

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

**Extrazelluläre Effekte des Ca²⁺-bindenden Proteins S100A1:
Grundlegende Experimente zur Morphologie und Funktion
neonataler Kardiomyozyten in Abhängigkeit der
Kulturbedingungen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Melanie Börries
aus Oldenburg in Oldenburg

Lörrach 2003

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Andrew Remppis

2. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Gez. - Dekan der Medizinischen Fakultät -

Gewidmet meiner Mutter

Linda Harder

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

I.1 Bedeutung Ca^{2+} -bindender Proteine für die Ca^{2+} -Homöostase.....	1
I.2 S100 Proteinfamilie	1
I.3 Das Ca^{2+} -bindende Protein S100A1.....	3
I.4 Extrazelluläre Effekte von S100 Proteinen.....	4
I.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	5

II. Methoden und Material

II.1 Versuchstiere und Tierhaltung.....	7
II.2 Präparation neonataler Kardiomyozyten und Fibroblasten.....	7
II.2.1 Entnahme von Rattenherzen.....	7
II.2.2 Aufreinigung der Zellen.....	8
II.2.3 Haltung der primären Zellkultur.....	10
II.2.4 Bestimmung der Schlagfrequenz von spontan schlagenden Kardiomyozyten.....	10
II.2.5 Bestimmung der Zellkerngröße von Kardiomyozyten und Fibroblasten.....	10
II.3 Markierung der Zellen mittels Immunfluoreszenz.....	11
II.3.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen.....	11
II.3.2 Markierung der Zellen.....	13
II.3.3. Antikörper.....	15
II.3.4 Konfokales Lasermikroskop.....	16
II.4 Stimulation der Zellen mit rekombinantem humanem S100A1.....	17
II.4.1 Aufreinigung von rekombinantem humanem S100A1 Protein.....	17
II.4.2. Konzentrationsbestimmung des rekombinanten S100A1 Proteins.....	18
II.4.3 Elektrophoresetechnik.....	19
II.4.3.1 Polyacrylamidgelelektrophorese.....	19
II.4.3.2. Westernblot von Polyacrylamidgelen.....	21
II.4.3.3 Spezifische Anfärbung von Antigenen auf Blotmembranen.....	22
II.4.4 Kopplung des aufgereinigten S100A1 mit Alexa Fluor™ 568.....	24
II.4.5 Stimulierung der Zellen mit gekoppeltem und freiem rekombinantem S100A1.....	24
II.5 Transfektion von Kardiomyozyten mit einem pEGFP-S100A1-Konstrukt.....	25

III. Ergebnisse

III.1 Charakterisierung der Zellkulturmodelle.....	26
III.1.1 Differenzierung der Kardiomyozyten in Abhängigkeit der Kulturdauer.....	26
III.1.2 Verhältnis von Kardiomyozyten zu Fibroblasten in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode.....	27
III.2 Subzelluläre Lokalisation von endogenem S100A1 in Kardiomyozyten.....	31
III.2.1 S100A1 Lokalisation in Abhängigkeit von Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden.....	31

