig ventricles. *J Biol Chem* 258, 464-471 (1983)

Lompré AM, Anger M, Levitsky D: Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. *J Mol Cell Cardiol.* 26, 1109-1121 (1994)

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 254-275 (1951)

Lytton J, Zarain-Herzberg A, Periasamy M, MacLennan DH: Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* 264, 7059-7065 (1989)

MacLennan DH: Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 245, 4508-4518 (1970)

MacLennan DH: Ca^{2+} signalling and muscle disease. *Eur J Biochem* 267, 5291-5297 (2000)

Maco B, Uhrig B, Heizmann CW: Distribution of the Ca^{2+} -binding S100A1 protein at different sarcomere length of slow and fast skeletal muscles. *Gen Physiol Biophys* 19, 237-244 (2000)

Makinose M und Hasselbach W: Der einfluss von Oxalat auf den Calcium-Transport isolierter Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums. *Biochem Z* 343, 360-382 (1965)

Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 778-784 (1995)

6. Literaturverzeichnis

Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J, Kranias EG, Giles WR, Chien KR: Chronic Phospholamban-Sarcoplasmic Retikulum Calcium ATPase Interaction Is the Critical Calcium Cycling Defect in Dilated Cardiomyopathy. *Cell*, 99, 313-322 (1999)

Miller DJ und Smith GL: EGTA purity and the buffering of calcium ions in physiological solutions. *Am J Cell Physiol* 246, 160-166 (1984)

Moews PC und Kretsinger RH: Refinement of the structure of carp muscle calcium-binding parvalbumin by model building and difference Fourier analysis. *J Mol Biol* 91, 201-25 (1975)

Moore BW: A soluble protein characteristic of the nerve system. *Biochem Biophys Res Commun* 19, 739-744 (1965)

Most P, Ehlermann P, Weber C, Fink RHA, Remppis A: Die hydrophoben Anteile des positiv inotropen Proteins S100A1 vermitteln die sarkoplasmatische Ca^{2+} - Freisetzung an Saponin-permeabilisierten Skelettmuskelfasern. *Z Kardiol* 88, Suppl.1, 48 (1999)

Most P, Pleger ST, Eckhard AD, Heizmann CW, Koch WJ, Remppis A: Adenoviral vermittelte Überexpression von S100A1 steigert die Kontraktilität und die Relaxationsfähigkeit in adulten Kardiomyozyten. *Z Kardiol* 88, Suppl. 1, 47 (1999)

Most P, Ehlermann P, Weber C, Fink RHA, Remppis A, Katus HA: The hydrophobic epitopes and the linker region of the EF-hand Ca^{2+} binding protein S100A1 enhances the caffeine induced Ca^{2+} release from SR. *Circulation* 100, Suppl 18, I-420, 2211 (1999)

Most P, Zeitz O, Janssen PML, Ehlermann P, Reppel M, Hasenfuss G, Katus HA, Remppis A: S100A1 modulates Ca^{2+} sensitivity of cardiac myofilamentes. *Eur Heart J*, Suppl 21, 60 (2000)

6. Literaturverzeichnis

Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Reppel M, Borries M, Niroomand F, Pieske B, Janssen PM, Eschenhagen T, Karczewski P, Smith GL, Koch WJ, Katus HA, Remppis A: S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13889-13894 (2001)

Most P, Remppis A, Weber C, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Kirsch W, Weber M, Uttenweiler D, Smith GL, Katus HA, Fink RHA: The C-terminus (aa 75-94) and the linker region (aa 42-54) of the Ca²⁺ binding protein S100A1 differentially enhance sarcoplasmic Ca²⁺ release in murine skinned skeletal muscle fibres. *J Biol Chem* 278, 26356-26364 (2003)a

Most P, Remppis A, Pleger ST, Löffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Kleuss C, Heierhorst J, Ruiz P, Witt H, Karczewski P, Mao L, Rockmann HA: Transgenic overexpression of the Ca²⁺-binding protein S100A1 in the heart increased in vivo myocardial contractile performance. *J Biol Chem* 278, 33809-33817 (2003)b

