

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Detlev Drenckhahn

**Charakterisierung der Bindung des Stressproteins
 α B-Crystallin an kardiale Myofibrillen unter Ischämie**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius–Maximilians–Universität zu Würzburg

Vorgelegt von

Anja Katrin Arbeiter

aus Oberhausen

Würzburg, Juli 2001

Referent: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

Koreferent: Prof. Dr. med. U. Walter

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2002

Die Promovendin ist Ärztin im Praktikum

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Aufbau der Herzmuskulatur	1
1.1.1	Proteine der Z-Scheibe und der benachbarten I-Bande	2
1.2	Reaktion des Herzens auf mangelnde Blutversorgung (Ischämie)	5
1.3	α B-Crystallin	7
1.3.1	α -Crystalline in der Augenlinse	7
1.3.2	α B-Crystallin als Hitzeschockprotein	8
1.3.3	α B-Crystallin im Herzen	9
1.4	Fragestellung	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	α B-Crystallin-cDNA im Plasmidvektor pRC/CMV	12
2.1.2	Titin-cDNA im Plasmidvektor pET6h	12
2.1.3	Detergenzien	13
2.1.4	DNA- und Protein-Molekulargewichtsstandards	13
2.1.5	Enzyme	14
2.1.6	Farbstoffe/Reagenzien für die Proteinbestimmung	14
2.1.7	Immunelektronenmikroskopie	14
2.1.8	Immunreagenzien/Antikörper	14
2.1.9	Proteaseinhibitoren	15
2.1.10	Proteine	15
2.1.11	Puffer/Medien	15
2.1.12	Reagenzien für Immunreplik und Autoradiographie	16
2.1.13	Reagenzien für Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	16
2.1.14	Reaktionskits	16
2.1.15	Sulphydryl-Reagenzien	16
2.1.16	Sonstiges	16
2.2	Molekularbiologische Methoden	17
2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien	17
2.2.2	Transformation kompetenter E.coli-Bakterien	18
2.2.3	Schnelle Plasmidpräparation (Miniprep/Ammoniumacetatmethode)	18
2.2.4	Schnelle Plasmidpräparation 2 (Mini-Prep)	19
2.2.5	Phenolextraktion	19
2.2.6	Quantifizierung der DNA	19
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	20

2.2.7.1	DNA-Agarosegel	20
2.2.7.2	RNA-Agarosegel	20
2.2.8	Färben der Agarosegele mit Ethidiumbromid	21
2.2.9	Elution von DNA aus Agarosegelen	21
2.2.10	DNA-Fällung	21
2.2.11	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	22
2.2.12	DEPC-Behandlung zur Inhibition von RNAsen	22
2.2.13	In-vitro-Transkription	22
2.2.14	In-vitro-Translation	23
2.2.15	Quantifizierung der radioaktiven Zerfälle im Szintillationszähler	24
2.3	Biochemische Methoden	24
2.3.1	Proteinextraktionsversuche am Herz mit Hilfe unterschiedlicher Salzlösungen	24
2.3.2	Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford	25
2.3.3	Amidoschwarz-Proteinbestimmung	25
2.3.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.3.5	Gesamtproteinfärbung der Polyacrylamidgele	26
2.3.6	Immunreplikanalyse	26
2.3.7	Gradienten-Gelelektrophorese	28
2.3.8	Biotinylierung von Proteinen	28
2.3.9	Herstellung von Dot-Blots für Bindungsassays	28
2.4	Immunzytochemie	29
2.4.1	Charakterisierung der Bindungsaffinität verschiedener Proteine anhand von Kroystatschnitten	29
2.4.2	Affinitätsreinigung von Antikörpern	30
2.4.3	Immunelektronenmikroskopie	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Ultrastrukturelle Lokalisation von α B-Crystallin im ischämischen Herzen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie	32
3.2	Charakterisierung der Bindung von α B-Crystallin an ischämische Myofibrillen mittels histochemischer Methoden	33
3.3	Biochemische Charakterisierung der Bindung von α B-Crystallin an ischämische Myofibrillen	38
3.4	Assoziation von α B-Crystallin mit nativem, aus dem Schweineherz präparierten Titin	40
3.5	Proteinbindungsstudien zwischen α B-Crystallin und verschiedenen zytoskeletalen Proteinen	41

3.6	In-vitro-Translation verschiedener Domänen des Titin-Moleküls sowie von α B-Crystallin	42
3.7	Proteinbindungsstudien zwischen α B-Crystallin und in vitro translatierten Titinsequenzabschnitten	44
4	DISKUSSION	46
5	ZUSAMMENFASSUNG	51
6	LITERATUR	53
7	BENUTZTE ABKÜRZUNGEN	62

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Herzmuskulatur

Die Herzmuskulatur ist ein für Dauerleistungen konzipiertes, quergestreiftes Muskelgewebe. Die einzelnen Herzmuskelzellen, mit einer Länge von 40-100µm, sind untereinander sowohl mechanisch als auch elektrisch durch spezielle Interzellularkontakte, die Glanzstreifen, verbunden. Die Zellen sind verzweigt, so dass ein dreidimensionales, muskuläres Netzwerk entsteht.

Die einzelne Herzmuskelzelle, Kardiomyozyt, enthält zahlreiche Myofibrillen, die für die Kontraktilität verantwortlich sind (Drenckhahn,1994). Sie bestehen aus mehreren hintereinander angeordneten Bausteinen, den Sarkomeren. Diese stehen durch die Zwischenscheiben, (Z-Scheiben), miteinander in Verbindung. Das Sarkomer ist Bestandteil einer für die Herz-, aber auch für die Skelettmuskulatur charakteristischen Querstreifung, die im Längsschnitt sichtbar wird. Sie besteht aus 1.5µm breiten, mit den meisten Farbstoffen stark anfärbaren Banden, die doppelbrechend (anisotrop) sind und deshalb als A-Banden bezeichnet werden. Sie enthalten als Hauptkomponente Myosinfilamente. Ein im Zentrum der A-Banden sichtbarer Querstreifen wird als Mittelzone (M-Zone) bezeichnet. In diesem Bereich, der die Proteine Myomesin, das M-Linien-Protein und die muskuläre Kreatinkinase enthält, sind die Myosinfilamente miteinander quervernetzt. Umgeben werden die A-Banden von den hellen, nicht doppelbrechenden (isotropen) I-Banden, deren Hauptbestandteil Aktinfilamente sind, welche sich in die A-Bande hinein zwischen die Myosinfilamente erstrecken (Überlappungszone). Die Breite der I-Bande und der Überlappungszone ist abhängig vom Kontraktionszustand des Muskels. Die I-Bande selbst ist durch die Z-Scheibe in zwei Hälften geteilt. In der Z-Scheibe sind die Enden der Aktinfilamente durch das Protein α -Actinin miteinander quervernetzt. Weitere Z-Scheiben assoziierte Proteine sind u.a. CapZ-Protein (Casella et al.,1986), Synemin, Paranemin (Price et al.,1991) sowie das Intermediärfilament Desmin. Das Sarkomer besteht demnach aus einer A-Bande und zwei ihr benachbarten halben I-Banden. Extrahiert man Aktin- und Myosinfilamente mit Hilfe hoher Salzkonzentrationen (z.B. Kaliumjodid als chaotropes Agens), behält man Komponenten der Z-Scheibe und ein zartes, drittes Filamentsystem zurück. Diese Filamente, mit einem Durchmesser von 2-4nm, durchspannen das halbe Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie und bestehen aus einem einzigen Molekül, dem Titin. Titinfilamente bilden ein elastisches System, das die Sarkomere vor Überdehnung des Muskels schützt und nach Beendigung der Dehnung ein automatisches Zurückgleiten der Aktinfilamente zwischen die Myosinfilamente ermöglicht.

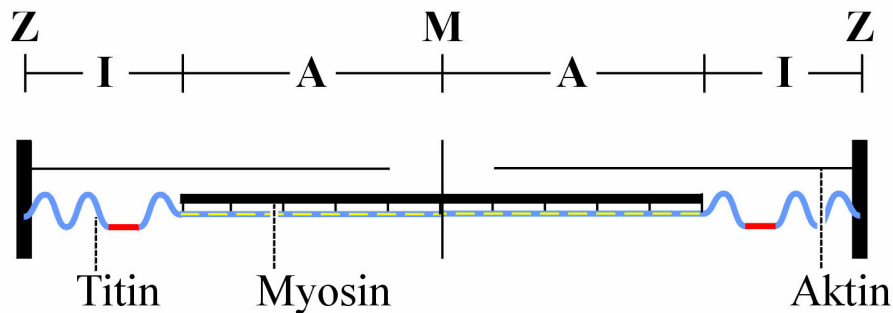


Abb. 1: Vereinfachtes Modell der wichtigsten Filamentsysteme eines Sarkomers der quergestreiften Muskulatur. Der rote Abschnitt des Titinmoleküls zeigt die Lage der besonders dehnbaren PEVK-Zone an.

1.1.1 Proteine der Z-Scheibe und der benachbarten I-Bande

Aktin:

Filamentäres Aktin (F-Aktin) ist ein Homopolymer variabler Länge mit einem Durchmesser von 8nm und einem Monomeren-Molekulargewicht von ~42000. Die Aktinmonomere, globuläre Untereinheiten mit einem Durchmesser von 4-5nm (G-Aktin), ordnen sich zu einer filamentären α -Doppelhelix an (Hanson et al.,1963). Aktinfilamente zeigen eine Bipolarität, ihr Plusende, an dem die schnelle Polymerisation stattfindet, liegt im Bereich der Z-Scheibe. In diesem Bereich überlappen die Aktinfilamente benachbarter Sarkomere und werden durch das Protein α -Actinin miteinander quervernetzt. Die Polymerisation wird durch das Protein CapZ blockiert. Das Minusende wird durch Tropomodulin vor der Depolymerisation bewahrt. Stabilisiert werden die Aktinfilamente durch das Protein Tropomyosin, ein fadenförmiges Molekül, das sich dem Rand des gewundenen Aktinfilamentes anlegt. Es existieren verschiedene Aktinisoformen, die sich in weniger als 7% ihrer Aminosäuren voneinander unterscheiden (Alberts et al.,1989). Aufgrund von Unterschieden in der elektrischen Ladung werden sie als α -, β - und γ -Isoformen bezeichnet, Herz-, Skelett- sowie glatte Muskulatur besitzen unterschiedliche α -Isoformen, in nichtmuskulären Zellen findet man hauptsächlich die β - und γ -Formen.

α -Actinin:

α -Actinin ist ein Hauptprotein der Z-Scheibe mit der Aufgabe, Aktinfilamente quervernetzen. Es liegt als ein antiparallel angeordnetes 95kD-Homodimer vor mit einem Durchmesser von 4nm und einer Länge von 14nm. An beiden Enden sind die Aktinbindungsstellen lokalisiert

(Mimura et al.,1987). Die Bindung von α -Actinin an Aktin ist unter physiologischen Temperaturen (37°C) beschränkt auf den Bereich der Z-Scheiben-Region und erfolgt Kalzium-unabhängig. Niedrigere Temperaturen erlauben eine Bindung entlang des gesamten Aktinfilaments, unter diesen Bedingungen wird α -Actinin dort nicht durch Tropomyosin verdrängt (Stromer et al.,1972).

Desmin:

Das 53kD-Protein Desmin ist den Intermediärfilamentproteinen zuzuordnen. Intermediärfilamente liegen mit einem Durchmesser von 8-10nm zwischen Mikrotubuli (25nm) und Aktinfilamenten (7nm), woraus ihr Name resultiert. Sie sind bevorzugt in Bündeln angeordnet und erfüllen eine passive mechanische Funktion im Sinne eines zellulären Stützgerüsts, das Zellorganellen und den Zellkern in Position hält. Man unterscheidet 32 Intermediärfilamentproteine, die sechs Verwandtschaftsgruppen zugeordnet sind und für unterschiedliche Gewebe typisch sind. Desmin kommt vor allem in adulten Herz- und Skelettmuskelzellen vor (Wallace et al.,1983; Price et al.,1984). In adulten Kardiomyozyten ist Desmin in Form eines dreidimensionalen Netzwerkes organisiert (Ip et al.,1983; Pierobon-Bormioli,1981). Besonders auffällig sind Bündel von Desminfilamenten, die ringförmig um die Myofibrillen im Bereich der Z-Scheibe angeordnet sind und die benachbarten Z-Scheiben miteinander verbinden (Tokuyasu et al.,1983a). So gewährleistet Desmin eine exakt parallele Ausrichtung der Myofibrillen. Von diesen Desminbündeln ausgehend verlaufen longitudinale Filamente parallel zu den Myofibrillen, gehen Verbindungen ein mit der Kernmembran sowie mit den Mitochondrien und enden in Desmosomen der kardialen Glanzstreifen (Lazarides et al.,1981; Tokoyasu et al.,1983b; Tidball et al.,1992). Gebündelt werden die Intermediärfilamente durch gewebsspezifische, Intermediärfilament-assoziierte Proteine (IFAP) wie z.B. Plectin (Price et al.,1991).

Titin:

Neben Aktin- und Myosinfilamenten existiert noch ein drittes Filamentsystem, bestehend aus dem Protein Titin, früher als Connectin bezeichnet. Titin durchspannt in Form eines monomeren Filamentes das halbe Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Wang et al.,1979; Maryuama et al.,1977). In der Z- und M-Scheibe überlappen sich Titinfilamente benachbarter Sarkomerhälften. Nach Aktin und Myosin ist es das dritthäufigste Muskelprotein: 10% des gesamten muskulären Proteingehaltes entfallen auf Titin (Wang et al.,1979; Trinick et al.,1984). Es konnte das Vorkommen mehrerer Titinisoformen in unterschiedlichen Muskelgeweben gezeigt werden, die sich hinsichtlich ihrer Länge und damit auch ihres Molekulargewichtes voneinander unterscheiden (Labeit et al.,1995,1997). Humanes kardiales Titin hat ein Molekulargewicht von 3 Millionen und eine Länge von ungefähr 1 μ m und ist damit bedeutend kleiner als das Titin der Skelettmuskulatur (Molekulargewicht ca. 4 Millionen). Elektronenmikroskopisch beobachtete man eine perlschnurartige Struktur der Titinmoleküle.

Der Abstand zwischen den aufeinanderfolgenden „Perlen“ wird mit 4nm angegeben (Trinick et al.,1984). Als dafür verantwortlich ist die Primärstruktur des Titinmoleküls anzusehen. Es besteht hauptsächlich (90% der Gesamtmasse Titins) aus repetitiven Immunglobulin- bzw. Fibronektin-Typ3-ähnlichen Domänen, die jeweils eine globuläre Konformation besitzen (Labeit et al.,1992,1995). In der A-Bande sind diese repetitiven Ig-Domänen in streng regelhafter Weise angeordnet, und sie weisen in regelmäßigen Abständen Bindungsstellen für Myosin und myosinassoziierte Proteine wie z.B. das C-Protein auf (Labeit et al.,1992). Sie scheinen daher mitverantwortlich für die Organisation der Myosinfilamente zu sein. Eine ähnliche Funktion wie die des carboxyterminalen Endes wird auch für das in der Z-Scheibe liegende aminoterminele Ende vermutet, nämlich die Organisation sowie die Aufrechterhaltung der Struktur der Z-Scheibe.

Der in der I-Bande lokalisierte Anteil des Titinmoleküls besitzt elastische Eigenschaften, die die Ruhespannung des Muskels bestimmen (Fürst et al.,1988). Ein wichtiges strukturelles Element der Elastizität ist die in der I-Bande gelegene PEVK-Domäne. Ihr Name erklärt sich durch ihre Aminosäuresequenz, die sich zu 70% aus den Aminosäuren Prolin, Glutaminsäure, Valin und Lysin zusammensetzt (Labeit et al.,1995). Wird eine quergestreifte Muskelfaser passiv in physiologischen Grenzen gedehnt, erfolgt zunächst eine Entfaltung der PEVK-Domäne, verbunden mit einem Anstieg der Muskelspannung. Sie ist nach Beendigung der Einwirkung spontan voll reversibel. Erreicht die PEVK-Domäne ihre Elastizitätsgrenze (im Herzmuskel ab einer Sarkomerlänge von ungefähr 2.4µm) (Linke et al.,1996) kommt es nacheinander zur Entfaltung der ebenfalls in der I-Bande gelegenen Ig-Domänen (Trombitas et al.,1995; Erickson,1994). Diese besitzen jedoch keine elastischen Eigenschaften und können sich spontan nur schwer in ihre Ausgangskonformation zurückfalten. Auf diese Weise besitzt die quergestreifte Muskulatur einen zweifachen, hintereinander geschalteten Schutz gegenüber Überdehnung. Neueren Untersuchungen zur Folge existiert noch eine dritte Komponente, die Einfluß auf die elastischen Eigenschaften des Titin-Moleküls haben soll: die N2A bzw. N2B-Sequenz, die zwischen PEVK-Domäne und dem proximalen Ig-Segment lokalisiert sein soll (Labeit et al.,1995). Die Expression verschiedener Titinisoformen läßt auch den Unterschied in der Ruhespannung der einzelnen Muskelgewebe erklären. Die bei der Herzmuskulatur festzustellende erhöhte Ruhespannung ist zurückzuführen auf das Vorkommen einer kürzeren Titinvariante, die insbesondere den I-Banden Abschnitt von Titin betrifft. Sowohl die PEVK-Domäne ist kürzer als im Skelettmuskel, als auch die Ig-Domänen sind anzahlmäßig reduziert (Labeit et al.,1995; Linke et al.,1996). Desweiteren liegt im Herzmuskeltitin eine kürzere, Herzmuskel-spezifische N2B-Sequenz vor, von der gezeigt wurde, dass sie im Vergleich zu der längeren N2A-Isoform, die sowohl im Skelett-, als auch im Herzmuskel vorkommt, einen sehr großen Anteil an den elastischen Eigenschaften des Titins und damit auch der Ruhespannung des Muskels besitzt (Trombitas et al.,1999).

Zusätzlich zu der PEVK- sowie den repetitiven Ig-Domänen und Fibronektin-Domänen enthält das Titinmolekül 19 einzelne Sequenzen. Letztere machen etwa 8-10% der Gesamtmasse aus

(Labeit et al.,1995). Darunter befinden sich 2 Phosphorylierungsstellen (Gautel et al.,1993), eine Domäne kodiert eine Serin/Threonin-Kinase (Labeit et al.,1992), sowie Bindungsstellen für eine Calpain-Protease (p94) (Sorimachi et al.,1995).

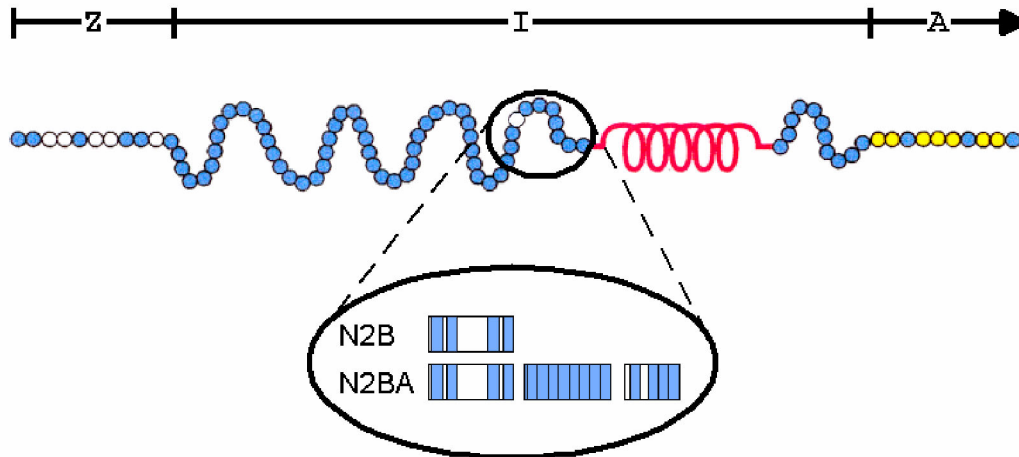


Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen des Titin-Moleküls im Sarkomer

1.2 Reaktion des Herzens auf mangelnde Blutversorgung (Ischämie)

Die Blutversorgung des Herzmuskels erfolgt durch die Koronararterien. Diese sind, trotz des Vorhandenseins kleiner Anastomosen, funktionelle Endarterien. Das bedeutet, dass im Falle ihrer Verlegung das zugehörige Myokard minderdurchblutet wird, woraus ein Herzinfarkt resultieren kann.

Die einzelnen Herzmuskelzellen reagieren auf solche Ischämieperioden mit dem Verbrauch ihrer Glykogenvorräte, der Produktion von Laktat sowie mit dem kontinuierlichen Abfall des zytosolischen ATP-Spiegels. Die Erschöpfung der ATP-Vorräte hat eine Erniedrigung der Aktivität von Ionenpumpen ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$) zur Folge mit einem daraus resultierenden Abfall des Membranpotentials und intrazellulärem Anstieg von Ca^{2+} . Es kommt zu Zellschädigungen und schließlich zum Funktionsverlust des betroffenen Myokardareals. Alle diese Veränderungen sind im Falle einer frühzeitigen Reperfusion reversibel, andernfalls führt die Reperfusion der nun irreversibel geschädigten Zellen zu deren Anschwellen, der Ruptur der

Zellmembran und letztendlich dem Zelltod. Die Desorganisation und Zerstörung des kontraktile und plasmalemalen Zytoskeletts trägt zu diesem Prozeß maßgeblich bei (Ganote et al., 1993). Es existieren jedoch verschiedene endogene Schutzmechanismen, mit Hilfe derer Kardiomyozyten dem durch Ischämie bedingten Stress begegnen können. Hierzu zählen unter anderem sogenannte Stressproteine oder auch Hitzeschockproteine genannt. Stressproteine sind in der Lage, konformationsdefekte Proteine zu erkennen und diese zu stabilisieren. Stressproteine können so durch Stabilisierung anderer Proteine zytoprotektiv wirken und auch die Folgen eines Herzinfarktes mildern. Verschiedene Stressproteine können sehr unterschiedliche Aufgaben erfüllen: sie unterbinden das Bestreben von Polypeptidketten, vor Beendigung der Synthese eine endgültige Konformation einzunehmen, ebenso bewahren sie sie in einer für den transmembranären Transport in andere Zellorganellen geeigneten Konformation. Im weiteren verhindern sie intra- und intermolekulare Aggregationen und helfen beim Abbau toxischer Metaboliten bzw. denaturierter Proteine durch Förderung der Proteolyse (Benjamin et al., 1998).