III.2.2 Transfektionen von Kardiomyozyten mit einem pEGFP-S100A1-Konstrukt.....	31
III.2.3 S100A1 Lokalisation in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode.....	32
III.2.4 Sequentiell optische Schnitte der S100A1 Lokalisation in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode.....	33
III.2.5 Kolokalisationsuntersuchungen von S100A1 und Aktin (Phalloidin) in neonatalen Kardiomyozyten.....	35
III.3 Darstellung von zytoskelettalen und Ca ²⁺ -regulierenden Proteinen in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode.....	37
III.3.1 Subzelluläre Lokalisation zytoskelettaler Proteine: α -Aktinin, Desmin und Tubulin.....	37
III.3.2 Subzelluläre Lokalisation Ca ²⁺ -regulierender Proteine: Ryanodin-Rezeptor und SERCA2a.....	38
III.4 Stimulation von Kardiomyozyten mit rekombinantem S100A1.....	39
III.4.1 Charakterisierung des aufgereinigten rekombinanten S100A1.....	39
III.4.2 Aufnahme und Charakterisierung des farbstoff-gekoppelten S100A1 in Kardiomyozyten.....	40
III.5 Auswirkung der S100A1 Stimulation auf die Morphologie von Kardiomyozyten.....	46
III.5.1 Effekte der S100A1 Stimulation auf zytoskelettale Proteine.....	46
III.5.2 Effekte der S100A1 Stimulation auf Ca ²⁺ -regulierende Proteine.....	47
III.5.3 Funktionelle Effekte in S100A1 stimulierten Kardiomyozyten.....	49
III.6 Auswirkung der S100A1 Stimulation auf Fibroblasten.....	50
III.6.1 Aufnahme des farbstoff-gekoppelten S100A1 in Fibroblasten.....	50
III.6.2 Funktionelle Effekte in S100A1 stimulierten Fibroblasten.....	50
 IV. Diskussion	
IV.1 Charakterisierung der basalen Zellkulturbedingungen.....	52
IV.2 Die Lokalisation von endogenem S100A1 in Kardiomyozyten ist abhängig von der Zellkulturmethode und der Fixierungsmethode.....	53
IV.2.1 Die Lokalisation von endogenem S100A1 in Kardiomyozyten ist abhängig von der Fixierungsmethode.....	53
IV.2.2 Die Lokalisation von endogenem S100A1 in Kardiomyozyten ist abhängig von der Zellkulturmethode.....	55
IV.3 Effekte von extrazellulär zugefügtem S100A1 auf Kardiomyozyten und Fibroblasten.....	56
IV.3.1 Extrazelluläres S100A1 hat keine Auswirkung auf die Morphologie von zytoskelettalen Proteinen.....	56
IV.3.2 Extrazelluläres S100A1 hat keine Auswirkung auf die Morphologie von Ca ²⁺ - regulierenden Proteinen.....	57
IV.3.3 Steigerung der Proliferationsrate von Fibroblasten durch eine S100A1 Stimulation.....	58
IV.3.4 Extrazelluläres S100A1 steigert die spontane Schlagfrequenz der Kardiomyozyten in Abhängigkeit des Fibroblastenanteils.....	59

IV.4 Definition zellulärer Aufnahmemechanismen von S100A1 durch Kardiomyozyten und Fibroblasten.....	61
V. Zusammenfassung.....	62
VI. Literaturverzeichnis.....	64
VII. Danksagung.....	72
VIII. Curriculum vitae.....	73

VI. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BrdU	Bromodeoxyridine
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CaM	Calmodulin
ddH ₂ O	doppelt entsalztes Wasser
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenyindole
DEA	Diethanolamin
EGTA	Ethylenglykol(bisaminoethyl)tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]etansulfonsäure
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
kDa	Kilodalton
MAP Kinase	mitogen activated protein kinase
Min.	Minuten
Ndr Kinase	„nuclear serine/threonine protein kinase“
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	„receptor for advanced glycosylated end products“
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERCA2a	sarkoendoplasmatische Retikulum-ATPase 2a
SR	sarkoplasmatisches Retikulum

Abkürzungsverzeichnis

Std.	Stunde
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

I.1 Bedeutung Ca^{2+} -bindender Proteine für die Ca^{2+} -Homöostase

Die vielfältigen Effekte, in die Ca^{2+} (Kalzium) als universeller Botenstoff im System der Eukaryonten von der Zelldifferenzierung bis zur Apoptose funktionell eingebunden ist, beruhen auf molekularer Ebene nicht auf einer direkten Ca^{2+} -Wirkung, sondern werden durch spezifische Ca^{2+} -bindende Proteine vermittelt. Die größte Gruppe Ca^{2+} -bindender Proteine stellt die Superfamilie EF-Hand Ca^{2+} -bindender Proteine dar, von der bereits mehr als 200 verschiedene Mitglieder identifiziert werden konnten. Das Motiv der EF-Hand, das in der Natur als Ca^{2+} -Komplexbildner weit verbreitet ist, weist generell eine repetitive Helix-Loop-Helix Sekundärstruktur auf (Persechini et al., 1989). Diese Leitstruktur wurde erstmals im dritten Ca^{2+} -bindenden Motiv von Parvalbumin beschrieben und gilt als strukturelle Determinante der EF-Hand Proteinsuperfamilie (Moews und Kretsinger, 1975).