Nabauer M, Callewaert G, Cleemann L, Moras M: Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* 244, 800-803 (1989)

Orchard CG, Smith GL, Steele DS: Effects of cytosolic Ca²⁺ on the Ca²⁺ content of the sarcoplasmic reticulum in saponin-permeabilized rat ventricular trabecular. *Pfügers Arch* 435, 555-563 (1998)

Osterloh D, Ivanenkov VV, Gerke V: Hydrophobic residues in the C-terminal region of S100A1 are essential for target protein binding but not for dimerization. *Cell Calcium*, 24, 137-151 (1998)

Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, Nieman ML, Riddle T, Duffy JJ, Doetschmann T, Lorenz JN, Shull GE: Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J Biol Chem* 274, 2556-2562 (1999)

6. Literaturverzeichnis

Periasamy M und Huke S: Serca pump level is the critical determinant of Ca(2+) homeostasis and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1053-1063 (2001)

Piper HM, Volz A, Schwartz P: Adult Rat Heart Cells. In: Piper HM: *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. 36-60, Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1990)

Pleger ST, Manning BS, Hata J, Most P, Koch WJ, Katus HA, Remppis A: S100A1 Gentherapie am gesunden Kaninchenmyokard steigert die Herzfunktion. *Z Kardiol* 88, Suppl. 1, 46 (1999)

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J: Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74, 595-636 (1994)

Remppis A, Greten T, Schäfer BW, Hunziker P, Erne P, Katus HA, Heizmann CW: Altered expression of the Ca²⁺-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1313, 253-257 (1996)

Remppis A, Ehlermann P, Most P, Weber C, Heizmann CW, Fink RHA, Katus HA: The Ca²⁺ - binding protein S100A1 increases the caffeine-induced Ca²⁺ -release in permeabilized skeletal muscle fibers. *Eur Heart J, Suppl.* 18 (1997)

Remppis A, Most P, Löffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Pleger S, Borries M, Reppel M, Fischer J, Koch WJ, Smith G, Katus HA: The small EF-hand Ca²⁺ binding protein S100A1 increases contractility and Ca²⁺ cycling in rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol*, 97 Suppl 1, 156-62 (2002)

Ringer S: Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *J Physiol Lond* 3, 380-383 (1882)

Saudavet A, Pavoine C, Rohn T, Pecker F: Calcium signal and contraction. *C R Seances Soc Biol Fil* 190, 243-253 (1996)

6. Literaturverzeichnis

Scarpa A, Baldassare J, Inesi G: The effect of calcium ionophores on fragmented sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* 60, 735-749 (1972)

Schäfer BW und Heizmann CW: The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21, 134-140 (1996)

Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ: Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Circulation* 101, 790-796 (2000)

Schwinger RHG, Böhm M, Schmidt U, Karczewski P, Bavendiek U, Flesch M, Krause EG, Erdmann E: Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} -ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with non failing hearts. *Circulation* 92, 3220-3228 (1995)

Shigekawa M, Finegan AM, Katz AM: Calcium transport ATPase of canine cardiac reticulum: a comparison with that of rabbit fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 251, 6894-6900 (1976)

Shull GE: Gene knockout studies of Ca^{2+} -transporting ATPases. *Eur J Biochem.* 276, 5284-5290 (2000)

Smith GL, Duncan AM, Neary P, Bruce L, Burton FL: P(i) inhibits the SR $\text{Ca}(2+)$ pump and stimulates pump-mediated $\text{Ca}(2+)$ leak in rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H577-H585 (2000)

Sommer JR, Jennings RB: Ultrastructure of the cardiac muscle. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The Heart and Cardiovascular System*. New York, NY. Raven Press, 3-50 (1992)