Ein wichtiger Aspekt ist auch die Induzierbarkeit der Synthese von Stressproteinen: Stresssituationen (wie z.B. Ischämie oder Hyperthermie) führen zur gesteigerten Synthese der meisten Stressproteine, zu vermehrter Transkriptionsaktivität sowie bevorzugter Translation der Stressproteine (innerhalb von Minuten können sie 15-25% des intrazellulären Gesamtproteingehaltes ausmachen) (Lindquist et al., 1988; Theodorakis et al., 1987; Benjamin et al., 1998). Dies wird reguliert durch Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren (HSF1-4). Ihre DNA-Bindungsaktivität ist u.a. in entscheidendem Maße abhängig von dem Absinken der zytoplasmatischen ATP-Konzentration infolge der Ischämie (Benjamin et al., 1990, 1992).

Diese erhöhte Konzentration von Stressprotein führt zu einer nachfolgenden Toleranzsteigerung gegenüber weiteren Stressereignissen. Mildem ischämischen Stress ausgesetzte Zellen entwickeln eine gesteigerte Resistenz gegenüber nachfolgenden stärkeren ischämischen Ereignissen.

Neben diesem verzögerten, überwiegend durch Stressproteine vermittelten, Protektionsmechanismus, auch als „second window of protection“ bezeichnet, verfügen die Kardiomyozyten über andere Mechanismen zur sofortigen, syntheseunabhängigen Protektion gegenüber Stressereignissen, welche ebenfalls induzierbar sind. Dazu zählen ein Anstieg der Katalase-Aktivität (Karmazyn et al., 1990), eine Aktivierung der Proteinkinase C, eine Erhöhung extrazellulären Adenosins (Downey et al., 1994), Inhibition des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschers, Aktivierung ATP-regulierter K^+ -Kanäle sowie Effekte von Stressproteinen, die konstitutiv in hohen Konzentrationen verfügbar sind (Walker et al., 1992). Bezogen auf die Herzmuskulatur wird dieses Phänomen auch als „ischämische Präkonditionierung“ bezeichnet (Murry et al., 1986).

Im Herzen ist eine Schutzfunktion von verschiedenen Stressproteinen nachgewiesen, insbesondere von HSP-70i. Seine kardioprotektive Funktion konnte anhand einer Anzahl von Experimenten belegt werden: Sowohl durch Hyperthermie (15 min, 42°C) als auch durch

mehrere kurze Ischämieperioden lassen sich innerhalb von 24h ein signifikanter Anstieg der intrazellulären HSP-70i-Konzentration erzielen, was zu einer Reduktion der Größe eines zu diesem Zeitpunkt initiierten Infarktes führt (Marber et al.,1993). Ebenso zeigen sich mit einem HSP-70i exprimierenden-Adenovirus infizierte neonatale Kardiomyozyten gegenüber ischämischen Ereignissen geschützt (Mestril et al.,1996). Eine geringere Infarktgröße sowie eine schnellere Erholung der ventrikulären Kontraktilität nach Ischämie im Vergleich zu den Kontrolltieren konnte auch bei HSP-70i überexprimierenden transgenen Mäusen festgestellt werden (Marber et al,1995).

Ein weiteres, erst kürzlich im Herzen nachgewiesenes Stressprotein, α B-Crystallin, könnte ebenfalls eine wichtige Rolle im Rahmen der ischämischen Zytoprotektion spielen. α B-Crystallin zeichnet sich durch folgende Eigenschaften besonders aus: 1. α B-Crystallin ist in Kardiomyozyten bereits konstitutiv in löslicher Form in außerordentlich hoher Konzentration vorhanden (1-2% des gesamten löslichen Proteingehaltes) (Golenhofen et al.,1998). 2. Ischämie bewirkt eine rasche Translokation des Proteins vom Zytosol an die Myofibrillen (Chiesi et al.,1990; Barbato et al.,1996; Golenhofen et al.,1998). 3. Ischämie bewirkt eine partielle Phosphorylierung von α B-Crystallin (Golenhofen et al.,1998). Diese Beobachtung war Ausgangspunkt dieser Arbeit mit dem Ziel, die Bindung von α B-Crystallin an die Myofibrillen näher zu charakterisieren und potentielle Bindungspartner von α B-Crystallin zu identifizieren.

1.3 α B-Crystallin

1.3.1 α -Crystalline in der Augenlinse

α -Crystalline sind als Massenproteine der Augenlinse bekannt (sie machen bis zu 50% ihres Trockengewichtes aus) (Harding et al.,1984). α -Crystalline haben ein Molekulargewicht von 21000 und werden im allgemeinen in Form von löslichen Homo- und Heterooligomeren mit einer durchschnittlichen Masse von 800 kDa isoliert (Wistow et al.,1988). Diese Aggregate bestehen aus zwei stark homologen Unterformen, α A- und α B-Crystallin, die eine 58%ige Sequenzhomologie besitzen. Zunächst galten die α -Crystalline als linsenspezifische Proteine, bis 1989 ihr Vorkommen auch in anderen Geweben gezeigt werden konnte, so z.B. im Herzen, der quergestreiften Skelettmuskulatur, der Niere sowie in vielen weiteren Geweben (Bhat et al.,1989,1991; Dubin et al.,1989; Iwaki et al.,1989; Nanginemi et al.,1989; Kato et al.,1991).

In der Linse wurden die α -Crystalline aufgrund ihrer dort so hohen Konzentration erst als reine Strukturproteine angesehen. Die hohe Proteinkonzentration ist essentiell für die Ausbildung der refraktiven Eigenschaften, und ihre Fähigkeit zur regelmäßigen Anordnung macht die Crystalline mitverantwortlich für die Linsentransparenz (Delaye et al.,1983).

Neben dieser rein strukturellen Funktion konnten die α -Crystalline später auch als „molecular chaperone“ identifiziert werden (Horwitz et al.,1992). Sie besitzen die Eigenschaft, andere Proteine vor Aggregation und Denaturierung zu schützen bzw. bei Faltungsprozessen zu unterstützen.

In der Linse wirken sie der hitzeinduzierten Aggregation anderer Massenproteine beispielsweise der β - und γ -Crystalline - und damit einem Katarakt- entgegen bzw. bewirken den Übergang von denaturiertem γ -Crystallin in die native Konformation. Neben der Aggregation dieser Strukturproteine kann auch die Aggregation verschiedener Enzyme, wie z.B. der Alkoholdehydrogenase oder der α -Glukosidase in vitro verhindert werden, nicht jedoch ihre Inaktivierung (Horwitz et al.,1992). Es konnte gezeigt werden, daß diese Protektion unter dem Einfluß von Metaboliten wie Glutathion sowie Pantethin noch gesteigert wird (Clark et al.,1996). Dieser Protektion unterliegt auch die hitzelabile Katalase, die ihrerseits ebenfalls zytoprotektiv wirksam ist (Hook et al.,1997).

1.3.2 α B-Crystallin als Hitzeschockprotein

α -Crystalline weisen eine große Homologie zu den kleinen Hitzeschockproteinen (sHSPs) auf (Ingolia et al.,1982). Die Homologie der Sequenz und der Sekundärstruktur zwischen den α -Crystallinen und anderen sHSPs wie z.B. HSP25/HSP27 ist so groß, dass sie untereinander Komplexe ausbilden können (Merck et al.,1993; Kato et al.,1992,1993).

Die für Hitzeschock-Proteine typischen Eigenschaften der α -Crystalline, z.B. Steigerung der Proteinsynthese infolge eines Stressereignisses, bestätigen ihre Einordnung in diese Proteinfamilie. Diese Induktion der α -Crystallinsynthese kann durch Temperaturerhöhung, durch Zugabe von Chemikalien (Cd^{2+} , Na-Arsenid) (Klemenz et al.,1991a) oder durch Dexamethason vermittelte Expression von v-mos- und Ha-ras-Onkogenen erfolgen (Klemenz et al.,1991b). Als Grundlage für diese Reaktionsmöglichkeit hat sich ein in der Promoterregion des α -Crystallingens gelegenes Hitzeschockelement erwiesen (Dubin et al.,1989). Neben der Steigerung der Transkriptionsaktivität erfolgt stressreguliert auch eine Translokation der α -Crystalline vom löslichen in das unlösliche Kompartiment der Zelle. Im Anschluß an das Stressereignis erweist sich diese Umverteilung als reversibel (Klemenz et al.,1991a; Barbato et al.,1996). Die Translokation in die Zytoskelett/Kern-Fraktion erfolgt unter Bildung größerer Aggregate mit ähnlichen Sedimentationseigenschaften wie die anderer Hitzeschockproteine (Arrigo et al.,1985,1987; Nover et al.,1983).

Es wurde beobachtet, dass die stressinduzierte Translokation der α -Crystalline in das unlösliche Kompartiment mit der Interaktion von α -Crystallinen mit Zytoskelettkomponenten einhergeht. α B-Crystallin kann in vitro mit Aktin sowie mit Intermediärfilamenten (IF) vom Typ 3 -wie Vimentin, Desmin und GFAP (glial fibrillary acidic protein)- interagieren. Auch in vivo

konnte eine Bindung von α B-Crystallin an Vimentin bestätigt werden. Die Bindungsaffinität von α B-Crystallin zeigte sich dabei sowohl Temperatur- als auch pH-abhängig. Leicht saures Milieu (pH 6,5) und Hitzeschock (45°C) führten zu einem Anstieg der Bindungsaffinität (Chiesi et al.,1990; Bennardini et al.,1992; Nicholl et al.,1994; Djabali et al.,1997). Diese Bindung ist resistent gegenüber der Behandlung mit nichtionischen Detergenzien wie z.B. TritonX-100, die zur Isolierung von Intermediärfilamenten verwendet werden (Djabali et al.,1997). Entscheidende Bedeutung für die Bindung scheint der aminoternale Bereich von α B-Crystallin zu besitzen: synthetisierte Peptide, die diesen Bereich umfassen, sind ebenfalls zur Interaktion mit den IF befähigt (Djabali et al.,1997).

Die protektiven Eigenschaften von α B-Crystallin zeigen sich in diesem Zusammenhang darin, dass α B-Crystallin z.B. die Aggregation von Aktin-Filamenten in saurem Milieu, wie es auch unter ischämischen Bedingungen vorkommt, verhindert (Bennardini et al.,1992). In der Linse kann α B-Crystallin die Polymerisation von Intermediärfilamentproteinen (Vimentin, GFAP) zu den eigentlichen Filamenten inhibieren bzw. polymerisierte Filamente depolymerisieren (Nicholl et al.,1994). Eine vermehrte Vorkommen bzw. die Persistenz von Vimentinfilamenten in differenzierten Linsenzellen wird als kausal für die Kataraktentstehung angesehen (Bloemendal et al.,1991). Die Assoziation von α B-Crystallin mit Intermediärfilamenten beobachtet man auch im Rahmen degenerativer Erkrankungen des menschlichen Gehirns, wo α B-Crystallin als Komponente sogenannter Einschlusskörperchen oder in Verbindung mit Neurofibrillen, z.B. bei M. Alzheimer, gefunden wurde (Lowe et al.,1992; Tomokane et al.,1991; Renkawek et al.,1994).

1.3.3 α B-Crystallin im Herzen

α B-Crystallin ist im Herzen konstitutiv in hoher Konzentration vorhanden (1-2% der löslichen Proteine) (Golenhofen et al.,1998). Damit wäre α B-Crystallin ein geeigneter Kandidat für einen sofortigen, proteinsyntheseunabhängigen Protektionsmechanismus. Kardiale Ischämie bewirkt in vitro sowie in vivo innerhalb von 5-30 min eine vollständige Translokation von α B-Crystallin vom Zytosol an die Myofibrillen (Golenhofen et al.,1998). Innerhalb der Myofibrillen wurde das Proteins im Bereich der Z-/I-Region der Sarkomere identifiziert (Golenhofen et al.,1998). Die Z-Scheiben sind als die wichtigsten Verankerungspunkte der Aktinfilamente unter Ischämie von besonderer Bedeutung. Die Ruptur der Myofibrillen infolge längerer Ischämie erfolgt hauptsächlich an diesen Zellstrukturen. Daraus resultieren kardiale Insuffizienz und letztlich der Zelltod (Ganote et al.,1987). Eine Stabilisierung dieser Region durch α B-Crystallin könnte also entscheidenden Einfluß auf die Überlebenszeit der Kardiomyozyten unter ischämischen Bedingungen haben.

Die Umverteilung von α B-Crystallin in die unlösliche Zytoskelett/Kern-Fraktion geht zeitlich einher mit dem Auftreten einer sauren Form des α B-Crystallins. Diese entspricht der phosphorylierten Form von α B-Crystallin (Golenhofen et al.,1998) und macht 15-20% des α B-Crystallins aus. Eine Phosphorylierung von α B-Crystallin ist auch in der Linse gezeigt worden. Das phosphorylierte α B-Crystallin (B1-Form) liegt hier neben der unphosphorylierten B2-Form schon unter physiologischen Bedingungen vor. Die Phosphorylierungsstellen von Linsen- α B-Crystallin konnten identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die drei Serinreste Ser 19, Ser 45 und Ser 59. In vivo wird α B-Crystallin meistens in einer biphosphorylierten Form isoliert (Chiesa et al.,1987; Voorter et al.,1989). Inwieweit die Phosphorylierung für die Eigenschaft des α B-Crystallins als molecular chaperone eine Rolle spielt bzw. seine Bindungsaffinität zu Zytoskelettkomponenten beeinflusst, ist noch ungeklärt.

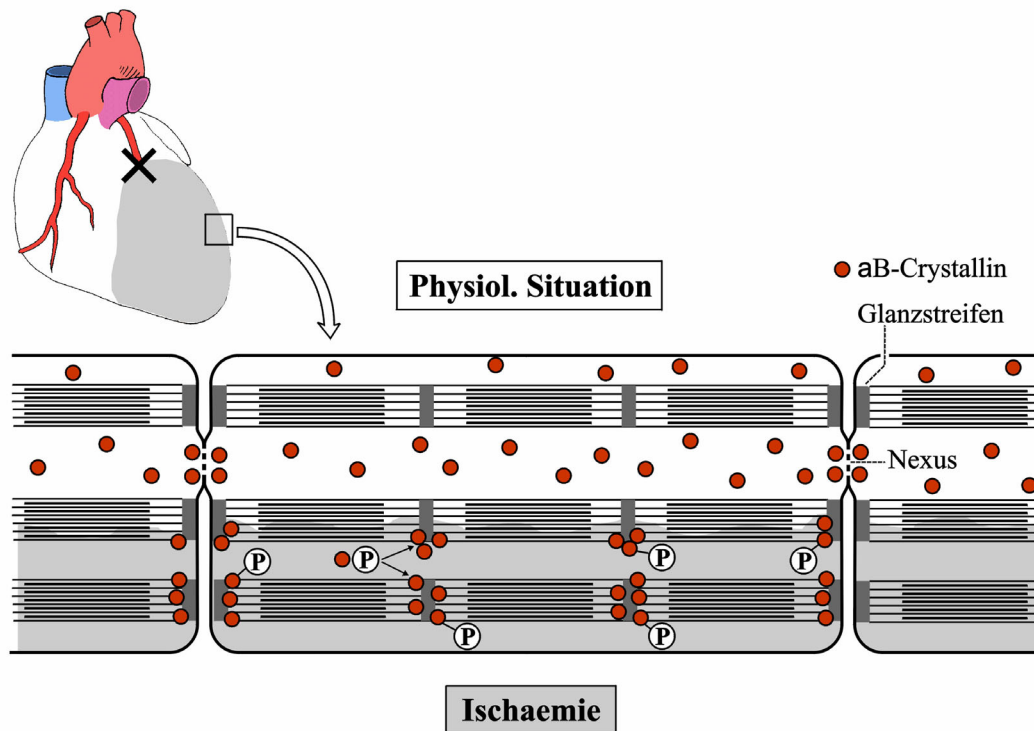


Abb. 3: Schematische Darstellung der Lokalisation von α B-Crystallin im Herzen unter physiologischen Bedingungen sowie unter Ischämie

1.4 Fragestellung

Diese Arbeit basiert auf Beobachtungen, die an Herz-Ischämie-Modellen von Ratte und Schwein gemacht wurden.

Unter Ischämie kommt es zu einer Translokation des konstitutiv in hoher Konzentration vorkommenden Stressproteins α B-Crystallin vom Zytosol an die Myofibrillen. Nach kurzer Ischämie mit reversiblen Zellschaden konnte α B-Crystallin im Z-Scheiben-Bereich lokalisiert werden. Nach länger andauernder Ischämie, die mit starker Überdehnung der Myofibrillen einherging, wurde α B-Crystallin auch beidseits der Z-Scheiben in den I-Banden gefunden (Golenhofen et al., 1998). Durch diese ischämie-bedingte Bindung von α B-Crystallin an Strukturproteine im Z-/I-Bereich könnte α B-Crystallin eine zytoprotektive Wirkung ausüben. Ziel der Arbeit war daher, diese Bindung näher zu untersuchen und potentielle myofibrilläre Bindungspartner zu identifizieren.

Es wurde zunächst versucht, α B-Crystallin im ischämischen Herzen ultrastrukturell zu lokalisieren. Durch Immunogoldmarkierung von α B-Crystallin in Ultradünnschnitten vom ischämischen Herzen stellte sich eine Linie parallel zur Z-Scheibe in der Mitte der halben I-Bande dar, eine Zone, die auch als N-Linie bezeichnet wird. Aus dieser Beobachtung einer Lokalisation von α B-Crystallin unter Ischämie in der I-Bande ließ sich ableiten, dass primär Komponenten der I-Bande, d.h. Aktin und Titin, als Bindungspartner für α B-Crystallin unter Ischämie in Frage kommen.

Im weiteren wurde die Bindungsaffinität von α B-Crystallin an die Myofibrillen näher charakterisiert. Dazu wurden Extraktionsversuche mit unterschiedlichen Salzen bzw. Salzkonzentrationen an Kryostatschnitten des ischämischen Rattenherzens unternommen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse wurden mit Hilfe quantitativer biochemischer Analyse (Western-Blot) verifiziert. Aufgrund der Lokalisation von α B-Crystallin im Z-/I-Bereich konzentrierte ich mich dabei auf die dort lokalisierten Proteine, nämlich Desmin, α -Actinin, Aktin und Titin. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung von α B-Crystallin an Myofibrillen sehr stark ist und Aktin als Bindungspartner unbedeutend ist.

Im weiteren wurde näher auf eine mögliche Interaktion zwischen α B-Crystallin und Titin eingegangen. Titin wurde aus ischämischer Herzmuskulatur gereinigt und auf gebundenes α B-Crystallin untersucht. Dabei konnte eine Kopurifikation von α B-Crystallin und Titin gezeigt werden, was einen ersten Hinweis auf eine Interaktion von α B-Crystallin mit Titin gibt. Anschließend wurden Bindungsstudien zwischen α B-Crystallin und verschiedenen Titindomänen durchgeführt. Dazu wurde natives α B-Crystallin sowie an der Grenze zur I-Bande gelegene Z-Scheiben-, Ig- und die PEVK-Domänen Titins mit Hilfe von in-vitro-Transkription und -Translation hergestellt und in Bindungsstudien mit α B-Crystallin eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 α B-Crystallin-cDNA im Plasmidvektor pRC/CMV

Die 489nt lange cDNA-Sequenz von α B-Crystallin vom Schwein liegt im Plasmidvektor pRC/CMV (Invitrogen, Groningen, Niederlande) vor, in den sie mit den Restriktionsendonukleasen Hind3 und Xba1 kloniert worden war. Für die in-vitro-Transkription einer sense-RNA ist ein flankierender T7-RNA-Promoter vorhanden.