Der weit überwiegende Teil dieser Proteinfamilie moduliert als Ca^{2+} -Puffer die Kinetik intrazellulärer Ca^{2+} -Transienten und trägt subzellulär im Zytosol zur rigiden Kontrolle des Ca^{2+} -Signals bei. Der mit etwa 10 % deutlich kleinere Anteil Ca^{2+} -bindender Proteine weist biophysikalische Eigenschaften von Ca^{2+} -Sensoren auf, die nach Binden von Ca^{2+} selbst mit spezifischen Zielproteinen interagieren und so das Ca^{2+} -Signal in spezifische Funktionen übersetzen (Heizmann und Hunziker, 1991). Welche spezifischen Funktionen mit dem Ca^{2+} -Signal in einer bestimmten Zellart verbunden sind, wird durch das vorherrschende Expressionsmuster der EF-Hand Ca^{2+} -bindenden Proteinisoformen bestimmt. Im Myokard sind als bekannteste Vertreter dieser Proteinsuperfamilie Troponin C und Calmodulin zu nennen, die als Ca^{2+} -Sensoren eine zentrale Rolle in der Initiierung der sarkomerischen Kontraktion bzw. in der Ca^{2+} -abhängigen Regulation von CaM (Calmodulin) Kinasen spielen.

I.2 S100 Proteinfamilie

Eine muskelphysiologisch noch wenig charakterisierte Subgruppe EF-Hand Ca^{2+} -bindender Proteine stellt die Familie der S100 Proteine dar, von der inzwischen 21 verschiedene Mitglieder identifiziert wurden (Donato, 2003). Die von Moore 1965 erstmals beschriebenen Proteine zeichnen sich durch eine Löslichkeit in gesättigter Ammoniumsulfatlösung aus und wurden daher als „S100“ Proteine bezeichnet (Moore, 1965). Mit Ausnahme weniger (S100B, CALB 3, S100P) sind alle bisher identifizierten S100 Proteine auf einem engen Cluster auf Chromosom 1q21 (450kB) kodiert, so-

dass sich die neue Nomenklatur an der Lokalisierung der Gene auf diesem Cluster orientiert (Schäfer et al., 1995). Aufgrund ihrer hohen Ca^{2+} -Affinität und niedrigen Ca^{2+} -Bindungskapazität (Baudier und Gerard, 1986a) dienen S100 Proteine als intrazelluläre Ca^{2+} -Sensoren, die das Signal des ubiquitären *second messenger* Ca^{2+} durch Interaktion mit spezifischen Zielproteinen in spezifische zelluläre Antworten übersetzen. Bis auf eine Ausnahme weisen alle S100 Proteine zwei EF-Hand Domänen als Ca^{2+} -Bindungsepitope auf, die durch eine zentrale Scharnierregion miteinander verbunden sind und von stark hydrophoben Proteinabschnitten flankiert werden (Abb.1).

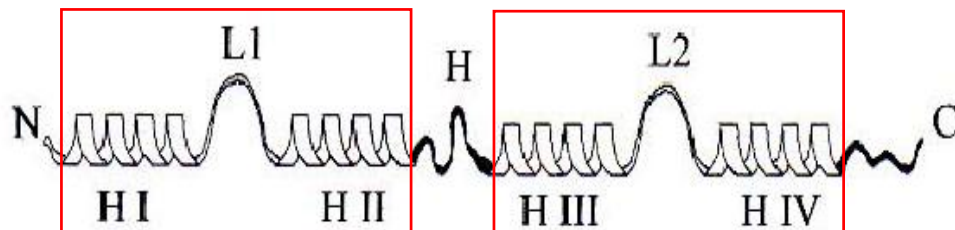


Abb. 1: Sekundärstruktur einer monomeren S100 Untereinheit (Donato, 1991). Ein Monomer besteht aus 2 EF-Hand Motiven: HI-L1-HII= Helix-Loop-Helix (rot markiert). Beide EF-Hand Motive werden durch eine Scharnierregion (H= Hinge) verbunden. N= N-terminal, C= C-terminal.