6. Literaturverzeichnis

Submilla C, Cavagna M, Zhong L, Hailun MA, Lewis, Farrance I, Inesi G: Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 277, H2381-H2391 (1999)

Thelestam M, Mollby R: Classification of microbial, plant and animal cytolysins based on their membrane-damaging effects of human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 557, 156-69 (1979)

Towbin H, Staehlin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 76, 4350-4354 (1979)

Treves S, Scutari E, Robert M, Groh S, Ottolia M, Prestipino G, Ronjat M, Zorzato F: Interaction of S100A1 with the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle. *Biochemistry* 36, 11496-11503 (1997)

Uto A, Arai H, Ogawa Y: Reassessment of Fura-2 and the ratio method for determination of intracellular Ca^{2+} concentrations. *Cell Calcium* 12 (1), 29-37 (1991)

Voss J, Jones LR, Thomas DD: The Physical Mechanism of Calcium Pump Regulation in the Heart. *Biophysical Journal* 67, 190-196 (1994)

Wang Z, Zhang H, Ding Y, Wang G, Wang X, Ye S, Bartlam M, Tang H, Liu Y, Jiang F, Barraclough R, Rudland PS, Rao Z: Preliminary X-ray crystallographic analysis of a Ca^{2+} -binding protein human S100A1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 882-883 (2001)

Wier WG: Cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ in mammalian ventricle: dynamic control of cellular processes. *Ann Rev Physiol.* 52, 467-485 (1990)

Wier GW und Balke W: Ca^{2+} Release Mechanismus, Ca^{2+} Sparks, and Local Control of Excitation-Contraction Coupling in Normal Heart Muscle. *Circ Res.* 85, 770-776 (1999)

6. Literaturverzeichnis

Wolosker H, Rocha JBT, Engelender S, Panizzutti JD, Miranda JD, de Meis L: Sarco/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase isoforms: diverse response to acidosis. *Biochem J* 321, 545-550 (1997)

Wu KD, Wey DB, Lytton J: Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol* 269, C775-C784 (1995)

Xu A, Hawkins S, Narayanan N: Phosphorylation and activation of the Ca^{2+} -pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca^{2+} /calmodulin-dependent-proteinkinase. *J Biol Chem* 268, 8394-8397 (1993)

Yong JI, Loukianov E, Loukianov T, Jones LR, Periasamy M: SERCA1a can functionally substitute for SERCA2a in the heart. *Am J Physiol* 276; H89-H97 (1999)

Zarain-Herzberg AD, MacLennan DH, Periasamy M: Characterization of rabbit cardiac sarco(endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* 265, 4670-4677 (1990)

Zimmer DB: Examination of the Calcium-Modulated Protein S100 α and Its Target Proteins in Adult and Developing Skeletal Muscle. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 20; 325-337 (1991)

Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W: The S100 protein Family: History, Function, and Expression. *Brain Research Bulletin* 37, 417-429 (1995)

7. Danksagung

7. Danksagung

Herrn **Prof. Dr. H. A. Katus** danke ich zum Einen für die Überlassung des Themas und zum Anderen dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in der von ihm geleiteten Klinik durchzuführen. Seine wohlwollende Unterstützung und großzügige Förderung haben mir darüberhinaus ermöglicht, einen wesentlichen Teil dieser Studie an der Universität Glasgow, Schottland, zu verwirklichen.

Sehr großer Dank gilt Herrn **PD Dr. A. B. Remppis** für die Chance, in seiner Arbeitsgruppe wissenschaftlich tätig zu sein. Die sehr freundschaftliche Atmosphäre in dem von ihm geleiteten Labor hat die Zeit meiner Arbeit sehr positiv geprägt. Darüberhinaus waren sein freundlicher Rat und seine ermutigende Kritik einerseits ein stetiger Ansporn, andererseits eine sehr große Hilfe für mich.