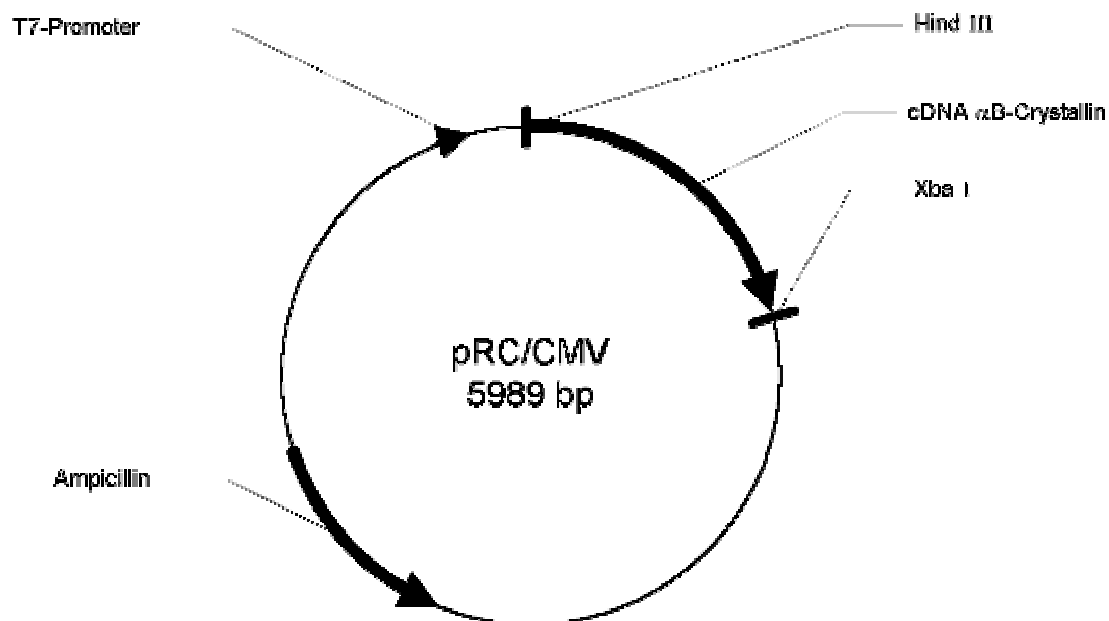


Abb. 4: Schematische Darstellung des rekombinierten Plasmidvektors pRC/CMV

2.1.2 Titin-cDNA im Plasmidvektor pET6h

Mehrere Teilstücke der Titin-cDNA waren 5' über Xho1 und 3' über Mlu1 bzw. BamH1 in einen modifizierten pET8c/3d-Plasmidvektor kloniert worden (erhalten von M. Gautel, EMBL, Heidelberg; Vektor: Novagen Inc., USA). Die zwischen 750 und 1050 nt langen Sequenzen entstammen zum einen der Z-Scheiben Region des Titins und zum anderen dem Bereich der I-Bande. Letztere kodieren entweder nur Abschnitte der Ig-Domänen Titins, oder sie enthalten diese Ig-Abschnitte in Verbindung mit der auch in der I-Bande lokalisierten PEVK-Domäne.

Folgende Titin-Domänen (humanes kardiales Titin) wurden verwendet: Z4Z5 (246 AS), Z6Z7 (273 AS), Z8Z9 (256 AS), Z9Z10 (243 AS), Z10I1 (342 AS), S54-56 (292 AS), I18-I20 (466 AS) (Domänen-Nomenklatur sowie DNA-Sequenzen der einzelnen Domänen: Labeit et al., 1995)

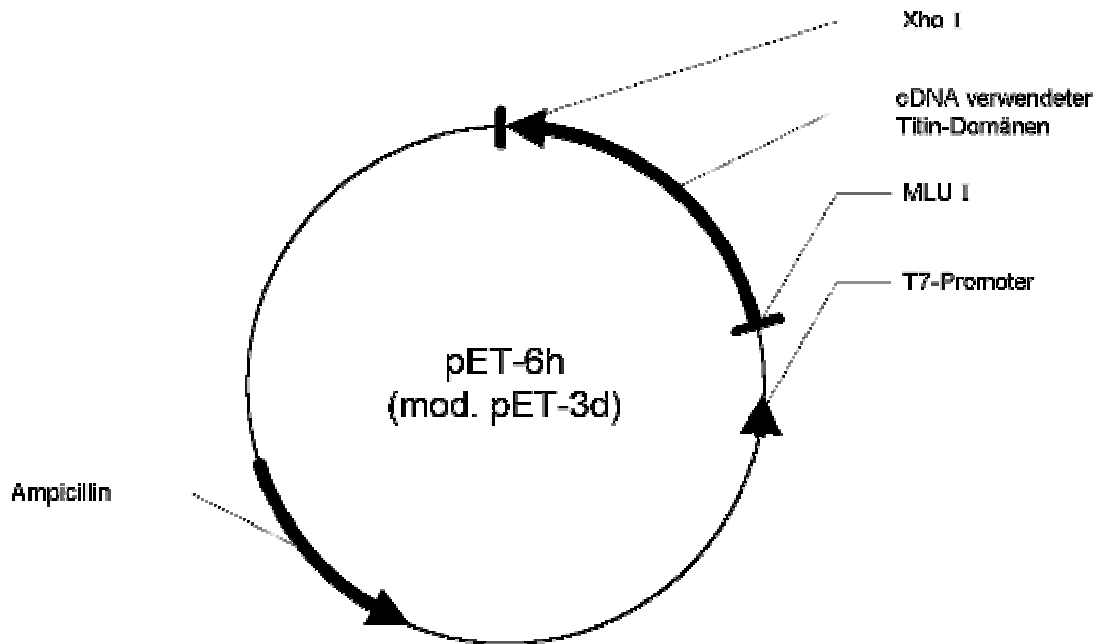


Abb. 5: Schematische Darstellung des rekombinierten Plasmidvektors pET-6h

2.1.3 Detergenzien

Nichtionisch:

Tween 20 Poly(oxyethylenglykol-(20)9-

Fluka, Buchs, Schweiz

Sorbitolmonolaurat

Anionisch:

SDS (Natriumdodecylsulfat)

Serva, Heidelberg

2.1.4 DNA- und Protein-Molekulargewichtsstandards

DNA Molecular Weight Marker 6

Boehringer Mannheim

λ -DNA Eco911

MBI Fermentas

Superladder 100

MBI Fermentas

Eichproteine für die SDS-Gelelektrophorese

Boehringer Mannheim

2.1.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen
Ribonuklease A
T7 RNA-Polymerase

MBI Fermentas
Boehringer Mannheim
MBI Fermentas

2.1.6 Farbstoffe/Reagenzien für die Proteinbestimmung

Coomassie Brilliant Blau G-250
Amidoschwarz
Ponceau S
BioRad-Reagenz

Serva, Heidelberg
Serva, Heidelberg
Sigma, St. Louis, USA
BioRad, Richmond, USA

2.1.7 Immunelektronenmikroskopie

anti- α B-Crystallin-IgG (Kaninchen)
anti-Kaninchen-IgG (Ziege) adsorbiert
an kolloidale Goldpartikel (0,8nm)
LR-White-Kunstharz (Methylmethacrylat)
Nickel-Netzchen (3,05mm)

StressGen, Victoria, Kanada
Aurion, Wageningen, Nieder-
lande
London Resin, England
Plano, Wetzlar

2.1.8 Immunreagenzien/Antikörper

NHS-LC-Biotin
Peroxidase-Streptavidin-Komplex
Rhodamin-markiertes Phalloidin (TRITC-
Phalloidin)
anti-Kaninchen-IgG (Peroxidase-gekoppelt)(Ziege)
anti-Maus-IgM (Peroxidase-gekoppelt)(Ziege)
anti-Kaninchen-IgG (Cy2-;Cy3-markiert) (Ziege)
anti-Aktin-IgM von der Maus (monoklonal)
anti- α -Actinin-IgG (Huhn) vom Kaninchen
(polyklonal)
anti-Desmin-IgG vom Kaninchen (polyklonal)

anti- α B-Crystallin-IgG (Rind) vom Kaninchen
(polyklonal)
anti- α B-Crystallin-IgG vom Kaninchen
(polyklonal)
anti-Titin-IgG (T12) von der Maus
(monoklonal)

Pierce, Rockford, USA
Jackson ImmunoResearch Lab.
Sigma, St. Louis, USA

Jackson ImmunoResearch Lab.
Jackson ImmunoResearch Lab.
Jackson ImmunoResearch Lab.
Amersham, UK
AG Drenckhahn (Drenckhahn
et al.,1983)
AG Drenckhahn (Nehls et
al.,1992)
AG Drenckhahn (Golenhofen
et al.,1998)
StressGen Biotechnologies
Corp., Victoria, Kanada
AG Fürst, MPI, Göttingen (Fürst
et al.,1988)

2.1.9 Proteaseinhibitoren

Serinproteaseinhibitoren:

Aprotinin

Boehringer Mannheim

Serin- und Thiolproteaseinhibitoren:

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

Serva, Heidelberg

Leupeptin

Boehringer Mannheim

Saure Proteaseinhibitoren:

Pepstatin A

Sigma, St. Louis, USA

Metallproteaseinhibitoren:

EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure Dinatriumsalz)

Merck, Darmstadt

2.1.10 Proteine

α B-Crystallin vom Rind (Linse) (MW 21kD)

AG Drenckhahn

F-Aktin vom Rinderherz (MW 42kD)

AG Drenckhahn

BSA (Bovine Serum Albumin)

Serva, Heidelberg

Desmin vom Hamster (MW 53kD)

AG Traub, Ladenburg

Magermilchpulver

Molkerei Feldental

Titin vom Schweineherz (MW 3000kD)

AG Drenckhahn

2.1.11 Puffer/Medien

Harnstoffpuffer:

2 M Harnstoff

100 mM Glycin

1 % TritonX-100

Hochsalzpuffer:

1 M NaCl in PBS

LB-Medium (Luria Bertani):

10 g/l NaCl

5 g/l Baktohefeextrakt

10 g/l Baktotrypton

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) (pH: 7,4):

0,137 M NaCl

2,7 mM KCl

8,1 mM Na_2HPO_4

1,5 mM KH_2PO_4

Phosphatpuffer (11mM) (pH: 7,4):

9,5 mM Na_2HPO_4

1,5 mM NaH_2PO_4

SOB-Medium:

0,5 g/l NaCl

10 g/l Baktohefeextrakt

16 g/l Baktotrypton

TBE (pH: 8,3):

89 mM Tris

	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA
TE-Puffer (Tris-EDTA) (pH: 8,0)	10 mM	Tris
	0,1 mM	EDTA

2.1.12 Reagenzien für Immunreplik und Autoradiographie

Amplify	Amersham, UK
Nitrozellulosepapier 0,45	Schleicher&Schüll
Perhydrol (30% H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Röntgenfilm X-OMAT AR 13x18 cm	Kodak, Rochester, USA
Röntgen-Entwicklerkonzentrat	Adefo-Chemie, Nürnberg
Röntgen-Fixierkonzentrat	Adefo-Chemie, Nürnberg

2.1.13 Reagenzien für Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Acrylamid	BioRad, Richmond, USA
N,N'Methylenbisacrylamid	BioRad, Richmond, USA
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	BioRad, Richmond, USA
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	BioRad, Richmond, USA
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg

2.1.14 Reaktionskits

ECL Random Prime Labelling and Detection Systems	Amersham, UK
m ⁷ G(5')ppp(5')G (Capping-Reagenz)	Boehringer Mannheim
Quiagen Plasmid-Maxi-Kit	Quiagen, Hilden
Quiaprep-spin Plasmid-Kit	Quiagen, Hilden
SP6/T7 Transcription-Kit	Boehringer Mannheim
Translation-Kit, Retikulozyten Typ1	Boehringer Mannheim

2.1.15 Sulfhydryl-Reagenzien

Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
DTE (Dithioerythritol)	Sigma, St. Louis, USA
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, St. Louis, USA

2.1.16 Sonstiges

Ampicillin	Boehringer Mannheim
------------	---------------------

DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, St. Louis, USA
Dialyseschläuche verschiedener Breite	Spectrum Medical Industries, Houston, USA
Di-methyl-di-Chlor-Silan-Lösung	Sigma, St. Louis, USA
NGS (normal goat serum)	Sigma, St. Louis, USA
Nickel-Netzchen (3,05mm;100mesh)	Athene, Plano, Wetzlar
N-Propyl-Gallat	Fluka, Buchs, Schweiz
Poly-L-Lysin	Sigma, St. Louis, USA
RotiSzintEcoPlus	Roth GMBH, Karlsruhe

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Von einer Glycerinstammlösung gewonnenes Bakterienmaterial wurde auf einer LB- oder M9-Agarplatte ausgestrichen. Aufgrund der Tetracyclinresistenz von E.coli XL1-Blue wurde dem Agar Tetracyclin in einer Endkonzentration von 15µg/ml zugesetzt. Nach 24 h Bebrütung wurde aus einer Einzelkolonie eine Übernachtschüttelkultur in LB-Medium angeimpft. 0,5ml der daraus hervorgehenden Bakteriensuspension wurde benutzt zum Animpfen einer 100ml Schüttelkultur in SOB-Medium. Dazu wurde ein 2l Kolben verwendet, dessen großes Volumen ein rasches Wachstum der Bakterien ermöglicht. SOB-Medium wurde dem LB-Medium hier vorgezogen, da es reichhaltiger ist und das Wachstum der Bakterien fördert. Mit Hilfe der Dichtebestimmung der Bakterien im Photometer (Extinktion bei $\lambda=578\text{nm}$) wurde der optimale Zeitpunkt zur Weiterverarbeitung abgewartet ($\text{OD}=0,3-0,4$). Dieser liegt noch in der logarithmischen Wachstumsphase, in der – trotz bereits relativ hoher Bakteriendichte - die Zellwände noch dünn sind, was für die Transformation von Vorteil ist.

Die Bakterien wurden in 2 sterile 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben, 15min auf Eis inkubiert und 15min bei 750-1000g und 4°C abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 33,5ml Lsg.1 resuspendiert, 15min auf Eis inkubiert und unter den gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde nun in 8ml Lsg.2 resuspendiert und in gekühlte Eppendorfgefäße zu je 100-200µl portioniert. Die Caps wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Ausbeute nach einer Transformation mit nach diesem Protokoll hergestellten kompetenten Bakterien betrug bis zu 10^7 Kolonien/µg transformierter Plasmid-DNA.

Lsg.1: 100,00mM RbCl₂
30,00mM MnCl₂
50,00mM K⁺-Acetat, pH7
15%(w/v) Glycerin

Lsg.2: 10,00mM MOPS
10,00mM RbCl
75mM CaCl₂x2H₂O
15%(w/v) Glycerin

2.2.2 Transformation kompetenter E.coli-Bakterien

(Sambrook et al.,1989; Kapitel 1.74-1.84)

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von ca. 1ng DNA für 30-60min auf Eis inkubiert. Damit die DNA, die sich in dieser Zeit an die Zellwände angelagert hatte, in die Zellen gelangen konnte, wurden die Zellwände mittels Hitzeschock (90sec, 42°C) geschädigt. Im 37°C-Bad vorgewärmtes LB-Medium ohne Ampicillin wurde zugesetzt, und die Bakterien wurden 30min im 37°C-Raum geschüttelt. Anschließend wurden sie auf einer mit Ampicillin versetzten (50µg/ml) Agar-Platte ausplattiert.

2.2.3 Schnelle Plasmidpräparation (Miniprep/Ammoniumacetatmethode)

(Sambrook et al.,1989; Kapitel 1.25-1.28)

GTE-Lösung: 50 mM Glukose
25 mM Tris-HCl (pH8)
10 mM EDTA (pH8)

Alkali-Lösung: 0,2N NaOH
1 % SDS

3ml ampicillinhaltiges (50µg/ml) LB-Medium wurde aus einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1,5ml der Bakteriensuspension wurden in einem Eppendorfgefäß bei 12000g (20sec) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 200µl GTE-Puffer resuspendiert. Dann erfolgte die Lyse der Bakterien durch Zugabe von 400µl Alkali-Lösung. Es ist zu beachten, dass die genomische DNA hierbei nicht so großen Scherkräften ausgesetzt wird, dass sie zerbricht und die Plasmid-DNA kontaminiert.

Die Reaktion wurde nach 5min Inkubation durch Zugabe von 300µl kaltem Ammoniumacetat gestoppt. Nach gründlichem Durchmischen wurde sie 10min bei 12000g abzentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen an 100%igem Isopropanol überschichtet und anschließend 10min bei 12000g abzentrifugiert. Der Überstand nun wurde verworfen, das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 50µl TE aufgenommen.

Es wurden mit dieser Präparation bis zu 5µg DNA/1,5ml Übernachtskultur erreicht.

2.2.4 Schnelle Plasmidpräparation 2 (Mini-Prep)

Dieses Protokoll der Plasmid-DNA-Präparation folgte der Vorschrift für den „Quiaprep-spin Plasmid Kit“. Mit Hilfe dieses Ansatzes erreichte man bis zu 20µg Plasmid-DNA pro 1,5ml Übernachtskultur.

2.2.5 Phenolextraktion

(Sambrook et al.,1989; Kapitel 8.58)

Die Phenolextraktion dient der Entfernung von Proteinverunreinigungen aus der DNA-Präparation. Zunächst verdünnte man konzentrierte DNA-Proben, um den DNA-Verlust möglichst gering zu halten.

100µl der DNA-Lösung wurden mit 50µl Phenol (TE gesättigt) und 50µl Chloroform/Isoamylalkohol 1:24 (TE gesättigt) gründlich vermischt und 5min bei 12000g zentrifugiert. Man erhielt zwei getrennte Phasen, von denen die obere abgenommen und erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol versetzt wurde, was die Extraktion noch verbliebenen Phenols zur Folge hatte.

2.2.6 Quantifizierung der DNA

Bei der DNA-Mengenbestimmung machte man sich deren Extinktionsmaxima bei $\lambda=260\text{nm}$ und 280nm zu Nutze. Da auch Proteine ein Extinktionsmaximum bei $\lambda=280\text{nm}$ haben, verwendete man die Messung bei dieser Wellenlänge, um den Grad der Proteinverunreinigung zu bestimmen. Die Quantifizierung der DNA erfolgte bei 260nm .

Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette bei einer Verdünnung von 1:40 mit einem Endvolumen von 400µl.

Referenzwerte:

<u>1 OD (optische Dichte):</u>	dsDNA	= 50µg/ml
	RNA	= 40µg/ml
	Oligonukleotide	= 20µg/ml

DNA-Mengen, die für die Photometermessung zu gering waren, wurden anhand ihrer Banden im Agarosegel abgeschätzt, wobei der Längenstandard mit definierter DNA-Menge (1µg dsDNA pro Spur) als Referenzwert hinzugezogen wurde.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

2.2.7.1 DNA-Agarosegel

(Sambrook et al., 1989; Kapitel 6.11-6.12)

Probenpuffer (6x): 1 mM EDTA
 50,00% Glycerol
 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylenxyanolblau

Zur Auftrennung der DNA-Proben wurden Agarosegele verwandt. Die Agarosekonzentration betrug 1% in TBE, als Laufpuffer diente TBE. Die Proben wurden, mit Probenpuffer im Verhältnis 1:2 versetzt, aufgetragen. Der DNA-Marker wurde vor dem Auftragen 5min bei 68°C erhitzt. Es wurde eine Spannung von 80V angelegt.

2.2.7.2 RNA-Agarosegel

Probenpuffer (6x): 1 mM EDTA
 50,00% Glycerol
 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylencyanol

Laufpuffer (5x): 0,2 M MOPS (Morpholinoethansulfonsäure)
 50 mM Natriumacetat
 5 mM EDTA (pH8,0)

0,2g Agarose wurden in 12,5ml sterilem H₂O aufgeköcht. Das H₂O wurde zuvor mit DEPC in einer Konzentration von 0,05% versetzt, um RNAsen zu inhibieren. Der Lösung wurden 4ml Laufpuffer (5x) und 3,5ml 37%iges Formalin hinzugefügt. Anschließend wurde sie in einen Schlitten gegossen.

Nach Zentrifugation der RNA-Probe wurde das Sediment in 2,3µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst. Dann wurden 1µl Laufpuffer (5x), 4µl deionisiertes Formamid und 1µl Formaldehyd

hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 10min bei 65°C wurden die Proben mit 1µl 0,1%igem Ethidiumbromid und 2µl Probenpuffer für RNA versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 40V.

2.2.8 Färben der Agarosegele mit Ethidiumbromid

(Sambrook et al.,1989; Kapitel 6.15)

Ethidiumbromid absorbiert UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=302\text{nm}$ und $\lambda=366\text{nm}$, es reflektiert rot-oranges Licht bei $\lambda=590\text{nm}$. Über eine planare Gruppe besitzt es die Möglichkeit mit den Basen der DNA zu interkalieren. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA wurden die Gele 30min bei Raumtemperatur in 0,5% Ethidiumbromidlösung inkubiert und danach bei UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=302\text{nm}$ betrachtet bzw. fotografiert.

2.2.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

(Sambrook et al.,1989; Kapitel 6.30)

Ein 500µl Eppendorfgefäß, in dessen Boden ein Loch gebohrt worden war, wurde mit silanisierter Glaswolle gefüllt. Das darauf gegebene Gelstück sollte auf diese Weise am Passieren des Loches gehindert werden, nicht dagegen die darin enthaltene DNA. Das Gefäß wurde in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gestellt und 30min bei 6000rpm zentrifugiert. Die DNA wurde so in das untere Eppendorfcap gesaugt, im Anschluß daran gefällt und in 10µl H₂O aufgenommen. Ein auf ein Agarosegel aufgetragenes Aliquot diente der Quantifizierung der erhaltenen DNA-Menge.

2.2.10 DNA-Fällung

Fügt man Salze zu gelöster DNA hinzu, so fällt diese aus, da die Salze der DNA das Lösungswasser entziehen.

Als Salzlösung verwendet wurden einerseits (-für das Fällen von DNA-) Ammoniumchlorid in einer Endkonzentration von 2,5M (Stammlösung: 7,5M) und andererseits (-für die RNA-Fällung-) Natriumacetat in einer Endkonzentration von 0,3M (Stammlösung: 3M).

Neben der Salzlösung wurde dann ca. das dreifache Volumen 100%igen Ethanols zu der gelösten DNA hinzugegeben, gemischt und bei -20°C 1h inkubiert.

Danach erfolgte die Zentrifugation bei 15000rpm für 10min in der Eppendorfzentrifuge. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 70%igem Ethanol von mitgefällten Salzen gereinigt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Alkohol abgesaugt. Das Sediment wurde in TE oder H₂O aufgenommen.

2.2.11 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

(Sambrook et al., 1989; Kapitel 5.3)

Bei den eingesetzten Restriktionsendonukleasen handelte es sich um Enzyme, die spezifische palindromische Basensequenzen einer Doppelstrang-DNA erkennen und die DNA an dieser Stelle schneiden, wobei überlappende Enden entstehen. Diese Sequenzen haben im allgemeinen eine Länge von 4-6 Basenpaaren.

Verwendet wurden diese Enzyme in einer Konzentration von 1-5 Einheiten pro μg DNA in den zugehörigen Puffern. Der Verdau erfolgte bei 37°C für mindestens 1h.