Diese Scharnierregion ist innerhalb der S100 Proteinfamilie hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung stark variabel, wodurch die unterschiedlichen Bindungseigenschaften für divalente Kationen begründet werden (Baudier et al., 1986b). Das Binden von Ca^{2+} an diesen EF-Hand Motiven führt zu einer Konformationsänderung im S100 Molekül, die zu einer koordinierten Präsentation von Scharnierregion und hydrophoben Proteinabschnitten an der Oberfläche des Moleküls resultiert und somit die Interaktion mit Zielproteinen erlaubt (Baudier et al., 1986b). Die Spezifität der Interaktion zwischen S100 Protein und Zielprotein wird zum einen durch die zellspezifische Expression der S100 Proteine sowie durch die spezifische Aminosäuresequenz des jeweiligen S100 Proteins in der Scharnierregion bestimmt (Heizmann und Cox, 1998). Bisherige Arbeiten belegen, dass S100 Proteine in verschiedenen Geweben funktionell in die Regulation von grundlegenden biologischen Funktionen wie Zellzyklus, Zelldifferenzierung und verschiedener Signaltransduktionswege eingebunden sind. Interessanterweise findet man bei verschiedenen metabolischen, chronisch inflammatorischen und neoplastischen Erkrankungen eine differentielle Expression von S100 Proteinen, für die im jeweiligen pathophysiologischen Geschehen eine bedeutende funktionelle Rolle vermutet wird (Schäfer und Heizmann, 1996).

I.3 Das Ca^{2+} -bindende Protein S100A1

S100A1 wird auf dem ersten Gen des S100 Clusters kodiert und stellt aus muskelphysiologischer Sicht das interessanteste S100 Protein dar. Expressionsstudien belegen ein weitgehend muskelspezifisches Vorkommen mit höchstem Expressionsniveau in Kardiomyozyten. Subzelluläre Analysen von S100A1 weisen im Herz- und Skelettmuskel Variationen hinsichtlich ihrer Lokalisation auf. So zeigten elektronenmikroskopische Daten von Haimoto und Kato die Lokalisation von S100A1 an subzellulären Strukturen des Sarkolemms, des sarkoplasmatischen Retikulums, des Zellkernes und des kontraktiven Apparates (Haimoto und Kato, 1987; Haimoto und Kato, 1988; Kato und Kimura, 1985). Donato et al. konnten in ihren Lokalisationsstudien zeigen, dass S100A1 an den Membranen des Sarkolemms, des Sarkoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien und der transversalen Tubuli und nicht am kontraktiven Apparat lokalisiert ist (Donato et al., 1989; Sorci et al., 1999; Arcuri et al., 2002). Bis heute wurden jedoch keine Lokalisationsuntersuchungen von S100A1 an neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt.

Erste funktionelle Studien zu S100A1 im Skelettmuskel implizierten, dass S100A1 muskelspezifische Funktionen aufweist, indem es mit der Beeinflussung von Ca^{2+} -Homöostase, Zytoskelettarchitektur und Glycogenmetabolismus (Zimmer et al., 1995) ein möglicherweise zentrales muskuläres Regulatorprotein darstellt. So aktiviert S100A1 Ca^{2+} -abhängig die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum des Skelettmuskels, wobei S100A1 durch direkte Interaktion mit dem Ryanodin-Rezeptor (sarkoplasmatischer Ca^{2+} -release channel) die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals steigert (Treves et al., 1997). Weitere Untersuchungen zeigten eine Beeinflussung der Zytoskelettarchitektur durch das Ca^{2+} -bindende Protein S100A1. Neben der in *vitro* Polymerisation von Tubulin und Desmin inhibiert S100A1 auch die Interaktion von F-Aktin (filamentöses Aktin) mit Titin und senkt so die Viscoelastizität und passive Spannung des Myozyten (Donato, 1988; Garbuglia et al., 1999; Yamasaki et al., 2001). Daten von Adhikari et al. (Adhikari und Wang, 2001) konnten ferner zeigen, dass S100A1 die Kontraktilität im Skelettmuskel mittels Desensibilisierung der Ca^{2+} -Aktivität modulieren kann. Die Arbeiten von Most et al. und Du et al. konnten schließlich das Konzept belegen, dass S100A1 einen neuen zentralen Regulator der myokardialen Funktion darstellt (Most et al., 2001; Du et al., 2002). Während eine adenovirale Überexpression des S100A1 Proteins im Kardiomyozyten zu einer signifikant gesteigerten Kontraktilität bei erhaltener β -adrenerger Ansprechbarkeit