In ganz besonderer Weise danke ich Herrn **Dr. med. P. Most** für die exzellente und professionelle Betreuung und das in mich gesetzte Vertrauen bei der Durchführung der Experimente. Seine große Begeisterung für die medizinische Forschung hat mich stets sehr ermutigt und mir bei der Erstellung der Arbeit in Lübeck und Glasgow sehr geholfen, die ohne seine Unterstützung und Beratung sicherlich nicht möglich gewesen wäre.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. G. L. Smith** bedanken, der mich für die Zeit meines Aufenthaltes am Institute of Biomedical and Life Sciences der Universität Glasgow, Schottland, sehr herzlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mich dort gemeinsam mit Frau **S. Currie** sehr intensiv betreut hat. Die außergewöhnliche Zusammenarbeit wird mir in besonderer Erinnerung bleiben.

8. Curriculum vitae

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Bernotat
Vorname	Juliane
Geburtsdatum	24.06.1975
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulischer Werdegang

1981 – 1985	Jahnschule in Kiel
1985 – 1994	Herderschule in Rendsburg
1994	Allgemeine Hochschulreife

Universitärer Werdegang

1994 – 1995	Studium generale am Leibniz Kolleg inTübingen
1995 – 2002	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2000 – 2003	Beginn und Fertigstellung der Promotionsarbeit: Beeinflussung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität im Herz- und Skelettmuskel durch das Ca^{2+} -bindende Protein S100A1
2000	Forschungsaufenthalt am Institute of Biomedical and Life Sciences der Universität Glasgow in Schottland bei Prof. Dr. G. L. Smith (als Stipendiatin des Boehringer Ingelheim Fonds)
seit 1. August 2002	Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg

9. Publikationen

9. Publikationen

Most P, Remppis A, Pleger ST, Loeffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Kleuss C, Heierhorst J, Ruiz P, Witt H, Karczewski P, Mao L, Rockman HA, Duncan SJ, Katus HA, Koch WJ. Transgenic overexpression of the Ca²⁺ binding protein S100A1 in the heart leads to increased in vivo myocardial contractile performance. J Biol Chem 2003 May 30.

Most P, Remppis A, Weber C, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Kirsch W, Weber M, Uttenweiler D, Smith GL, Katus HA, Fink RH. The C-terminus (aa 75-94) and the linker region (aa 42-54) of the Ca²⁺ binding protein S100A1 differentially enhance sarcoplasmic Ca²⁺ release in murine skinned skeletal muscle fibres. J Biol Chem 2003 Jul 28.

Gille J, Bernotat J, Bohm S, Behrens P, Lohr JF. Spontaneous hemarthrosis of the knee associated with clopidogrel and aspirin treatment. Z Rheumatol. 2003 Feb;62(1):80-1.

Remppis A, Most P, Loeffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Pleger S, Borries M, Reppel M, Fischer J, Koch WJ, Smith G, Katus HA. The small EF-hand Ca²⁺ binding protein S100A1 increases contractility and Ca²⁺ cycling in rat cardiac myocytes. Basic Res Cardiol. 2002; 97 Suppl 1:156-62.

Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Reppel M, B rries M, Niroomand F, Pieske B, Janssen PML, Eschenhagen T, Karczewski P, Smith GL, Koch WJ, Katus HA, Remppis A. S100A1: A regulator of myocardial contractility. Proc Natl Acad Sci U S A 2001, 98: 13889-13894.

Ehlerman P, Remppis A, Most P, Bernotat J, Heizmann CW, Katus HA. Purification of the Ca²⁺-binding protein S100A1 from myocardium and recombinant Escherichia coli. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000 Jan 14;737(1-2):39-45.

European Society of Cardiology, XXIII. Congress, September 1-5, 2001, Stockholm

Most P, Bernotat J, Pleger ST, Ehlermann P, Pieske B, Smith GL, Katus HA, Remppis A (2001): S100A1 improves cardiac contractility by increasing SERCA2a activity. Eur Heart J 22 (Suppl) : 940