2.2.12 DEPC-Behandlung zur Inhibition von RNAsen

(Sambrook et al., 1989; Kapitel 7.30)

DEPC (Diethylpyrocarbonat) wurde als potenter, aber auch sehr giftiger RNase-Inhibitor zur Behandlung aller, in Experimente mit RNA involvierter, Gegenstände und Lösungen eingesetzt. Diese wurden dazu für mindestens 2h bei Raumtemperatur in einer 0,05%igen DEPC-Lösung eingeweicht bzw. mit derselben versetzt. Anschließend wurden sie autoklaviert, wobei auch das DEPC selbst zerstört wird.

2.2.13 In-vitro-Transkription

Um Transkripte definierter Länge zu erhalten, muß die Template-DNA vor der Transkriptionsreaktion mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert werden. Ansonsten erhält man heterogene Transkripte bis zu mehrfacher Plasmidlänge. Die verwendeten rekombinierten Plasmide wurden mit Hilfe der Enzyme MluI, BamHI und PstI verdaut. $1\mu\text{g}$ der linearisierten DNA wurden mit 20 Einheiten T7-RNA-Polymerase, 10nmol ATP, CTP, UTP, 2nmol GTP, 5 Einheiten M7G(5')ppp(5')G (Capping-Reagenz), 12,5 Einheiten RNase-Inhibitor und $2\mu\text{l}$ Transkriptionspuffer (Boehringer Mannheim) versetzt. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von $20\mu\text{l}$ wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Durch Behandlung (15min Inkubation bei 37°C) des Ansatzes mit 5 Einheiten DNaseI, RNase frei wurde die Matritzen-DNA entfernt. Die Reaktion ließ sich durch Erhitzen auf 65°C stoppen.

Das Cap, mit dem die synthetisierte RNA versehen wurde, diente dazu, das Andocken der RNA an die Ribosomen des Retikulozytenlysats im nachfolgenden Translationsschritt zu erleichtern. Die Transkripte wurden anhand der Gelelektrophorese auf ihre Größe hin untersucht.

2.2.14 In-vitro-Translation

(Krawetz et al., 1983)

Die Translation der mRNA erfolgte mit Hilfe eines zellfreien Protein-synthetisierenden Systems, dem Retikulozytenlysat vom Kaninchen (Boehringer Mannheim). Hierbei wird mRNA in Gegenwart einer radioaktiv-markierten Aminosäure in Protein übersetzt.

<u>Translations-Reaktionsgemisch:</u>	312,5	µM	aller 19 Aminosäuren (außer Methionin)
	37,5	mM	Fruktose-1,6-bisphosphat
	30	M	cAMP
	12,5	mM	GTP
	100	mM	Creatinphosphat
	6,25	mM	Spermidin
	25	mM	Dithiothreitol
	250	mM	HEPES (pH7,6)

Die Markierung erfolgte durch [³⁵S]-Methionin (10µCi/Ansatz). Als optimal für den Einbau der radioaktiv markierten Aminosäure wurde eine Endkonzentration von 50mM Kaliumacetat und 1mM Magnesiumacetat ermittelt. Dazu wurden 2µl des oben beschriebenen Translations-Reaktionsgemisches sowie 2µl des Transkriptionsansatzes pipettiert, was für eine wirksame Stimulation der Translation ausreichend war. Steigende Mengen an Transkriptionsansatz führten zur Reduktion der Translationsaktivität, was auf das im Überschuß vorhandene m⁷G(5')ppp(5')G und Magnesium zurückzuführen war. Dem Translationsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 15µl wurden 10µl des frisch aufgetauten Retikulozytenlysates hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C über 90min.

Das Translatat wurde überprüft durch das Auftragen eines Aliquots auf ein SDS-Gel. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst in einer Lösung aus Ethanol, Wasser und Essigsäure im Verhältnis 25:65:10 für 30min fixiert. Danach erfolgte die Behandlung mit Amplify, einem die Radiolumineszenz verstärkenden und konservierenden Reagenz, für weitere 20min. Das Gel wurde daraufhin getrocknet und einem Röntgenfilm gegenüber exponiert.

Über die mittels der Autoradiographie jetzt auf dem Gel lokalisierbaren Banden konnte dann das Translationsergebnis im Szintillationszähler quantifiziert werden.

2.2.15 Quantifizierung der radioaktiven Zerfälle im Szintillationszähler

Der für das Auszählen der radioaktiven Zerfälle benutzte Szintillationszähler stammte von der Firma BECKMANN Typ LS 7000.

Die Banden der translatierten Proteine, die mit Hilfe der Autoradiographie im SDS-Gel lokalisiert werden konnten, wurden ausgeschnitten und in ein 20ml Szintillationsgefäß gegeben. 10ml einer Szintillationsflüssigkeit (RotiSzint Eco Plus, Firma Roth), die aus einem Lösungsmittel wie z.B. PPO (2,5-Diphenyloxazol) und einem fluoreszierenden Molekül wie POPOP (1,4-bis(5-phenyloxazol-2yl)benzene) zusammengesetzt ist, wurden hinzugefügt. Diese beiden Stoffe werden durch die β -Strahlung des Translatats angeregt, woraufhin die angeregten fluoreszierenden Moleküle Licht emittieren. Dieses Licht wird in einem Photonenverstärker (PMT=Photomultiplier-Tube) verstärkt und danach in elektrische Energie umgewandelt.

In Abhängigkeit von Verunreinigungen oder Farbstoffen in den einzelnen Proben ist die Übertragung der kinetischen Energie der [^{35}S]-Strahlung auf die fluoreszierenden Moleküle unterschiedlich groß. Die Zähltechnik beruht aber auf eben dieser Energieübertragung, deren Effizienz gemessen wird. Dazu wird von dem Zähler für jede Probe mittels eines eingebauten Radioaktivitätsstandards der sogenannte H-Wert ermittelt, ein Maß für den Unterschied zwischen gemessener und tatsächlicher Radioaktivität. Jedem H-Wert entspricht dann ein mit Hilfe einer „Quenchkurve“ ermittelter Wert, der angibt, wieviel Prozent der tatsächlichen Zerfallsmenge gemessen worden ist.

Um die Hintergrundaktivität des Zählgerätes, vor allem im Bereich des Photonenverstärkers, quantifizieren und mit den Meßwerten in Einklang bringen zu können, wurden außerdem für jede Messung drei Leerwerte bestimmt.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinextraktionsversuche am Herz mit Hilfe unterschiedlicher Salzlösungen

Männliche Wistar-Ratten (2-3 Monate alt) wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Herzen wurden entnommen und bei 37°C für 30min in PBS inkubiert. Mehrere Herzmuskelstückchen mit einem Durchmesser von etwa 3mm wurden dem Ventrikel entnommen und unter fortwährender Kühlung in 5ml PBS homogenisiert (Braun Homogenisator). Zum Schutz vor Degradierung der Proteine wurden der Lösung Proteaseinhibitoren zugesetzt (Aprotinin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Leupeptin 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Pepstatin 0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$; PMSF 1mM). Gleiche Aliquots (200 μl) des Homogenats wurden bei 3000g für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in jeweils 1ml unterschiedlicher Salzlösungen resuspendiert. Folgende Salzlösungen in 10mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden eingesetzt: 140mM NaCl als Kontrollexperiment, eine 1M KCl-Lösung, eine Lösung von NaSCN in den

Konzentrationen 1M, 2M und 4M und 1-, 2- und 4-molare Harnstofflösungen. Anschließend wurden die Homogenate für 15min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und 10min bei 3000g abzentrifugiert. Dieser Extraktionsvorgang wurde einmal wiederholt. Das Sediment wurde mit SDS-haltigem Probenpuffer (s.u.) versetzt und so die Proteine durch SDS denaturiert. Anschließend wurden Aliquots von den Sedimenten auf ein SDS-Gel aufgetragen. Mittels Immunreplikanalyse wurden nun die Mengen ausgewählter Proteine, nämlich Aktin, α -Actinin, α B-Crystallin und Desmin in den einzelnen Sedimenten bestimmt. Daraus ergab sich der Grad der Extrahierbarkeit der einzelnen Proteine durch die verschiedenen Salze bzw. deren unterschiedliche Konzentrationen.

2.3.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford

Eine Möglichkeit der Bestimmung der Konzentration einer Proteinlösung ist die Methode nach Bradford (1976). Es wurden dazu 20 μ l der Proteinlösung in eine Plastikkuvette pipettiert und 1ml Bradfordreagenz hinzugefügt. Dieses bildet mit Proteingruppen einen blauen Komplex, der mit Hilfe des Photometers bei $\lambda=595\text{nm}$ quantifiziert wurde. Standardisierte BSA-Proben wurden für die Erstellung einer Eichkurve verwendet.

2.3.3 Amidoschwarz-Proteinbestimmung

Diese Methode der Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Bindung von Amidoschwarz an freie N-terminale Proteingruppen. Auf diese Weise kann auch die Konzentration von denaturiertem Protein bestimmt werden, so z.B. bei Proben mit hohem Salzgehalt oder in Anwesenheit von Detergenzien und SDS. Auch auf Trägermaterialien wie Nitrozellulose immobilisierte Proteine sowie Proteinagglomerate werden mit dieser Methode erfaßt.

2.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Anderson und Peterson, 1981)

Mittels der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden gelöste Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt.

<u>Probenpuffer (3x):</u>	125,000	mM	Tris-HCl (pH6,8)
	10,000	%	Glycerin
	2,000	%	SDS
	0,001	%	Bromphenolblau
	0,500	%	Dithiothreit

<u>Gelelektrophoresepuffer (5x):</u>	70,0 mM	SDS
	125,0 mM	Tris
	7,2 %	Glycerin (w/v)

Durch Bindung an SDS werden die Proteine negativ geladen und denaturiert, so dass sie in gestrecktem Zustand das Gel durchwandern.

Die Proteinlösungen wurden vorher im Verhältnis 2:1 mit Probenpuffer (3x) versetzt und 5min bei 95°C erhitzt.

Ein Minigel der Größe 6x8cm setzte sich zusammen aus dem Trenngel, für das eine Polyacrylamidkonzentration von 10 bzw. 13% gewählt wurde, und dem ca. 1,5cm breiten Sammelgel mit einer Polyacrylamidkonzentration von 5%, das sich dem Trenngel nach oben hin anschloß.

Das Sammelgel wurde mit einer Spannung von 80V durchlaufen, das Durchlaufen des Trenngels erfolgte bei 200V.

2.3.5 Gesamtproteinfärbung der Polyacrylamidgele

(Anderson und Peterson,1981)

Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurden die Proteingele bei Raumtemperatur für 30min mit einer Coomassie Blau enthaltenden Färbelösung gefärbt. Der Hintergrund wurde anschließend mit einer Entfärbelösung entfärbt.

<u>Färbelösung:</u>	0,25 %	Coomassie Blau G-250
	45,00 %	2-Propanol
	10,00 %	Essigsäure

<u>Entfärbelösung:</u>	10,00 %	Essigsäure
	7,50 %	2-Propanol

2.3.6 Immunreplikanalyse

(Towbin,1979; Burnette,1981)

Bei diesem Verfahren werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose überführt.

<u>Anodenpuffer1:</u>	30,00 mM	Tris
	20,00 %	Ethanol
<u>Anodenpuffer2:</u>	25,00 mM	Tris
	20,00 %	Ethanol

Kathodenpuffer: 25,00 mM Tris
 55,30 mM Aminocaprinsäure
 20,00 % Ethanol

Es wurde ein Semi-dry-Verfahren angewendet. Für den Proteintransfer wurde ein Elektrotransferapparat (BioRad, München) benutzt sowie mehrere Lagen Whatman-Papier, das in den oben beschriebenen Puffern getränkt wurde. Die Stromstärke belief sich auf 0,78mA pro cm² Nitrozellulose bei einer Transferzeit von 90-180 min abhängig von der Größe der zu transferierenden Proteine. Die Proteinbanden wurden mittels PonceauS-Färbung auf der Nitrozellulose sichtbar gemacht, die einzelnen Spuren konnten nun ausgeschnitten werden. Die Ponceau-Färbung ließ sich durch PBS entfernen, die Nitrozellulosestreifen wurden dann bei Raumtemperatur für 3h mit 5% Magermilch abgesättigt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Nitrozellulose jeweils mit den verschiedenen Erstantikörpern bei 4°C über Nacht. Die einzelnen Erstantikörper wurden dabei wie folgt eingesetzt (die Verdünnung erfolgte mit 5%iger Magermilch in PBS-Tween 0,1%):

Anti- α -Actinin-Antikörper vom Kaninchen (polyklonal): 1:1500

Anti- α B-Crystallin-Antikörper vom Kaninchen (polyklonal): 1:1500

Anti-pan-Aktin-Antikörper von der Maus (monoklonal): 1:1000

Anti-Desmin-Antikörper vom Kaninchen (polyklonal): 1:1500

Die Nitrozellulose wurde dreimal für 5min mit PBS-Tween 0,05% gewaschen und im Anschluß daran 1h bei Raumtemperatur mit einem Zweitantikörper inkubiert. Diese Zweitantikörper von der Ziege, die gegen das Fc-Fragment des jeweiligen Erstantikörpers gerichtet waren, wurden in einer Verdünnung von 1:3000 in 5%iger Magermilch eingesetzt. Nach dieser zweiten Inkubation wurde die Nitrozellulose erneut nach dem obigen Schema gewaschen. Die verwendeten Zweitantikörper sind gekoppelt an eine Peroxidase, durch die Luminol mit Hilfe eines bestimmten Katalysators (ECL-Detection-Kit, Amersham, Braunschweig) oxidiert und H₂O₂ reduziert wird. Die dabei freigesetzten Lichtquanten können Röntgenfilme schwärzen.

Unspezifische Bindungsereignisse konnten durch eine Behandlung der Nitrozellulose mit Hochsalzpuffer und Harnstoffpuffer für jeweils 5min reduziert werden.

Als Referenzwerte wurden Proteinstandards für die SDS-Gelelektrophorese der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Diese Proteine sind biotinyliert und wurden, wie unten beschrieben, über die Bindung an Streptavidin-Peroxidase-Komplex und die damit verbundene Möglichkeit, Luminol unter Emission von Licht zu spalten, nachgewiesen.

2.3.7 Gradienten-Gelelektrophorese

Proteine mit einem sehr hohen Molekulargewicht wie z.B. Titin mit einem Molekulargewicht von 3 Millionen können mit herkömmlichen SDS-Gelen aufgrund ihrer Größe nicht aufgetrennt werden. Die Porengröße ist so klein, dass das Protein nicht in das Gel hineinlaufen kann. In diesem Fall verwendeten wir lineare Gradientengele (2-13% Acrylamid, 0,5% N,N'-Methylenbisacrylamid). Die geringe N,N'-Methylenbisacrylamidkonzentration bzw. die dadurch bedingte geringere Quervernetzung der Acrylamidmoleküle ermöglicht es, dass auch Moleküle von der Größe Titins die Poren passieren und damit im Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden können.

Der Gradient (2-13%) wurde hergestellt unter Verwendung einer Pumpe der Firma Gieson, die die beiden verwendeten 2 und 13%igen Polyacrylamidlösungen unter Ausbildung eines nach oben hin abnehmenden Gradienten in die Gelkammer pumpt.

2.3.8 Biotinylierung von Proteinen

Biotin-N-hydroxysuccimidester (Biotin-NHS) ist ein aktivierter Ester, der mit Aminogruppen Peptidbindungen eingeht. Proteine weisen insbesondere am N-Terminus und an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin Aminogruppen auf. Die Aminogruppen bedingen, dass diese Aminosäuren bei neutralem pH größtenteils protoniert vorliegen. Für den nukleophilen Angriff der Amine an dem Ester ist jedoch eine hohe negative Ladungsdichte am Stickstoffatom notwendig, das bedeutet, dass die Aminogruppen in der deprotonierten Form vorliegen müssen, was in leicht basischem Milieu der Fall ist.

1ml der jeweiligen Proteinlösung wurde gegen 25mM Boratpuffer (pH8,5) dialysiert. Anschließend wurde sie mit einem zehnfachen Überschuß an Biotin-NHS versetzt und für 2h bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher Durchmischung inkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die Reaktion wurde mit 10µl gesättigter Glycinlösung oder 50µl 1M Ammoniumchlorid abgestoppt. Es folgte die Dialyse der Proteinlösung gegen PBS.

2.3.9 Herstellung von Dot-Blots für Bindungsassays

Dot Blots entsprechen auf Nitrozellulose aufgetropften Proteinen. Für das Auftropfen der Proteine wurde ein Auftropfdosiergerät der Firma Keutz (Reiskirchen, Deutschland) verwendet, das die entsprechenden Proteine mittels leichten Wasserstrahlvakuums in die Nitrozellulose saugte. Färbung der Nitrozellulose mit PonceauS diente zur Erfolgskontrolle. Nach Entfärben der Nitrozellulose mit PBS wurde sie für 3h bei Raumtemperatur mit 5%iger Magermilch abgesättigt.

Für die Proteinbindungsstudien zwischen α B-Crystallin und den in vitro translatierten Titinsequenzabschnitten wurden α B-Crystallin sowie BSA (als Negativkontrolle) in einer Menge

von jeweils 2µg auf der Nitrozellulose vorgelegt. Die Inkubation mit den in vitro translatierten, radioaktiv markierten Titin-Domänen sowie mit dem translatierten αB-Crystallin (als Positivkontrolle) erfolgte bei 37°C für 15min, dabei wurden identische Mengen (Quantifizierung der Zerfälle im Szintillationszähler) an translatiertem Protein eingesetzt. Für die in-vitro-Bindungsassays zwischen biotinyliertem αB-Crystallin und den zytoskeletalen Proteinen Aktin, Desmin, Titin sowie αB-Crystallin und BSA (als Negativkontrolle) wurde jeweils eine Proteinmenge von 2,5µg auf der Nitrozellulose immobilisiert. Die Dot Blots wurden 15min lang bei 37°C mit biotinyliertem αB-Crystallin in einer Konzentration von 5µg/ml inkubiert.

Im Anschluß daran wurden die Dot Blots dreimal 20min mit PBS gewaschen, um unspezifische Bindungsereignisse zu reduzieren. Bei den Proteinen, mit denen die Inkubation vorgenommen wurde, handelte es sich zum einen um Proteine, die durch in-vitro-Translation hergestellt und dabei radioaktiv markiert worden waren. Zum anderen wurden gereinigte Proteine eingesetzt, die zuvor biotinyliert worden waren. Damit war die Möglichkeit gegeben, stattgefunden Bindungsereignisse durch eine durch radioaktiven Zerfall bedingte Schwärzung des Röntgenfilms zu detektieren. Die Bindung biotinylierter Proteine wurden nach 1h Inkubation der Dot Blots mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex in einer Verdünnung von 1:1000 bei Raumtemperatur mit Hilfe des ECL-Detection-Kit (Amersham,UK) nachgewiesen.

Dabei reagiert Biotin mit Streptavidin eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes, so dass über diesen Komplex biotinylierte Proteine gebunden werden können. Die Peroxidase kann aufgrund ihrer Fähigkeit, Luminol in 3-Aminophthalat umzuwandeln - eine Reaktion, bei der Lichtquanten freigesetzt werden - nachgewiesen werden. Katalysiert wurde diese Reaktion durch 30µl 30%igen Wasserstoffperoxids.

2.4 Immunzytochemie

2.4.1 Charakterisierung der Bindungsaffinität verschiedener Proteine anhand von Kroystatschnitten

Männliche Wistar-Ratten (2-3 Monate alt) wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Herzen wurden entnommen und zur Simulation einer Ischämie für 30min bei 37°C in PBS inkubiert. Aus der Ventrikelregion wurden Gewebelöckchen mit einem Durchmesser von ca. 5mm entnommen, die in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Bei einem Teil der Herzen wurde die Gewebeentnahme direkt nach dem Tod der Ratten vorgenommen. Diese Gewebeproben dienten Kontrollzwecken. Bei dem Rest der Tiere war vor die Gewinnung der Blöckchen eine 30min Ischämieperiode vorgeschaltet.

Am Kryostat vom Typ2800, Frigocut E der Firma Reichert-Jung, Nußloch wurden bei -20°C 5µm dicke Schnitte der Herzmuskulatur angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Im direkten Anschluß daran, ohne dass die Kryostatschnitte bereits zu sehr angetrocknet waren,

wurden diese der Behandlung mit verschiedenen Salzlösungen unterzogen, welche die Extraktion der Herzmuskelproteine zum Ziel hatte. Auf diese Weise sollte die Bindungsstärke von α B-Crystallin an den Myofibrillen näher charakterisiert werden.

Folgende Salzlösungen wurden dazu verwendet: 140mM NaCl als physiologische Kontrolle, 1M KCl, 0,5, 1 und 2M NaSCN und 1 und 2M Harnstoff jeweils in 11mM Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst.

Die Kryostatschnitte wurden bei 37°C dreimal für je 20min mit der jeweiligen Salzlösung (je 1ml) inkubiert. Danach wurden sie bei Raumtemperatur für 30min mit BSA in NGS 1% abgesättigt, um unspezifischen Bindungsereignissen der Antikörper vorzubeugen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C (10 μ l/Schnitt). Die verwendeten Erstantikörper waren gegen die im Bereich der Z/I-Region vorkommenden Proteine α B-Crystallin, α -Actinin, Aktin, Desmin und Titin (T12-Epitop) gerichtet. Dabei wurden sowohl Einzel- als auch Doppelinkubationen vorgenommen.

Die einzelnen Antikörper in den eingesetzten Konzentrationen sind im Folgenden dargestellt:

α B-Crystallin-Antikörper (Kaninchen) (affinitätsgereinigt): konzentriert bis 1:2

α -Actinin-Antikörper (Kaninchen): 1:30

Desmin-Antikörper (Kaninchen): 1:75

Titin-Antikörper (Maus): 1:150

Aktin wurde über die Bindung an Rhodamin-Phalloidin nachgewiesen, das in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt wurde. Nach dreimaligem Waschen der Kryostatschnitte für jeweils 5min mit PBS, wurde der Zweitantikörper von der Ziege bei Raumtemperatur für 45min hinzugefügt. Dieser Zweitantikörper war gegen das Fc-Fragment des Erstantikörpers gerichtet und an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt.