führt (Most et al., 2001), zeigt sich im Modell der S100A1 Knockout Maus, dass die kardiale Reserve aufgehoben ist und hämodynamische Belastungen bei fehlender β -adrenerger Ansprechbarkeit des Myokards nicht mehr mit einer gesteigerten Kontraktilität einhergehen (Du et al., 2002). Diese Daten gewinnen insofern an klinischer Bedeutung, als gezeigt werden konnte, dass bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz das Ca^{2+} -bindende Protein S100A1 signifikant minderexprimiert ist (Remppis et al., 1996), während in einem Modell der rechtsventrikulären kompensierten Hypertrophie signifikant erhöhte S100A1 Spiegel mit einer gesteigerten Kontraktilität einhergingen (Ehlermann et al., 2000). Diese Beobachtungen führten schließlich zur Hypothese, dass S100A1 ein neues Kandidatengenen zur Behandlung der Herzinsuffizienz darstellen könnte.

I.4 Extrazelluläre Effekte von S100 Proteinen

Für einige S100 Proteine konnten neben intrazellulären Effekten auch extrazelluläre Aktivitäten aufgezeigt werden.

So beeinflusst extrazellulär zugegebenes S100A1 und S100B Protein positiv die Proliferationsrate von Neuronen und PC12 Zellen (Phächromocytomzellen) (Zimmer et al., 1998; Selinfreund et al., 1991). Ebenso ist auch S100A12 in der Lage, das Wachstum von Neuronen des Hippokampus positiv zu beeinflussen (Mikkelsen et al., 2001). Hinsichtlich der extrazellulären Funktionen konnten Hoffman et al. und Huttunen et al. den RAGE- Rezeptor ("receptor for advanced glycosylated end products"), ein sogenannter Multiligand Rezeptor der Immunglobulinsuperfamilie, als zentralen Oberflächenrezeptor von S100A12 und S100B bestimmen (Hofmann et al., 1999; Huttunen et al., 2000). Zugleich konnten Huttunen et al. eine Interaktion zwischen extrazellulär zugefügtem S100A1 und S100B mit dem RAGE-Rezeptor zeigen, wobei beide Proteine in der Lage waren, die Aktivität des Rezeptors zu steigern, woraus ein Neuritenwachstum und eine Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF-kappa B resultierte. Ein weiterer Kandidat der S100 Proteinfamilie, S100A4, weist ebenso extrazelluläre Effekte wie Stimulation von Neuritenwachstum, Zellproliferation von Gliazellen und chemotaktische Aktivitäten auf (Selinfreund et al., 1991; Belot et al., 2002; Novitskaya et al., 2000). Auch S100A13 ist in wachstumsabhängige Mechanismen involviert, indem es auf die Regulation der Sekretion von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren Einfluss nimmt (Mouta Carreira et al., 1998). Die Sekretion aus Zellen ist bereits für S100A4, S100B und S100A8/S100A9 (Duarte et al., 1999;

Donato, 2001) bekannt, wobei die Sekretion von S100A8/S100A9 aus Monozyten über einen ER- (Endoplasmatisches Retikulum)-Golgi-unabhängigen Weg abläuft (Rammes et al., 1997).

Daten zur extrazellulären Funktion bzw. zu den Sekretions- und Aufnahmemechanismen von S100A1 liegen nur wenige vor. Es konnte bis heute lediglich gezeigt werden, dass S100A1 bei Ischämien aus Kardiomyozyten freigesetzt wird (Kiewitz et al., 2000; Brett et al., 2001), wobei hinsichtlich einer extrazellulären Funktion von S100A1 auf Kardiomyozyten überhaupt keine Resultate vorliegen.