Die gegen die Erstantikörper von Kaninchen und Maus gerichteten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:300 (in PBS) verwendet. Wiederum wurden die Schnitte dreimal 5min lang mit PBS gespült und anschließend unter Verwendung von 60% Glycerol/40% PBS und Zusatz von 1,5% N-Propyl-Gallat (Ausbleichschutz) eingedeckt. Das zur Beurteilung benutzte Fluoreszenzmikroskop war vom Typ Olympus BHS 2.

2.4.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Mit Hilfe dieser Methode wurden gegen α B-Crystallin gerichtete Immunglobuline aus Immunseren vom Kaninchen gereinigt.

Dazu wurde α B-Crystallin mittels eines Auftropfdosiergerätes auf Nitrozellulose aufgetropft. Die so auf Nitrozellulose eingetrockneten α B-Crystallin-Tropfen wurden ausgeschnitten und in Eppendorfgefäßen mit 1ml des Antikörperserums bei 4°C über mehrere Tage unter fortwährender Durchmischung inkubiert. Die gebundenen Immunglobuline wurden dann in 56°C

warmen PBS für ca. 30min von der Nitrozellulose abgelöst (Drenckhahn et al.,1993). Dieses Vorgehen wurde mehrmals wiederholt.

2.4.3 Immunelektronenmikroskopie

Biopsien von ischämischem Schweineherz (Ischämie durch Koronararterienastligatur; Golenhofen et al.,1999) wurden in einer Mischung aus 2% (v/v) Formaldehyd (frisch hergestellt aus Paraformaldehyd) und 0,1% (v/v) Glutaraldehyd in PBS (pH:7,4) für 2h fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 15min wurden die Gewebestückchen in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert: jeweils 5min in 30%, 50%, 70%, 90% und 96% Ethanol sowie im Anschluß daran dreimal 10min in absolutem Ethanol.

Das Gewebe wurde in Gelatine kapseln in LR-White-Kunstharz eingebettet. Die Polymerisation erfolgte bei 4°C unter UV-Licht (360nm) für 2-3 Tage.

Von dem in LR-White-Kunstharz eingebetteten Gewebe wurden mit einem Mikrotom Ultradünnschnitte von 70nm Dicke angefertigt und auf Nickelnetze (3,05mm) aufgebracht. Von dem Fixationsvorgang stammende freie Aldehydgruppen wurden durch Inkubation mit einer 0,05 molaren Glycinlösung (in PBS) für 15min inaktiviert. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden bei Raumtemperatur für 30min mit einem Puffer bestehend aus 5% BSA, 0,1% Fisch-Gelatine, 5% NGS in PBS abgesättigt.

Die Inkubation mit dem Erstantikörper (anti- α B-Crystallin vom Kaninchen der Firma StressGen, Kanada) erfolgte über Nacht bei 4°C, bei einer Verdünnung von 1:100 in Inkubationspuffer. Vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde das Gewebe sechsmal für jeweils 5min in Inkubationspuffer gewaschen.

Als Zweitantikörper wurden Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobuline verwendet, die an Goldpartikel mit einem Durchmesser von 0,8nm adsorbiert waren. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur, der Zweitantikörper wurde mit Inkubationspuffer 1:40 verdünnt. Wieder wurde das Gewebe sechsmal 5min in Inkubationspuffer gewaschen, danach dreimal 5min in PBS und anschließend 5min mit 2% Glutaraldehyd in PBS nachfixiert. Im Anschluß daran wurde eine Silberverstärkung nach Danscher durchgeführt (Danscher et al.,1981). Dazu wurde das Gewebe 30min bei Raumtemperatur lichtgeschützt mit einer Lösung inkubiert, die sich wie folgt zusammensetzt: 3g Gummi Arabicum in 6ml H₂O, 0,255g Zitronensäure(H₂O) und 0,235g Natriumzitat (2xH₂O) in 1ml H₂O und 0,085g Hydrochinon in 1,5ml H₂O wurden gemischt und anschließend wurden 1,5ml einer Silberlaktat zugegeben (0,01095g Silberlaktat in 1,5ml H₂O).

Die Doppelkontrastierung erfolgte mittels 20min Inkubation in 2% Uranylazetat in H₂O und anschließender Inkubation für 10min in 0,2% Bleizitat in H₂O.

3 Ergebnisse

3.1 Ultrastrukturelle Lokalisation von α B-Crystallin im ischämischen Herzen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie

Unter physiologischen Bedingungen liegt α B-Crystallin in Kardiomyozyten zytosolisch vor, wohingegen α B-Crystallin unter Ischämie an die Myofibrillen bindet. Um den exakten Bindungsort zu identifizieren, wurden Ultradünnschnitte von ischämischem Schweineherz angefertigt, die mit einem polyklonalen α B-Crystallin-Antikörper inkubiert und anschließend Immunogold-markiert wurden. Die Goldmarkierung wurde nach Danscher (Danscher et al., 1981) silberverstärkt.

Abbildung 6 zeigt eine Lokalisation der Goldkörner in der I-Bande der Myofibrillen. Die α B-Crystallin-Immunmarkierung ist jedoch nicht gleichmäßig über die ganze I-Bande verteilt, sondern auf eine Zone parallel zur Z-Scheibe etwa in der Mitte der halben I-Bande begrenzt. Diese Zone entspricht dem Bereich, der als N-Linie bezeichnet wird.

Als myofibrilläre Bindungspartner von α B-Crystallin kommen somit in erster Linie I-Banden Proteine wie Aktin oder Titin in Betracht. Z-Scheiben-Proteine, wie z.B. α -Actinin, treten damit in der Frage nach dem Hauptbindungspartner von α B-Crystallin in den Hintergrund bzw. können als solche ausgeschlossen werden.

Neben der Markierung der I-Banden durch α B-Crystallin-Antikörper erscheinen auch die Desminfilamente immunmarkiert.

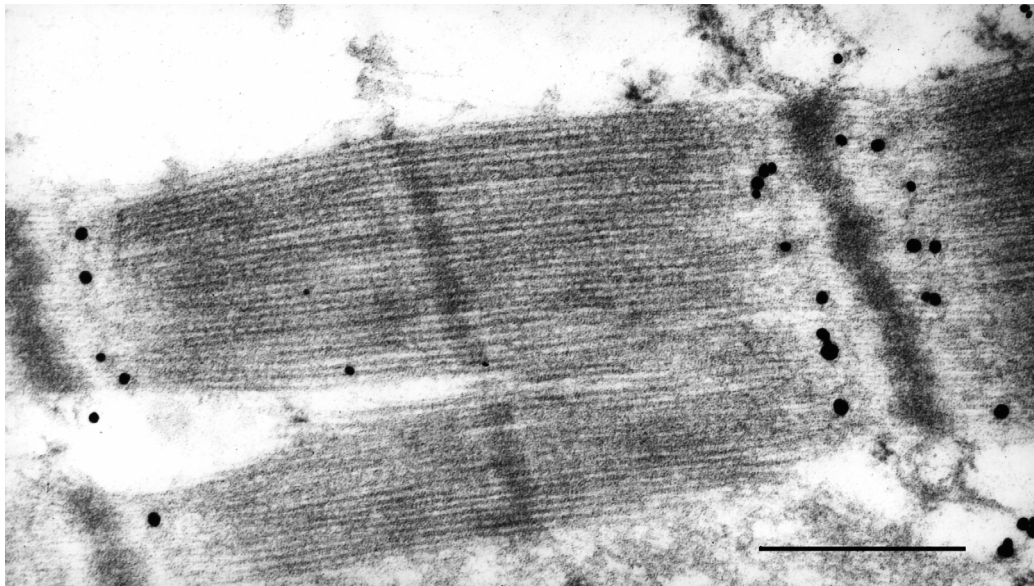


Abb. 6: Immunogold-Markierung für α B-Crystallin eines Ultradünnschnittes vom ischämischen Schweineherz. Das α B-Crystallin-Immunsignal ist in einer Zone parallel zur Z-Scheibe in der I-Bande der Myofibrillen lokalisiert. Balken=0,5 μ m.

3.2 Charakterisierung der Bindung von α B-Crystallin an ischämische Myofibrillen mittels histochemischer Methoden

Um Anhaltspunkte über die Bindungsstärke des Stressproteins α B-Crystallin an kardiale Myofibrillen unter Ischämie zu erhalten, wurden Gefrierschnitte vom Rattenherzen nach globaler Ischämie mit hochmolaren Salzlösungen und chaotropen Substanzen (1M KCl, 0,5M NaSCN, 1M NaSCN, 2M NaSCN, 1M Harnstoff, 2M Harnstoff und 4M Harnstoff) behandelt.

α B-Crystallin und die Zytoskelettproteine α -Actinin, Desmin, Aktin und Titin wurden anschließend immunhistochemisch dargestellt.

Abbildung 7a zeigt eine Immunmarkierung für α B-Crystallin in einem mit Kontrollösung (140mM NaCl) behandelten Gefrierschnitt. Man sieht das für α B-Crystallin unter Ischämie typisch quergestreifte Muster (Markierung der I-Bande). Nach Behandlung der Schnitte mit 1M KCl, 0,5M NaSCN, 1M und 2M Harnstoff (Abb. 7b,c,f,g) ist keine Veränderung des Färbemusters erkennbar. 1M NaSCN (Abb. 7d) führt zu einem unregelmäßiger quergestreiften Muster, 2M NaSCN und 4M Harnstoff (Abb. 7e,h) zu einer diffusen bis fehlenden Immunmarkierung von

α B-Crystallin. Die Bindung von α B-Crystallin (bzw. die Proteine, an die α B-Crystallin gebunden ist) wurde unter diesen Bedingungen offensichtlich zerstört.

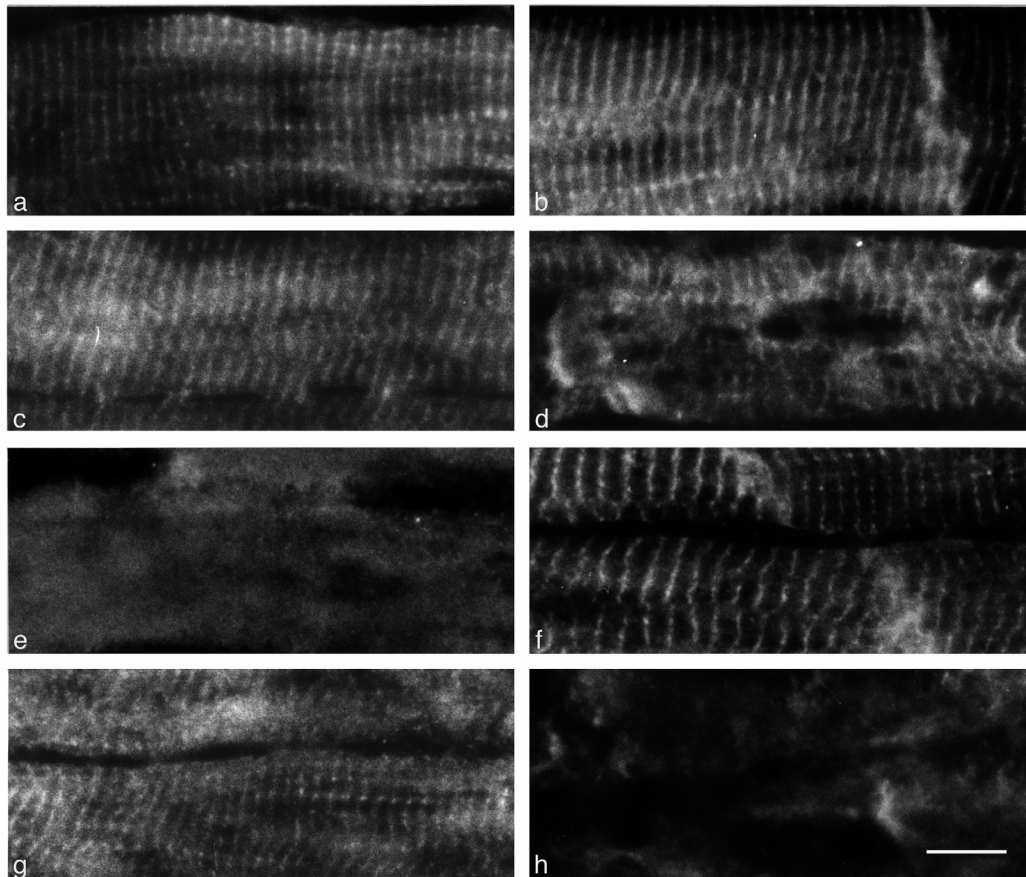


Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbungen für α B-Crystallin an 5 μ m dicken Kryostatschnitten des ischämischen Rattenherzens nach Behandlung mit verschiedenen hochmolaren Salzlösungen und chaotropen Substanzen. Behandlung der Schnitte mit 11mM Phosphatpuffer plus (a) 140mM NaCl, (b) 1M KCl, (c) 0,5M NaSCN, (d) 1M NaSCN, (e) 2M NaSCN, (f) 1M Harnstoff, (g) 2M Harnstoff, (h) 4M Harnstoff, Inkubation mit Antikörpern gegen α B-Crystallin. Die myofibrilläre Bindung von α B-Crystallin zeigt sich resistent gegenüber Behandlung mit 1M KCl, 1M NaSCN und 2M Harnstoff-Lösung. Durch 2M NaSCN- und 4M Harnstoff-Lösung kann die Bindung zerstört werden. Balken=10 μ m.

α -Actinin, Desmin und Titin verhielten sich ähnlich wie α B-Crystallin. Aktin hingegen war nach Behandlung mit 0,5M und 1M NaSCN nicht mehr nachweisbar.

Die Ergebnisse der Immunmarkierung für die zytoskeletalen Proteine α -Actinin, Desmin, Aktin und Titin sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

11mM Phosphatpuffer	α B-Crystallin	α -Actinin	Desmin	Aktin	Titin
+140mM NaCl	++	++	++	++	++
+1M KCl	++	++	++	++	++
+0,5M NaSCN	++	+	+	-	++
+1M NaSCN	+	(+)	+	-	+
+2M NaSCN	-	-	-	-	-
+1M Harnstoff	++	+	+	(+)	++
+2M Harnstoff	+	(+)	(+)	(+)	++
+4M Harnstoff	-	-	-	-	-

Tab. 1: Tabellarische Auswertung der Immunfärbung von α B-Crystallin und verschiedener Zytoskelettproteine nach Behandlung von Gefrierschnitten ischämischer Rattenherzen mit hochmolaren Salzlösungen und chaotropen Substanzen. α B-Crystallin, α -Actinin, Desmin und Titin verhalten sich ähnlich: sie zeigen sich resistent gegenüber Behandlung mit 1M KCl, 1M NaSCN, und 2M Harnstoff. Erst bei Behandlung mit 2M NaSCN sowie 4M Harnstoff erhält man keine reguläre Immunmarkierung mehr für die genannten Proteine. Aktin wird bereits durch 0,5M NaSCN-Lösung vollständig aus den Myofibrillen extrahiert, es kommt als in vivo-Bindungspartner für α B-Crystallin nicht in Betracht, da α B-Crystallin unter diesen Bedingungen myofibrillär gebunden bleibt.

Die myofibrilläre Bindung von α B-Crystallin ist somit resistent gegenüber 1M KCl, 1M NaSCN und 2M Harnstoff. Erst 2M NaSCN oder 4M Harnstoff führen zum Verschwinden von α B-Crystallin. Unter diesen Bedingungen erhält man aber auch keine reguläre Immunmarkierung für α -Actinin, Desmin und Titin, d.h. es kommt hier offensichtlich zu einer Strukturschädigung der Myofibrillen. Aktin wird bereits bei 0,5M NaSCN vollständig extrahiert.

Der Erhalt der myofibrillären Bindung von α B-Crystallin unter Bedingungen (0,5M und 1M NaSCN), die zu einer kompletten Extraktion von Aktin aus den Myofibrillen führen, zeigt, dass Aktin als in vivo-Bindungspartner für α B-Crystallin nicht in Betracht kommt.

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden Gefrierschnitte von Biopsien nach experimentell induziertem Myokardinfarkt am Schwein mit 0,5 M NaSCN und 2M Harnstoff behandelt. Die behandelten Schnitte wurden dann für α B-Crystallin und die I-Banden-Proteine Aktin bzw. Titin

doppelimmunmarkiert. Abb. 8a,b zeigt dabei eine regelrechte I-Banden-Immunmarkierung für α B-Crystallin sowie für Aktin nach Behandlung der Schnitte mit physiologischer Kontrollösung. 0,5M NaSCN-Lösung führt zu keiner erkennbaren Veränderung der α B-Crystallin-Färbung, die Aktin-Immunmarkierung ist jedoch unter diesen Bedingungen nicht mehr nachweisbar (Abb. 8c,d). Die Immunmarkierung für Titin wurde durch diese Behandlung nicht beeinträchtigt. Sogar Behandlung der Schnitte mit 2M Harnstoff führte zu keiner Veränderung der Titindarstellung und nur zu leichten Unregelmäßigkeiten des Färbemusters für α B-Crystallin (Abb. 8e,f). Die Ergebnisse, die bei Versuchen am ischämischen Rattenherz (30min globale Ischämie) gewonnen wurden, konnten so auch am in-vivo-Infarktmodell sowie am Gewebe einer anderen Spezies bestätigt werden. Die Bindung von α B-Crystallin, Desmin, α -Actinin und Titin zeigte sich resistent gegen Extraktion mittels 1M NaSCN und 2M Harnstoff. Aktin hingegen ließ sich durch 0,5M und 1M NaSCN von den Myofibrillen extrahieren.

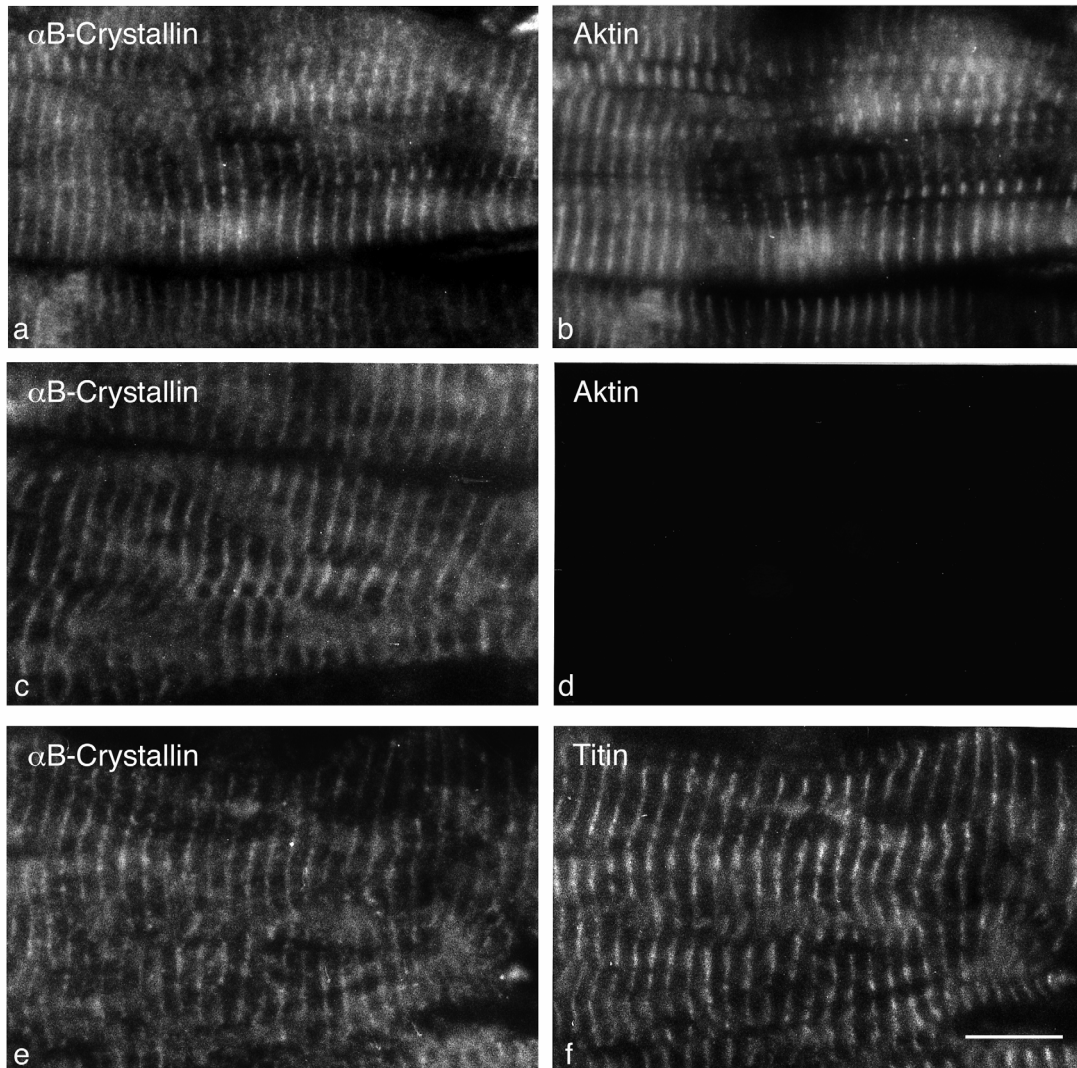


Abb. 8: Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für α B-Crystallin und Aktin bzw. für α B-Crystallin und Titin in 5 μ m dicken Kryostatschnitten des ischämischen Schweineherzens nach Behandlung mit verschiedenen hochmolaren Salzlösungen und chaotropen Substanzen. (a),(b), (c),(d) Doppelimmunmarkierung für α B-Crystallin und Aktin, (e),(f) für Titin und α B-Crystallin. Behandlung der Schnitte mit 11mM Phosphatpuffer plus (a),(b) 140mM NaCl, (c),(d) 0,5M NaSCN, (e),(f) 2M Harnstoff. α B-Crystallin und Titin zeigen sich resistent gegenüber Behandlung mit 0,5M NaSCN- und 2M Harnstoff-Lösung. Aktin wird bereits durch 0,5M NaSCN-Lösung vollständig extrahiert. Balken=10 μ m.

3.3 Biochemische Charakterisierung der Bindung von α B-Crystallin an ischämische Myofibrillen

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden durch eine zweite, biochemische Methode, die Immunreplikanalyse, ergänzt. Myofibrilläre Fraktionen von ischämischem Herzmuskelgewebe der Ratte wurden mit den oben aufgeführten hochmolaren Salzlösungen bzw. chaotropen Substanzen behandelt. Die extrahierten Myofibrillen-Fraktionen wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und die entsprechenden Zytoskelettproteine durch Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper dargestellt. Dabei ließ sich der Grad der Extrahierbarkeit der einzelnen Proteine durch die verwendeten Lösungen anhand der Intensität der erhaltenen immunreaktiven Banden abschätzen. Diese Experimente wurden sowohl bei Raumtemperatur als auch bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die in den beiden Versuchsansätzen erzielten Resultate waren vergleichbar.

Abbildung 9d zeigt eine Immunreplikanalyse für α B-Crystallin von den verschiedenen extrahierten Myofibrillen-Fraktionen. Man erkennt immunreaktive Banden in der Höhe von 21kD. Dabei unterscheidet sich die Intensität der einzelnen immunreaktiven Banden nach Behandlung mit 1M KCl, 0,5M und 1M NaSCN sowie 1M Harnstoff nicht von der Intensität der Bande des Kontrollversuchs (PBS-Inkubation). Erst nach Behandlung mit 4M Harnstoff läßt sich eine deutliche Reduktion der α B-Crystallin-Bande erkennen. In Abb. 9a und b sind die immunreaktiven Banden nach Inkubation mit α -Actinin- bzw. Desmin-Antikörpern dargestellt. Die Banden erschienen auf einer Höhe von 95kD sowie 53kD, welche den molekularen Massen von α -Actinin bzw. Desmin entsprechen. Die Intensität der immunreaktiven Banden verhielt sich dabei in Bezug auf die jeweils eingesetzten Extraktionslösungen ähnlich wie bei der Immunmarkierung für α B-Crystallin: Die Intensität der Banden für α -Actinin und Desmin nach Behandlung mit sowohl 1M KCl, als auch 0,5M und 1M NaSCN sowie 1M Harnstoff war vergleichbar mit der Intensität der Bande unter Kontrollbedingungen. Nur nach Behandlung mit 0,5M NaSCN zeigte α -Actinin eine etwas stärkere Extrahierbarkeit, d.h. eine leichte Abschwächung der immunreaktiven Bande im Vergleich zu dem Kontrollversuch. Der Extraktionsversuch mit 4M Harnstoff führte sowohl bei α -Actinin, als auch bei Desmin zu einer deutlichen Reduzierung der Immunmarkierung. Abb. 9c zeigt die Immunmarkierung mittels polyklonalem Antikörper für Aktin (Banden bei 42kD). Die Behandlung mit 1M KCl führt bei Betrachtung der Aktin-Immunmarkierung nur zu einer geringen Reduktion der Stärke der immunreaktiven Bande, der Einsatz 1M-Harnstofflösung führt zu keiner Intensitätsänderung im Vergleich zu der Bande aus dem Kontrollversuch. Nach Einsatz von 0,5M und 1M NaSCN- sowie 4M-Harnstofflösungen war eine Aktinimmunmarkierung nicht mehr nachweisbar.

Diese biochemischen Untersuchungen bestätigen die immunhistochemischen Experimente. Die myofibrilläre Bindung von α B-Crystallin ist ebenso wie die von α -Actinin und Desmin resistent gegenüber 1M KCl, 1M NaSCN und 2M Harnstoff. Aktin jedoch ist durch NaSCN von den Myofibrillen extrahierbar und scheidet somit als in vivo Bindungspartner für α B-Crystallin aus.

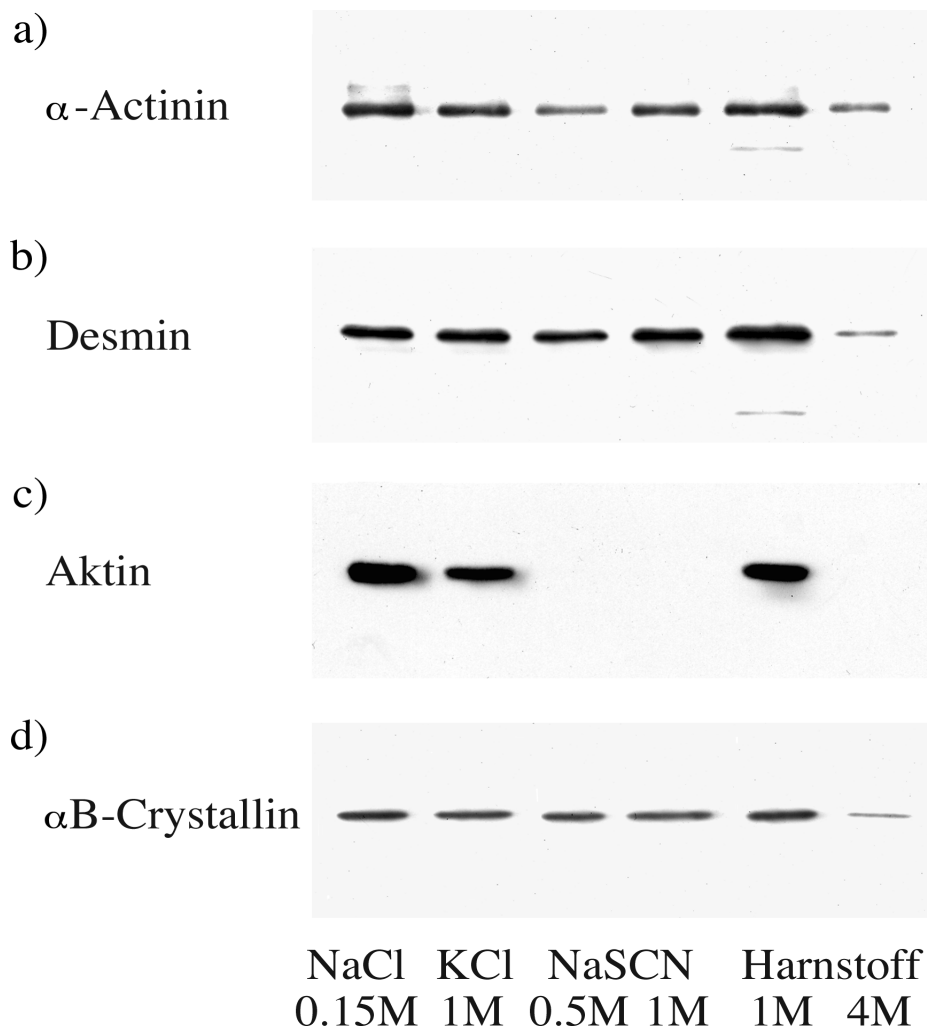


Abb. 9: Immunreplikanalysen myofibrillärer Fraktionen von ischämischem Herzmuskelgewebe der Ratte nach Behandlung mit verschiedenen hochmolaren Salzlösungen und chaotropen Substanzen. Behandlung des Gewebes mit 11mM Phosphatpuffer plus (Spur 1) 140mM NaCl, (Spur 2) 1M KCl, (Spur 3) 0,5M NaSCN, (Spur 4) 1M NaSCN, (Spur 5) 1M Harnstoff, (Spur 6) 4M Harnstoff. Inkubation der Immunreplikanalysen mit Antikörpern gegen (a) α -Actinin, (b) Desmin, (c) Aktin, (d) α B-Crystallin. α B-Crystallin, α -Actinin und Desmin sind resistent gegenüber Behandlung mit 1M KCl, 1M NaSCN und 2M Harnstoff. Sie werden nur durch 4M Harnstoff extrahiert. Aktin hingegen ist bereits durch 0,5M NaSCN-Lösung vollständig extrahierbar.

3.4 Assoziation von α B-Crystallin mit nativem, aus dem Schweineherz präparierten Titin

Um eine Assoziation von α B-Crystallin mit Titin unter kardialer Ischämie zu untersuchen, wurde Titin in nativer Form aus ischämischen Schweineherzen präpariert (Arbeitsgruppe Golenhofen, Würzburg) und auf enthaltenes α B-Crystallin hin untersucht. Die Titinpräparation wurde mittels Gradientengelelektrophorese aufgetrennt. In dem anschließend mit Coomassieblau G-250 gefärbten Gel wird das extrahierte Titin in einer deutlichen Bande mit einer Laufhöhe von etwa 3000kD dargestellt (Abb. 10a). Im Vergleich dazu wurde auch das Myofibrillen-Homogenat vor Extraktion elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassieblau gefärbt. Neben der Titinfraktion (Bande bei 3000kD) werden in diesem Gel auch andere myofibrilläre Proteinkomponenten sichtbar, hauptsächlich Myosin (Bande bei 200kD) und Aktin (Bande bei 42kD) (Abb.10a). Anschließend wurde die präparierte Titinfraktion mittels Immunreplikanalyse auf gebundenes α B-Crystallin hin untersucht. Dazu wurde die Titinfraktion erneut elektrophoretisch aufgetrennt, die enthaltenen Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und mit polyklonalem α B-Crystallin-Antikörper inkubiert. Als Kontrolle wurde natives, aus der Rinderlinse extrahiertes α B-Crystallin aufgetragen. Abbildung 10b zeigt den Immunoblot, auf dem zwei auf gleicher Höhe, nämlich bei 21kD, laufende Banden dargestellt sind. Die 21kD-Bande auf der linken Spur entspricht dabei dem gereinigten α B-Crystallin, das als Kontrolle aufgetragen wurde. Die in gleicher Höhe lokalisierte immunreaktive Bande auf der rechten Spur entspricht dem α B-Crystallin, das bei der Titinpräparation zusammen mit Titin extrahiert wurde und erst unter den Gelelektrophoresebedingungen von Titin gelöst wurde. Das Ergebnis dieser Immunreplik deutet auf eine Bindung von α B-Crystallin an Titin hin, die bei den milden Extraktionsbedingungen der Titinpräparation erhalten bleibt.

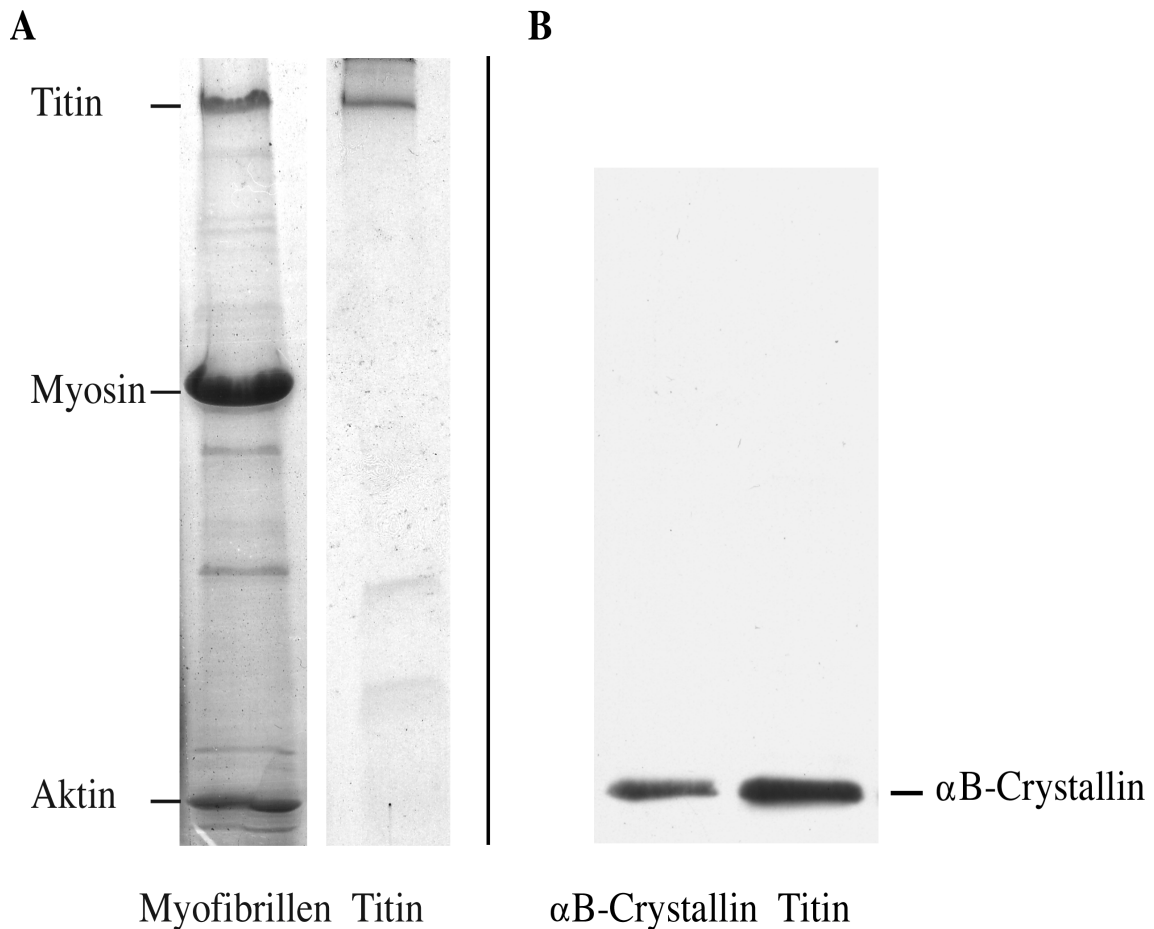


Abb. 10: Assoziation von α B-Crystallin mit gereinigten Titinfraktionen. (A) Coomassie-gefärbtes Gradientengel (2-13%) des Myofibrillenhomogenats vor Titinextraktion (Spur 1) sowie der extrahierten Titinfraktion (Spur 2). Das extrahierte Titin erscheint in einer deutlichen Bande mit einer Laufhöhe von 3000kD. (B) Immunreplikanalyse (15% Acrylamid-Gel) der Titinpräparation (Spur 2) sowie von α B-Crystallin als Kontrolle (Spur 1) inkubiert mit anti- α B-Crystallin-Antikörper. Die Immunreplikanalyse der Titinfraktion zeigt eine immunreaktive Bande in Höhe von 21kD, die dem α B-Crystallin entspricht, das zusammen mit Titin extrahiert wurde.

3.5 Proteinbindungsstudien zwischen α B-Crystallin und verschiedenen zytoskeletalen Proteinen

Das in nativer Form aus ischämischen Schweineherzen präparierte Titin wurde desweiteren für Bindungsstudien zwischen Titin und α B-Crystallin verwendet. Dazu wurde die Titinfraktion in einer Menge von 2,5 μ g auf Nitrozellulose immobilisiert. Vergleichend wurden die zytoskeletalen Proteine Aktin und Desmin sowie BSA (als Negativkontrolle) ebenfalls mit 2,5 μ g auf Nitrozellulose vorgelegt. Gereinigtes α B-Crystallin aus der Linse diente als Positivkontrolle, da

die α -Crystalline Homo- und Heterooligomere ausbilden. Für den Bindungsassay wurde die Nitrozellulose 15min bei 37°C mit biotinyliertem α B-Crystallin in einer Konzentration von 5 μ g/ml inkubiert und gebundenes biotinyliertes α B-Crystallin erfolgte über einen Streptavidin-Peroxidase-Komplex mit Hilfe eines ECL-Detection-Kits nachgewiesen (Abb. 12).

Es zeigt sich eine deutliche Bindung des biotinylierten α B-Crystallins an das aufgereinigte Titin sowie an Desmin. Das biotinylierte α B-Crystallin bildet mit dem immobilisierten α B-Crystallin aus der Rinderlinse Oligomere aus. Die Bindung ist als deutliche Reaktion erkennbar. Eine Bindung von α B-Crystallin an das BSA läßt sich nicht nachweisen.

α B-Crystallin kann somit in vitro an Titin (gereinigt aus ischämischen Herzen) binden. α B-Crystallin bindet in diesem in-vitro-Assay auch an Desmin.

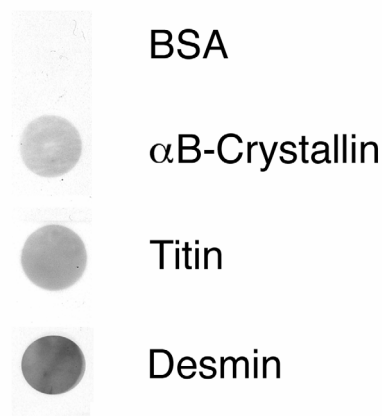


Abb. 11: In-vitro-Bindungsstudien zwischen biotinyliertem α B-Crystallin und verschiedenen zytoskeletalen Proteinen. Biotinyliertes α B-Crystallin zeigt eine Bindung an das aufgereinigte, native Titin. Ebenso bindet es an Desmin sowie an lentikuläres α B-Crystallin (Oligomerenbildung). Eine Bindung an das Protein BSA kann nicht nachgewiesen werden.

3.6 In-vitro-Translation verschiedener Domänen des Titin-Moleküls sowie von α B-Crystallin

Die I-Banden-Lokalisation von α B-Crystallin im ischämischen Herzen, der Nachweis von α B-Crystallin in gereinigten Titinfraktionen aus ischämischen Herzen sowie der Ausschluß von Aktin als myofibrillären Bindungspartner führen zu der Arbeitshypothese, dass Titin als Bindungspartner für α B-Crystallin anzusehen ist. Bestimmte Sequenzabschnitte des

Titinmoleküls im I-Banden-Bereich sowie einige Z-Scheiben-Domänen von Titin stellen mögliche Angriffspunkte für α B-Crystallin in seiner Funktion als chaperone dar.

Diese Domänen wurden für Bindungsstudien mit α B-Crystallin eingesetzt. Dazu wurden die cDNAs der verschiedenen Titinsequenzabschnitte von humanem Titin sowie die cDNA von kardialem α B-Crystallin vom Schwein amplifiziert und mit Hilfe eines Retikulozytenlysats vom Kaninchen in vitro translatiert sowie durch Einbau von [35 S]-Methionin radioaktiv markiert. Ein Aliquot wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie weiter analysiert. Die eingebaute Radioaktivität wurde anschließend im Szintillationszähler quantifiziert, um die Menge des synthetisierten Proteins zu messen. Das war Voraussetzung für die folgenden Versuche, bei denen identische Mengen (Zerfälle) der Translatate eingesetzt wurden.

In Abb. 12 sind die in vitro translatierten und mittels SDS-PAGE aufgetrennten Titindomänen bzw. das α B-Crystallin autoradiographisch dargestellt.

Auf der ersten Spur ist eine deutliche autoradiographische Bande auf der Höhe von 21kD zu erkennen. Sie entspricht dem in vitro translatierten α B-Crystallin. Auf den Spuren zwei bis vier wurden verschiedene in vitro translatierte Z-Scheiben-Domänen von Titin aufgetragen. Die Domänen Z6/Z7 (Spur2; 273 AS lang) zeigen eine autoradiographische Bande bei 30kD. Die auf der Höhe von 28kD laufende Bande auf Spur drei stellt die Domänen Z8/Z9 (256 AS) dar. Die Domänen Z10/11 (342 AS) sind auf der Spur vier zu erkennen. Sie läuft in der Höhe von 37,6kD. Spur fünf zeigt die autoradiographische Bande einer der beiden untersuchten I-Banden-Abschnitte S54/S56 (292 AS) auf der Höhe von 32,1kD. Die letzte Spur stellt die Autoradiographie der I-Banden-Domänen I18/I20 (466 AS) dar, mit einer Laufhöhe von 51,2kD.

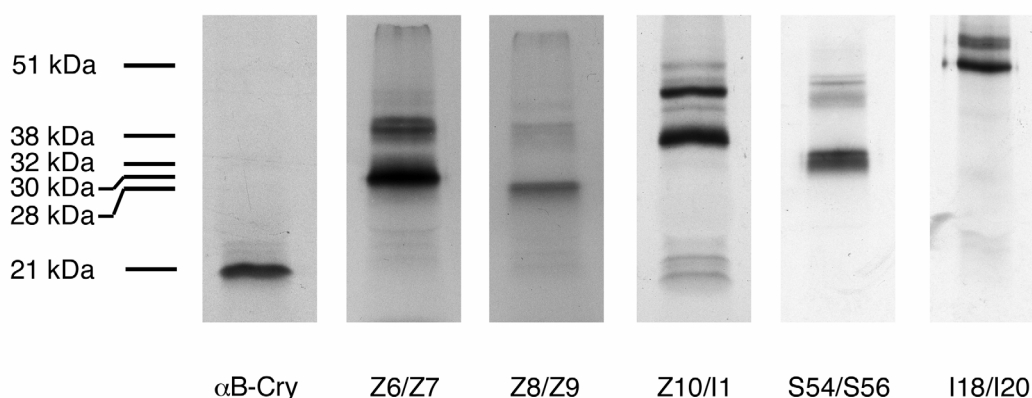


Abb. 12: Autoradiographie der in vitro translatierten Titin-Domänen und des in vitro translatierten α B-Crystallins. Die autoradiographischen Banden sind jeweils auf der Laufhöhe der translatierten Proteine zu erkennen (Spur 1) α B-Crystallin (21kD), (Spur 2) Titin-Domänen

Z6Z7 (30kD), (Spur 3) Titin-Domänen Z8Z9 (28kD), (Spur 4) Titin-Domänen Z10I1 (37,6kD), (Spur 5) Titin-Domänen S54-56 (32,1kD), (Spur 6) Titin-Domänen I18-I20 (51,2kD).

3.7 Proteinbindungsstudien zwischen α B-Crystallin und in vitro translatierten Titinsequenzabschnitten

Die Bindung der verschiedenen in vitro translatierten Titindomänen aus dem Z-Scheiben-Bereich und aus der I-Bande wurde an immobilisiertem α B-Crystallin (Linse, Rind) untersucht. Für die Bindungsassays wurde α B-Crystallin mit einer Menge von 2 μ g auf der Nitrozellulose vorgelegt. Die Inkubation mit den radioaktiv markierten, in vitro translatierten Titindomänen erfolgte bei 37°C für 15min. Die biologische Aktivität des Translationsproduktes wurde durch Bindung von in vitro translatiertem, kardialen α B-Crystallin an immobilisiertes, gereinigtes α B-Crystallin aus der Linse überprüft (α B-Crystallin bildet Oligomere). Als Negativkontrolle für die Bindungsstudie diente BSA.

Die Autoradiogramme der mit dem radioaktiv markierten α B-Crystallin bzw. den radioaktiv markierten Titindomänen inkubierten Dot Blots sind in Abb.13 dargestellt.

Auf dem ersten Dot Blot-Streifen, der mit radioaktivem α B-Crystallin überschichtet wurde, ist eine deutliche Bindung des radioaktiven α B-Crystallins an das immobilisierte α B-Crystallin zu erkennen. Das als Negativkontrolle verwendete BSA bindet hingegen das hinzugegebene α B-Crystallin nicht: der Dot Blot bleibt autoradiographisch negativ. Die Autoradiogramme der Dot Blot-Streifen zwei bis sechs zeigen das Ergebnis der Bindungsstudien zwischen α B-Crystallin und den einzelnen Titindomänen: weder für die Z-Scheiben-Domänen des Titin Z6/Z7, Z8/Z9 und Z10/I1 (Dot Blots 2-4), noch für die in der I-Bande gelegenen Sequenzabschnitte des Titin S54/S56 und I18/I20 (Dot Blots 5+6) kann eine Bindung an immobilisiertes α B-Crystallin nachgewiesen werden; alle Dot Blots sind autoradiographisch negativ.

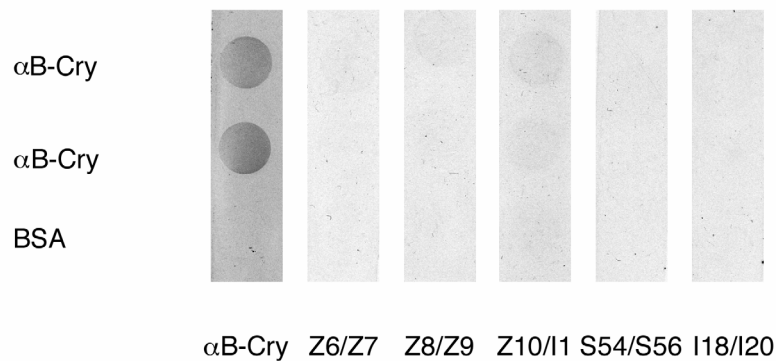


Abb. 13: Bindungsstudien zwischen verschiedenen in vitro translatierten Titin-Domänen und α B-Crystallin (Autoradiogramm). Dot-Blot-Streifen (α B-Crystallin und BSA) überschichtet mit (Spur 1) α B-Crystallin, (Spur 2) Titin Z6Z7, (Spur 3) Titin Z8Z9, (Spur 4) Titin Z10I1, (Spur 5) Titin S54-56, (Spur 6) Titin I18-I20. Das Autoradiogramm zeigt eine α B-Crystallin- α B-Crystallin-Oligomerbildung, eine Bindung des radioaktiven α B-Crystallins an die verschiedenen translatierten Titin-Domänen konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Nachweis einer Bindung von α B-Crystallin an isolierte Titindomänen war durch diese Bindungsstudien somit nicht möglich. Diese Negativergebnisse schließen jedoch eine Assoziation von Titin und α B-Crystallin in vivo unter Ischämie nicht aus. Es wäre denkbar, dass die translatierten Domänen nicht die korrekte 3D-Konfiguration aufweisen, dass Kofaktoren (wie sie unter Ischämie vorliegen) benötigt werden oder dass die Bindung an an dieser Stelle nicht untersuchten Domänen stattfindet, die für die Bindungsstudien nicht ausgewählt worden waren (siehe Diskussion).

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die durch Ischämie ausgelöste Bindung des Stressproteins α B-Crystallin an kardiale Myofibrillen näher zu charakterisieren.

Stressproteine können unter Ischämie zytoprotektive Funktionen übernehmen, so z.B. auch im Herzen ischämischen Schädigungen entgegenwirken (Marber et al.,1993). α B-Crystallin wird zu der Gruppe der kleinen Stressproteine gerechnet und kommt im Herzen konstitutiv in sehr hoher Konzentration vor (1-2% der löslichen Proteine) (Golenhofen et al.,1998). Diese Eigenschaft macht α B-Crystallin zu einem geeigneten Kandidaten für einen sofortigen, syntheseunabhängigen Protektionsmechanismus. Ein Hinweis auf eine kardioprotektive Funktion von α B-Crystallin wurde durch Überexpression von α B-Crystallin in kultivierten Kardiomyozyten erhalten. Unter simulierter Ischämie zeigten α B-Crystallin-überexprimierende Kardiomyozyten eine geringere Laktatdehydrogenase-(LDH)-Abgabe als Kontroll-Kardiomyozyten (Martin et al.,1997).

Unter kardialer Ischämie kommt es zu einer Phosphorylierung des α B-Crystallins sowie zu einer vollständigen Translokation des α B-Crystallins vom Zytosol an die Myofibrillen, insbesondere in den Bereich der Z-/I-Region des Sarkomers (Golenhofen et al.,1998). Im Rahmen dieser Arbeit lokalisierten wir α B-Crystallin durch immunelektronenmikroskopische Untersuchungen unter Ischämie in der I-Bande der Myofibrillen in Höhe der N-Linien und zeigten, dass α B-Crystallin in der I-Bande höchstwahrscheinlich mit Titin interagiert.

Lokalisation von α B-Crystallin im Sarkomer

Ultrastrukturell konnte α B-Crystallin im ischämischen Herzen durch Immunogoldmarkierung in einer Linie parallel zur Z-Scheibe in der Mitte der halben I-Bande lokalisiert werden. Eine Zone, die auch als N-Linie bezeichnet wird.

Immunfluoreszenz-Untersuchungen beschrieben eine Lokalisation von α B-Crystallin in der Z-Scheiben-Region sowohl im Skelettmuskel (Atomi et al.,1991), als auch in kultivierten Kardiomyozyten (Longoni et al.,1990a,b) und im ischämischen Herz (Kokalisation mit α -Actinin, Golenhofen et al.,1998). Diese Beobachtungen führten zunächst zu der Hypothese einer Assoziation von α B-Crystallin mit Proteinen der Z-Scheibe.

Bei Untersuchungen an ischämischer Herzmuskulatur vom Schwein mit stark gedehnten Myofibrillen (Golenhofen et al.,1999) zeigte sich jedoch eine Lokalisation von α B-Crystallin zu beiden Seiten der α -Actinin-Immunmarkierung. Die hier durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben eindeutig, dass der Bereich der Z-Scheibe frei von α B-Crystallin ist.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen am ischämischen Herzen, die für eine Z-Scheiben-Lokalisation von α B-Crystallin im Sarkomer sprechen, sind möglicherweise

darauf zurückzuführen, dass durch die Ischämie Kontrakturen im Muskelgewebe entstehen, die eine eindeutige Unterscheidung zwischen Z-Scheiben und I-Banden-Region nicht mehr zulassen.

Die Beobachtung der Untersuchungen von Longoni et al. (Longoni et al., 1990a,b), dass eine α B-Crystallin-Immunmarkierung an kultivierten Kardiomyozyten auch schon unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne eine definierte Ischämieperiode bzw. ohne Einwirkung anderweitiger Stressfaktoren, auftritt, könnte dadurch erklärt werden, dass eine α B-Crystallin-Translokation (zumindest teilweise) schon nach sehr kurzer Ischämiedauer zu finden ist. Somit könnte der bei der Präparation und weiteren Behandlung der Zellen auftretende und nicht zu vermeidende Stress für eine Translokation von α B-Crystallin ausreichend und damit für die Immunmarkierung von α B-Crystallin unter Kontrollbedingungen verantwortlich sein. Es ist auch denkbar, dass Zellkulturbedingungen insgesamt Stressbedingungen schaffen, die zu einer Translokation von α B-Crystallin an die Myofibrillen führen.

Mögliche myofibrilläre Bindungspartner

Aus der Beobachtung, dass α B-Crystallin unter Ischämie eindeutig in der I-Bande zu beiden Seiten der Z-Scheibe lokalisiert ist, lässt sich ableiten, dass in erster Linie die Komponenten der I-Bande, d.h. Aktin und Titin, als Bindungspartner für α B-Crystallin unter Ischämie in Frage kommen. Für Aktin wurde gezeigt, dass es *in vitro* mit α B-Crystallin interagiert (Wang et al., 1996). In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich Aktin weniger resistent gegenüber der Behandlung mit chaotropen Substanzen (0,5M und 1M NaSCN) als α B-Crystallin. Während Aktin durch 0,5M und 1M NaSCN vollständig aus den Myofibrillen extrahiert wurde, blieb die Bindung von α B-Crystallin an die Myofibrillen unverändert erhalten. Aufgrund dieses Ergebnisses ist Aktin als *in vivo*-Bindungspartner von α B-Crystallin auszuschließen.

Desweiteren konnte beobachtet werden, dass α B-Crystallin sehr stark an ischämische Myofibrillen gebunden ist (die Bindung ist resistent gegenüber 1M KCl, 1M NaSCN und 2M Harnstoff) und erst durch Substanzen, die mit der Zerstörung der myofibrillären Integrität einhergehen (4M Harnstoff), extrahierbar wird. Die ebenfalls untersuchten, zytoskeletalen Proteine α -Actinin, Desmin und Titin wiesen hinsichtlich der Extrahierbarkeit durch die verschiedenen verwendeten Substanzen mit α B-Crystallin vergleichbare Ergebnisse auf.

Da Aktin als *in vivo*-Bindungspartner von α B-Crystallin ausgeschlossen werden konnte, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass der myofibrilläre Bindungspartner von α B-Crystallin das Protein Titin ist. Titin liegt als ein monomeres Filament vor, das das halbe Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie durchspannt. Funktionell werden ihm wichtige elastische Eigenschaften zugeschrieben, die u.a. für die Ruhespannung des Muskels verantwortlich sind (Erickson et al., 1997). Um eine mögliche Bindung von α B-Crystallin an Titin näher zu untersuchen, wurde Titin unter milden Reinigungsbedingungen aus ischämischen Herzen präpariert (Trinick et al., 1984), welche eine Assoziation von Titin mit α B-Crystallin nicht beeinträchtigen sollte. Es

stellte sich heraus, dass die angereicherte Titinfraktion α B-Crystallin als Kontamination enthielt, so dass zumindest eine Assoziation von gereinigtem Titin aus ischämischen Herzen und α B-Crystallin angenommen werden muß. Diese Hypothese einer Assoziation von α B-Crystallin und Titin wird unterstützt durch die Ergebnisse weiterer Versuche, in denen eine Bindung von gereinigtem α B-Crystallin an das aufgereinigte Titin unter in vitro-Bedingungen gezeigt werden konnte. Hierzu muß angemerkt werden, dass die angereicherte Titinfraktion neben der Kontamination mit α B-Crystallin auch Verunreinigungen mit Aktin, Desmin und Myosin aufwies. Diese Proteinverunreinigungen waren jedoch so gering, dass nicht davon auszugehen ist, dass sie für die Bindung von α B-Crystallin verantwortlich sind.

Bindungsstudien zwischen verschiedenen, in vitro translatierten Titindomänen und α B-Crystallin waren jedoch negativ. Trotzdem ist dadurch keine Interaktion von α B-Crystallin mit Titin in vivo ausgeschlossen. Es gibt mehrere Gründe, die für dieses Negativergebnis in der Bindungsstudie verantwortlich sein könnten: Zum einen wurden nur einige der bekannten und klonierten Titindomänen der Z-/I-Region für die Bindungsversuche verwendet. Neben Domänen des Übergangs der Z-Scheibe zur I-Bande waren das sowohl die in der I-Bande gelegene PEVK-Domäne als auch repetitive Immunglobulin-Domänen (Gautel et al., 1996a,b; Labeit et al., 1995). So kann eine Bindungsstelle für α B-Crystallin auch in anderen Sequenzabschnitten des Titinmoleküls vermutet werden, die z.T. heute noch nicht kloniert sind. Es existieren z.B. verschiedene Spleißvarianten von Titin in verschiedenen Typen der Muskulatur, die sich in der Länge der PEVK-Domäne, der Anzahl der Ig-Domänen oder durch das Auftreten bestimmter, spezifischer Sequenzen, der N2A und N2B-Domänen, voneinander unterscheiden (Labeit et al., 1995). Die N2A-Domäne kommt sowohl im Skelettmuskel, als auch in der Herzmuskulatur vor, die N2B-Domäne hingegen ist Herzmuskel-spezifisch. Neueren Untersuchungen zur Folge soll die N2B-Domäne an den elastischen Eigenschaften des Titin-Moleküls beteiligt sein (Trombitas et al., 1999). Beide Sequenzabschnitte, sowohl die N2A-, als auch die N2B-Sequenz, wären als möglicher Bindungspartner für α B-Crystallin denkbar. Eine zweite Möglichkeit dafür, dass in vitro keine Proteininteraktionen nachweisbar sind, besteht darin, dass die dreidimensionale Struktur der translatierten Domänen nicht mit ihrer dreidimensionalen Struktur in vivo übereinstimmt. Und drittens muß bei der Interpretation der Ergebnisse der Bindungsstudien in Betracht gezogen werden, dass α B-Crystallin in vivo erst unter Ischämie an die Myofibrillen transloziert und dort bindet. Die Signalwege und möglichen posttranslationalen Modifikationen, die die Translokation und Bindung von α B-Crystallin an die I-Banden der Myofibrillen steuern, sind noch unbekannt. Außerdem könnten auch bestimmte, bisher nicht bekannte Adapterproteine für die Bindung von α B-Crystallin an die Myofibrillen notwendig sein. Es wurde beschrieben, dass die Bindungsaffinität von α B-Crystallin in vitro zu Aktin und Myofibrillen sowohl von der Temperatur als auch von dem pH abhängig ist. Leicht saures Milieu (pH 6,5) und Hitzeschock (45°C) führen zu einem Anstieg der Bindungsaffinität (Chiesi et al., 1990; Bennardini et al., 1992; Nicholl et al., 1994). In den hier durchgeführten Versuchen ließ

sich eine derartige Abhängigkeit der Bindungsaffinität von α B-Crystallin von den physikalischen Bedingungen jedoch nicht nachweisen. Ebenso ist zu diskutieren, inwieweit die unter Ischämie auftretende Phosphorylierung von α B-Crystallin für seine Eigenschaft als „molecular chaperone“ von Bedeutung ist bzw. seine Bindungsaffinität zu Zytoskelettkomponenten beeinflussen vermag. Das in den Bindungsstudien verwendete lentikuläre α B-Crystallin weist jedoch ähnliche posttranslationale Modifikationen auf wie kardiales α B-Crystallin unter Ischämie.

Diese Erörterung macht deutlich, dass die Mechanismen, die zur myofibrillären Translokation unter Ischämie führen, zum größten Teil noch unbekannt sind und auch in dieser Untersuchung nicht näher charakterisiert werden konnten. Das hier verwendete in vitro-System scheint somit für die Untersuchung der in vivo-Bindungspartner von α B-Crystallin nicht geeignet zu sein. Auch im Hefe-2-Hybrid-System konnten lediglich Interaktionen von α B-Crystallin mit α B-Crystallin (Oligomerisierung), mit α A-Crystallin und Hsp27 beobachtet werden (Boelens et al.,1998). Interaktionen von α B-Crystallin mit Desmin und Vimentin konnten nicht gezeigt werden, obwohl eine Assoziation von α B-Crystallin mit Intermediärfilamenten in vivo nachgewiesen werden konnte (Djabali et al.,1997). Das Hefe-2-Hybrid-System und die hier durchgeführten in vitro-Bindungsstudien stellen somit möglicherweise die physiologische Situation dar, in der α B-Crystallin zytosolisch vorliegt und keine Bindung mit myofibrillären Proteinen eingeht.

Es wird also deutlich, dass zunächst der genaue Mechanismus der α B-Crystallin Bindung Gegenstand der weiteren Forschung sein muß, um erfolgreich in vitro-Bindungsstudien zwischen α B-Crystallin und seinen myofibrillären Bindungspartnern unter Ischämie durchzuführen.

Die in anderen Studien vermutete Bindung von α B-Crystallin an Desmin im Herzen konnte in dieser Untersuchung bestätigt werden und steht nicht im Widerspruch zu einer Interaktion von α B-Crystallin mit Titin. Wie bereits oben ausgeführt war eine Assoziation von α B-Crystallin in vitro mit Aktin, Desmin, Vimentin und GFAP (Nicholl et al.,1994; Bennardini et al.,1992) sowie in vivo unter Stressbedingungen eine Bindung an Vimentin und Peripherin (Djabali et.al.,1997) nachgewiesen worden. Die genaue Funktion dieser Intermediärfilamente ist unbekannt, insgesamt wird ihnen jedoch eine passive mechanische Funktion im Sinne eines zellulären Stützgerüsts zugeschrieben, das u.a. im Herzen die Myofibrillen und andere Zellbestandteile in Position hält und um die Z-Scheibe herum lokalisiert ist. Es existieren anscheinend mehrere Bindungsstellen für α B-Crystallin im Sarkomer, eine im Bereich der Z-Scheibe (Intermediärfilamente) und eine im Bereich der I-Bande. Eine wichtige funktionelle Bedeutung von α B-Crystallin für die regelrechte Anordnung von Intermediärfilamenten leitet sich aus der Tatsache ab, dass eine Mutation des α B-Crystallin-Gens zur Aggregation von Desmin führt (Perng et al.,1999). Desweiteren wird beim Menschen eine Mutation des α B-Crystallin-Gens für eine Myopathie und Kardiomyopathie, die mit einer Koaggregation von α B-Crystallin und Desmin einhergeht, verantwortlich gemacht (Vicart et al.,1998).

Neben Titin als Interaktionspartner für α B-Crystallin im Bereich der I-Bande muß auch noch ein anderes Protein als möglicher Bindungspartner für α B-Crystallin in Betracht gezogen werden: Nebulette. Nebulette ist eine für das Herz spezifische, verkürzte Form des Nebulin, die von der Z-Scheibe bis in die I-Bande hineinreicht (Moncman et al., 1995). Da keine gegen das Protein Nebulette gerichteten Antikörper verfügbar waren, konnte eine mögliche Bindung von α B-Crystallin an Nebulette nicht weiter untersucht werden.

Zusammenfassend haben die durchgeführten Untersuchungen gezeigt, dass eine Interaktion von α B-Crystallin mit dem myofibrillären Protein Titin unter Ischämie als sehr wahrscheinlich anzunehmen ist. Der endgültige Beweis für eine Bindung von α B-Crystallin an Titin in vivo steht jedoch noch aus, was in der Hauptsache darauf zurückzuführen ist, dass der genaue Mechanismus der myofibrillären Bindung von α B-Crystallin noch nicht bekannt ist.

Der I-Banden Bereich von Titin wäre ein sehr interessanter Angriffspunkt für α B-Crystallin als „molecular chaperone“, da die verschiedenen Protein-Domänen der I-Bande (Immunglobulin-, PEVK-, N2B-Domänen) für die elastischen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich sind. Unter pathophysiologischen Bedingungen könnte α B-Crystallin hier seine Funktion als chaperone erfüllen, indem es sowohl bei der Rückfaltung als auch bei der Stabilisierung der Titin-Domänen beteiligt ist, und auf diese Weise einer myofibrillären Schädigung entgegenwirken.

5 Zusammenfassung

Prolongierte Ischämieperioden des Herzens führen zu struktureller Schädigung der Kardiomyozyten, d.h. einer Desorganisation und Zerstörung des kontraktilen und plasmalemmalen Zytoskeletts, welche sich final durch Verlust an Kontraktilität und Ruptur der Plasmamembran manifestieren. Stressproteine können an die Komponenten des Zytoskeletts binden und durch Konformationsschutz der ischämischen Schädigung entgegenwirken. In vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass es unter Ischämie zu einer Translokation des konstitutiv in hoher Konzentration vorkommenden kardialen Stressproteins α B-Crystallin vom Zytosol an die Myofibrillen kommt. Dabei führen bereits kurzdauernde Ischämieperioden zu einer kompletten Umverteilung von α B-Crystallin in die Z/I-Region des Sarkomers. Es war das Ziel dieser Arbeit, diese Bindung von α B-Crystallin an Strukturproteine im Z/I-Banden Bereich näher zu charakterisieren und α B-Crystallin ultrastrukturell zu lokalisieren.

Durch Immunogoldmarkierung konnte α B-Crystallin ultrastrukturell im Herzen unter globaler Ischämie in einer Linie parallel zur Z-Scheibe etwa in der Mitte der halben I-Bande lokalisiert werden. Diese Zone entspricht dem Bereich, der als N-Linie bezeichnet wird. In der Frage der in vivo-Bindungspartner von α B-Crystallin waren daher in erster Linie Komponenten der I-Bande, d.h. Aktin und Titin in Betracht zu ziehen. Z-Scheiben Proteine wie α -Actinin treten dagegen in den Hintergrund. Um Anhaltspunkte über die Bindungsstärke des Stressproteins α B-Crystallin an kardiale Myofibrillen unter Ischämie zu erhalten, wurden ischämische Myofibrillen aus dem Rattenherz mit hochmolaren Salzlösungen und chaotropen Substanzen behandelt. Dabei konnte eine sehr hohe Bindungsaffinität von α B-Crystallin an die Myofibrillen festgestellt werden. Die myofibrilläre Bindung zeigte sich resistent gegenüber 1M KCl, 1M NaSCN und 2M Harnstoff, erst 2M NaSCN und 4M Harnstoff, die eine Zerstörung der myofibrillären Integrität bewirken, vermögen die α B-Crystallin-Bindung zu lösen. Aktin dagegen ließ sich bereits durch 0,5M NaSCN-Lösung von den Myofibrillen extrahieren, Bedingungen, unter denen α B-Crystallin noch fest an die Myofibrillen gebunden blieb. Aktin scheidet somit als in vivo-Bindungspartner von α B-Crystallin aus. Dieses Ergebnis immunhistochemischer Untersuchungen konnte auch mit biochemischer Methodik (Immunreplikanalyse) verifiziert werden. Titin zeigte sich wie α B-Crystallin resistent gegenüber den meisten der oben aufgeführten Salzlösungen. Eine deutliche Extraktion von Titin aus den Myofibrillen konnte erst durch Behandlung mit 2M NaSCN sowie 4M Harnstofflösung beobachtet werden, das Extraktionsverhalten entsprach somit dem von α B-Crystallin. Einen Hinweis auf eine Assoziation von α B-Crystallin mit Titin lieferte der Nachweis von α B-Crystallin in isolierten Titinfraktionen aus ischämischen Herzen. Der direkte Beweis für eine α B-Crystallin-Titin-Interaktion konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht erbracht werden. Bindungsstudien, die zwischen ausgewählten nativen, in vitro translatierten

Titindomänen und aus der Linse isoliertem α B-Crystallin durchgeführt wurden, waren negativ. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass α B-Crystallin erst unter Ischämie mit Titin interagiert und in vitro Kofaktoren benötigt werden. Durch eine Bindung an I-Banden Abschnitte des Titinmoleküls könnte α B-Crystallin eine kardioprotektive Funktion erfüllen, indem es unter Ischämie stabilisierend auf das Filamentsystem einwirkt.

6 Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., et al.: Molecular biology of the cell. 2nd ed. New York: Garland Publishing: 613-680 (1989)

Anderson, D., Peterson, C.: High resolution electrophoreses of proteins in SDS polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **81** (ED: R.C. Allen, P. Arnaud). New York: 41-48 (1981)

Arrigo, A.P., Darlix, J.L., Khandjian, E.W., Simon, M., Spahr, P.F.: Characterization of the prosome from *Drosophila* and its similarity to the cytoplasmic structures formed by the low molecular weight heat-shock proteins. *EMBO J.* **4**: 399-406 (1985)

Arrigo, A.P., Welch, W.J.: Characterization and purification of the small 28000-Dalton mammalian heat-shock protein. *J. Biol. Chem.* **262**: 15359-15369 (1987)

Atomi, Y., Yamada, S., Strohmman, R., Nonomura, Y.: α B-crystallin in skeletal muscle: purification and localization. *J. Biochem.* **110**: 812-822 (1991)

Barbato, R., Menabo, R., Dainese, P., Carafoli, E., Schiaffino, S., Di Lisa, F.: Binding of cytosolic proteins to myofibrils in ischemic rat heart. *Circ. Research* **78**: 821-828 (1996)

Benjamin, I.J., Kroger, B., Williams, R.S.: Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6263-6267 (1990)

Benjamin, I.J., Horie, S., Greenberg, M.L., Alpern, R.J., Williams, R.S.: Induction of stress proteins in cultured myogenic cells: molecular signals for the activation of heat shock transcription factor during ischemia. *J. Clin. Invest.* **89**: 1685-1689 (1992)

Benjamin, I.J., McMillan, D.R.: Stress (heat shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ. Research.* **83**: 117-132 (1998)

Bennardini, F., Wrzosek, A., Chiesi, M.: α B-crystallin in cardiac tissue: association with actin and desmin filaments. *Circulation Research* **78**: 288-294 (1992)

Bhat, S.P., Nagineni, C.N.: α B subunit of lens-specific protein α -crystallin is present in other ocular and non-ocular tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**: 319-325 (1989)

Bhat, S.P., Horwitz, J., Srinivasan, A., Ding, L.: α B-crystallin exists as an independent protein in the heart and in the lens. *Eur. J. Biochem.* **202**: 775-781 (1991)

Bloemendal, H.: Proctor lecture. Disorganization of membranes and abnormal intermediate filament assembly lead to cataract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**: 445-455 (1991)

Boelens, W.C., Croes, Y., de Ruwe, M., de Reu, L., de Jong, W.W.: Negative charges in the C-terminal domain stabilize the α B-crystallin complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 28085-28090 (1998)

Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254 (1976)

Burnette, W.N.: „Western Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203 (1981)

Casella, J.F., Maack, D.J., Lin, S.: Purification and initial characterization of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **261**: 10915-10921 (1986)

Chiesa, R., Gawinowicz-Kolks, M., Kleiman, N.J., Spector, A.: The phosphorylation sites of the B2 chain of bovine alpha-crystallin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**: 1340-1347 (1987)

Chiesi, M., Longoni, S., Limbruno, U.: Cardiac alpha-crystallin: involvement during heart ischemia. *Mol. Cell. Biochem.* **97**: 129-136 (1990)

Clark, J.I., Huang, Q.L.: Modulation of the chaperone-like activity of bovine α -crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15185-15189 (1996)

Danscher, G.: Localization of gold in biological tissue. A photochemical method for light and electron microscopy. *Histochemistry* **71**: 81-88 (1981)

Delaye, M., Tardieu, A.: Short-range order of crystallin protein accounts for eye lens transparency. *Nature* **302**: 415-417 (1983)

Djabali, K., de Nechaud, B., Landon, F., Portier, M.M.: α B-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J. Cell Sci.* **110**: 2759-2769 (1997)

Downey, J.M., Cohen, M.V., Ytrehus, K., Liu, Y.: Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase C. *Ann. N Y Acad. Sci.* **723**: 82-98 (1994)

Drenckhahn, D., Mannherz, H.-G.: Distribution of actin and the actin-associated proteins myosin, tropomyosin, alpha-actinin, vinculin and villin in rat and bovine exocrine glands. *Eur. J. Cell Biol.* **30**: 167-176 (1983)

Drenckhahn, D., Jöns, T., Schmitz, F.: Production of polyklonal antibodies against proteins and peptides. *Methods in Cell Biology, Vol.37: Antibodies in Cell Biology.* D.J. Asai, editor. Academic Press, San Diego, 7-56 (1993)

Drenckhahn, D.: "Muskelgewebe". In: Benninghof, Lehrbuch der Anatomie (Drenckhahn,D., Zenker,W., Hrsg.) Urban und Schwarzenberg; München; Wien; Baltimore: 167-198 (1994)

Dubin, R.A., Wawrousek, E.F., Piatigorsky, J.: Expression of the murine α B-crystallin is not restricted to the lens. *Mol. Cell Biol.* **9**: 1083-1091 (1989)

Erickson, H.P.: Reversible unfolding of fibronectin type3 and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10114-10118 (1994)

Erickson, H.P.: Stretching single protein molecules: titin is a weird spring. *Science* **276**: 1090-1092 (1997)

Fürst, D.O., Osborn, M., Nave, R., Weber, K.: The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J. Cell Biol.* **106**: 1563-1572 (1988)

Ganote, C.E., Vander Heide, R.S.: Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study. *Am. J. Pathol.* **129**: 327-344 (1987)

Ganote, C., Armstrong, S.: Ischemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation. *Cardiovascular Research* **27**: 1387-1403 (1993)

Gautel, M., Leonard, K., Labeit, S.: Phosphorylation of KSP motifs in the C-terminal region of titin in differentiating myoblasts. *EMBO J.* **12**: 3827-3834 (1993)

Gautel, M., Goulding, D.: A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. FEBS **385**: 11-14 (1996a)

Gautel, M., Goulding, D., Bullard, B., Weber, K., Fürst, D.O.: The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. J. Cell Sci. **109**: 2747-2754 (1996b)

Golenhofen, N., Ness, W., Koob, R., Htun, P., Schaper, W., Drenckhahn, D.: Ischemia-induced Phosphorylation and translocation of stress protein α B-crystallin to Z lines of myocardium. Am. J. Physiol. **274**: H1457-H1464 (1998)

Golenhofen, N., Htun, P., Ness, W., Koob, R., Schaper, W., Drenckhahn, D.: Binding of the stress protein α B-crystallin to cardiac myofibrils correlates with the degree of myocardial damage during ischemia/reperfusion in vivo. J. Mol. Cell. Cardiol. **31**: 569-580 (1999)

Hanson, J., Lowy, J.: The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. J. Mol. Biol. **6**: 46-60 (1963)

Harding, J.J., Crabbe, M.J.C.: in: The Eye; Davson, H., editor vol. 1b; 207-492. Academic Press, London (1984)

Hook, D.W., Harding, J.J.: Molecular chaperones protect catalase against thermal stress. Eur. J. Biochem. **247**: 380-385 (1997)

Horwitz, J.: α -crystallin can function as a molecular chaperone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 10449-10453 (1992)

Ingolia, T.D., Craig, E.A.: Four small heat-shock proteins are related to each other and to mammalian α -crystallin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 2360-2364 (1982)

Ip, W., Danto, S.I., Fischman, D.A.: Detection of desmin-containing intermediate filaments in cultured muscle and nonmuscle cells by immunoelectron microscopy. J. Cell Biol. **96**: 401-408 (1983)

Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Liem, R.K., Goldmann, J.E.: Alpha-B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. Cell **57**: 71-78 (1989)

Karmazyn, M., Mailer, K., Currie, R.W.: Acquisition and decay of heat-shock-enhanced postischemic ventricular recovery. Am. J. Physiol. **259**: H424-H431 (1990)

Kato, K., Shinohara, H., Kurobe, N., Goto, S., Inaguma, Y., Ohshima, K.: Immunoreactive α A-crystallin in rat non-lenticular tissues detected with a sensitive immunoassay system. *Biochim. Biophys. Acta* **1080**: 173-180 (1991)

Kato, K., Shinohara, H., Goto, S., Inaguma, Y., Morishita, R., Asano, T.: Compurification of small heat-shock protein with α B-crystallin from human sceletal muscle. *J. Biol. Chem.* **267**: 7718-7725 (1992)

Kato, K., Goto, S., Hasegawa, K., Inaguma, Y.: Coinduction of two low-molecular-weight stress proteins, α B-crystallin and HSP28, by heat or arsenite stress in human glioma cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **114**: 640-647 (1993)

Klemenz, R., Fröhli, E., Steiger, R.H., Schäfer, R., Aoyama, A.: AlphaB-crystallin is a small heat shock protein. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3652-3656 (1991a)

Klemenz, R., Fröhli, E., Aoyama, A., Hoffmann, S., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Schäfer, R.: AlphaB-crystallin accumulation is a specific response to Ha-ras and v-mos oncogene expression in mouse NIH3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 803-812 (1991b)

Krawetz, S.A., Narayanan, A.S., Anwar, R.A.: Invitro-translation of elastin mRNA and processing of the translated products and the signal sequence of elastin. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **61**: 274-286 (1983)

Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A., Trinick, J.: Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J.* **11**: 1711-1716 (1992)

Labeit, S., Kolmerer, B.: Titins, giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**: 293-296 (1995)

Labeit, S., Kolmerer, B., Linke, W.A.: The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ. Res.* **80**: 290-294 (1997)

Lazarides, E., Granger, B.L., Gard, D.L., O'Connor, C.M., Breckler, J., Price, M., Danto, S.I.: Desmin- and vimentin-containing filaments and their role in the assembly of the Z-disk in muscle cells. *CSH* **46**: 351-378 (1981)

Lindquist, S., Craig, E.A.: The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 631-677 (1988)

Linke, W.A., Ivemeyer, M., Olivieri, N., Kolmerer, B., Rüegg, J.C., Labeit, S.: Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J. Mol. Biol.* **261**: 62-71 (1996)

Longoni, S., James, P., Chiesi, M.: Cardiac alpha-crystallin: isolation and identification. *Mol. Cell Biochem.* **97**: 113-120 (1990a)

Longoni, S., Lattonen, S., Bullock, G., Chiesi, M.: Cardiac alpha-crystallin: intracellular localisation. *Mol. Cell Biochem.* **97**: 121-128 (1990b)

Lowe, J., McDermott, H., Pike, I., Splendlove, I., Landon, M., Mayer, R.J.: α B-crystallin expression in non-lenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease. *J. Pathol.* **166**: 61-68 (1992)

Marber, M.S., Latchman, D.S., Walker, J.M., Yellon, D.M.: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* **88**: 1264-1272 (1993)

Marber, M.S., Mestril, R., Chi, S.H., Sayen, M.R., Yellon, D.M., Dillmann, W.H.: Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest.* **95**: 1446-1456 (1995)

Martin, J.L., Mestril, R., Hilal-Dandan, R., Brunton, L.L., Dillmann, W.H.: Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* **96**: 4343-4348 (1997)

Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonmura, Y., Kimura, S., Ohashi, K., Murakami, F., Handa, S., Eguchi, G.: Connectin, an elastic protein of muscle: characterization and function. *J. Biochem.* **82**: 317-337 (1977)

Merck, K.B., Groenen, P.J.T.A., Voorter, C.E.M., de Haard-Hoekman, W.A., Horwitz, J., Bloemendal, H., de Jong, W.W.: Structural and functional similarities of bovine α -crystallin and mouse small heat-shock protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 1046-1052 (1993)

Mestril, R., Giordano, F.J., Conde, A.G., Dillmann, W.H.: Adenovirus-mediated gene transfer of a heat shock protein 70 (hsp70i) protects against simulated ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* **26**: 2351-2358 (1996)

- Mimura, N., Asano, A.: Further characterization of a conserved actin-binding 27kD fragment of actinogelin and alpha-actinin and mapping of their binding sites on the actin molecule by chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* **262**: 4717-4723 (1987)
- Moncman, C.L., Wang, K.: Nebulette: a 107kD nebulin-like protein in cardiac muscle. *Cell Motil. Cytoskeleton* **32**: 205-225 (1995)
- Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**: 1124-1136 (1986)
- Nanginemi, C.N., Baht, S.P.: Alpha-B-crystallin is expressed in kidney epithelial cell lines and not in fibroblasts. *FEBS Lett.* **249**: 89-94 (1989)
- Nehls, V., Denzer, K., Drenckhahn, D.: Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* **270**: 469-474 (1992)
- Nicholl, I.D., Quinlan, R.A.: Chaperone activity of α -crystallins modulates intermediate filament assembly. *The EMBO J.* **13**: 945-953 (1994)
- Nover, L., Scharf, K.D., Neumann, D.: Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell culture and leaves. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1648-1655 (1983)
- Perng, M.D., Muchowski, P.J., van Den Ijssel, P., Wu, G.J., Hutcheson, A.M., Clark, J.I., Quinlan, R.A.: The cardiomyopathie and lens cataract mutation in alphaB-crystallin alters its protein structure, chaperone activity, and interaction with intermediate filaments in vitro. *J. Biol. Chem.* **274**: 33235-43 (1999)
- Pierobon-Bormioli, S.: Transverse sarcomere filamentous systems: Z- and M-cables. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2**: 401-413 (1981)
- Price, M.G.: Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton – a putative load-bearing structure. *Am. J. Physiol.* **246**: H566-H572 (1984)
- Price, M.G.: Striated muscle endosarcomeric and exosarcomeric lattices. *Adv. Struct. Biol.* **1**: 175-207 (1991)
- Renkawek, K., Voorter, C.E.M., Bosman, G.J.C.G.M., van Workum, F.P.A., de Jong, W.W.: Expression of α B-crystallin in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* **87**: 155-160 (1994)

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)

Sorimachi, H., Kinbara, K., Kimura, S., Takahashi, M., Ishiura, S., Sasagawa, N., Sorimachi, N., Shimada, H., Tagawa, K., Maruyama, K., Suzuki, K.: Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J. Biol. Chem.* **270**: 31158-31162 (1995)

Stromer, M.H., Goll, D.E.: Studies on purified alpha-actinin. 2. Electron microscopic studies on the competitive binding of alpha-actinin and tropomyosin to Z-line extracted myofibrils. *J. Mol. Biol.* **67**: 489-494 (1972)

Theodorakis, N.G., Morimoto, R.L.: Posttranscriptional regulation of hsp70 expression in human cells: effects of heat shock, inhibition of protein synthesis, and adenovirus infection on translation and mRNA stability. *Mol. Cell Biol.* **7**: 4357-4368 (1987)

Tidball, J.G.: Desmin at myotendinous junctions. *Exp. Cell. Res.* **199**: 206-212 (1992)

Tokuyasu, K.T.: Visualization of longitudinally-oriented intermediate filaments in frozen sections of chicken cardiac muscle by a new staining method. *J. Cell. Biol.* **97**: 562-565 (1983a)

Tokuyasu, K.T., Dutton, A.E., Singer, S.J.: Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeletin) localization and intermediate filament organization in chicken cardiac muscle. *J. Cell. Biol.* **96**: 1736-1742 (1983b)

Tomokane, N., Iwaki, T., Tateishi, J., Iwaki, A., Goldmann, J.E.: Rosenthal fibers share epitopes with α B-crystallin, glial fibrillary acidic protein, and ubiquitin, but not with vimentin. *Am. J. Pathol.* **138**: 875-885 (1991)

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

Trinick, J., Knight, P., Whiting, A.: Purification and properties of native titin. *J. Mol. Biol.* **180**: 331-356 (1984)

Trombitas, K., Jin, J.P., Granzier, H.: The mechanically active domain of titin in cardiac muscle. *Circ. Res.* **77**: 856-861 (1995)

Trombitas, K., Freiburg, A., Centner, T., Labeit, S., Granzier, H.: Molecular dissection of N2B cardiac titin's extensibility. *Biophysical Journal* **77**: 3189-3196 (1999)

Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M.C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J.M., Paulin, D., Fardeau, M.: A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat. Genet.* **20**: 92-95 (1998)

Voorter, C.E., de Haard-Hoekman, W.A., Roersma, E.S., Meyer, H.E., Bloemendal, H., de Jong, W.W.: The in vivo phosphorylation sites of bovine alphaB-crystallin. *FEBS Lett.* **259**: 50-52 (1989)

Walker, D.M., Yellon, D.M.: Ischaemic preconditioning: from mechanisms to exploitation. *Cardiovascular Research* **26**: 734-739 (1992)

Wallace, I.P., Spencer, I.D., Fischman, D.A.: Detection of desmin-containing intermediate filaments in cultured muscle and non-muscle cells by immunoelectron microscopy. *J. Cell. Biol.* **96**: 401-408 (1983)

Wang, K., McClure, J., Tu, A.: Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 698-3702 (1979)

Wang, K., Spector, A.: α -crystallin stabilizes actin filaments and prevents cytochalasin-induced depolymerization in a phosphorylation-dependent manner. *Eur. J. Biochem.* **242**: 56-66 (1996)

Wistow, G.J., Piatigorsky, J.: Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 479-504 (1988)

7 Benutzte Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BamH1	Bacillus amyloliquefaciens H1
BSA	Bovines Serum-Albumin
cDNA	copy Desoxyribonucleic Acid
cpm	counts per minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
E. coli	Escherichia coli
EcoR1	Escherichia coli RY13
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Gravitation (Erdbeschleunigung)
Hind3	Hämophilus influenza RD3
HSP	Heat Shock Protein
Ig	Immunglobulin
kb	kilo Basen
kD	kilo Dalton
M	molar
MLU	Micrococcus luteus
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEVK	Prolin, Glutaminsäure, Valin, Lysin
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
Xba1	Xanthomonas badrii
Xho1	Xanthomonas holcicola

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Drenckhahn erarbeitet.

Herrn Prof. Dr. D. Drenckhahn danke ich für die freundliche Bereitstellung des Themas, für sein Engagement und die stete Bereitschaft, den Fortgang der Arbeit mit mir zu diskutieren bzw. mich durch fachliche Anregungen in meiner Arbeit zu unterstützen.

Besonders danke ich Frau Dr. N. Golenhofen für die aufmerksame Betreuung und die Zeit, die sie mir und meiner Arbeit im Laufe der Jahre gewidmet hat.

Sehr danken möchte ich auch Frau Dr. F. Fenner für die Einführung in die molekularbiologischen Techniken bzw. die Unterstützung bei meinen Experimenten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen technischen Assistentinnen für ihre Hilfsbereitschaft bedanken, insbesondere bei Frau H. Früh, die mir bei der Einarbeitung in den biochemischen Teil der Arbeit eine große Hilfe gewesen ist.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts der Universität Würzburg für das gute Arbeitsklima und die Bereitschaft zu Diskussionen bzw. konstruktiver Kritik.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Arbeiter
Vorname	Anja Katrin
Geburtsdatum	06. Juli 1975
Geburtsort	Münster
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch
Anschrift	Walsumermarkstraße 203 46147 Oberhausen

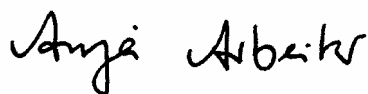
Schulbildung

1981 – 1985	Grundschule in Oberhausen
1985 - 1994	Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Oberhausen
12. Juni 1994	Abitur mit der Note sehr gut (1,0)

Hochschulstudium

01. November 1994 - 18. Mai 2001	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
18. Mai 2001	Ärztliche Prüfung mit der Note sehr gut (1,16)
seit 01. Juli 2001	Ärztin im Praktikum an der Universitäts-Kinderklinik Essen

Oberhausen, den 24.07.2001



Anja Arbeiter