Solche extrazellulären Effekte lassen sich prinzipiell sehr gut in einem definierten Modell der Zellkultur untersuchen, da einerseits systemische Einflüsse ausgeschlossen werden und zweitens Proteine als hochgereinigte Medienzusätze hinsichtlich ihrer extrazellulären Effekte zielgerichtet untersucht werden können. Zwei grundsätzliche Probleme erschweren jedoch einen solchen Ansatz:

Erstens wird in den meisten bisherigen Arbeiten der Tatsache nur wenig Rechnung getragen, dass Zellkulturen von isolierten Kardiomyozyten aufgrund einer sehr variablen Kontamination mit Fibroblasten nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind. Zweitens ist aufgrund möglicher differentieller Effekte von S100 Proteinen auf Kardiomyozyten und Fibroblasten mit sekundärer Sekretion von Wachstumsfaktoren die Beurteilung direkter und indirekter Effekte von S100A1 auf Kardiomyozyten nur schwierig interpretierbar.

I.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war daher zunächst an verschiedenen definierten Zellkulturbedingungen unter spezieller Berücksichtigung der Fibroblastenanteile zu untersuchen, welche subzelluläre Lokalisation endogenes S100A1 in Kardiomyozyten aufweist und welche möglichen Effekte eine S100A1 Stimulation auf Kardiomyozyten und Fibroblasten hat.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung waren folgende grundlegenden Arbeitsschritte notwendig:

1. Definition der basalen Zellkulturbedingungen für neonatale Kardiomyozyten.
2. Lokalisation von endogenem S100A1 unter definierten Kulturbedingungen und in Abhängigkeit der Fixierungsmethode.
3. Evaluierung der Schlagfrequenz als funktionelles Korrelat und Evaluierung der Lokalisation zytoskelettaler und Ca^{2+} -regulierender Proteine als morphologisches

Korrelat möglicher S100A1 assoziierter Effekte.

4. Definition zellulärer Aufnahmemechanismen von S100A1 durch Kardiomyozyten.
5. Evaluierung der Proliferationsrate von Fibroblasten als möglicher S100A1 assoziierter Effekt.

II. Material und Methoden

II.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden drei Tage alte neonatale Whistar Ratten beider Geschlechter verwendet, die bis zum Entnahmezeitpunkt bei den Muttertieren verblieben und von diesen ernährt wurden.

Der im folgenden beschriebene Versuchsablauf wurde als Tierversuchsantrag beim Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein eingereicht und durch den Bescheid vom 01.03.1996 mit dem Aktenzeichen 1/A3/96 genehmigt.

II.2 Präparation neonataler Kardiomyozyten und Fibroblasten

II.2.1 Entnahme von Rattenherzen

Die Tiere wurden mittels sterilen Instrumenten dekapitiert und thorakotomiert. Die Herzen wurden mit steriler Pinzette entnommen und in 4 °C kaltem 1-fach-ADS-Puffer gewaschen, wobei anschließend die Vorhöfe separiert wurden. Die Ventrikel wurden im 1-fach-ADS-Puffer mit einer Schere zerkleinert und alle Stücke wurden im Puffer auf Eis gesammelt.

ADS-Puffer-Stock (10-fach)

1.16 M NaCl	68.0 g	
0.20 M Hepes	47.6 g	
8.6 mM NaH ₂ PO ₄	1.20 g	
56 mM Glucose	10.0 g	
54 mM KCL	4.00 g	
8.0 mM MgSO ₄	2.00 g	/ ddH ₂ O ad 1l, pH 7.35, steril filtrieren.

1-fach-ADS-Puffer

ADS-Puffer-Stock	100 ml
dd H ₂ O	900 ml

Der 1-fach-ADS-Puffer wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

II.2.2 Aufreinigung der Zellen

Die weitere Präparation ebenso wie die Kultivierung und Stimulation der Zellen wurde unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Die zerkleinerten Gewebestückchen wurden im Wheaton-Becher bei 37 °C mit einer Kollagenase-Lösung (Komiyama et al., 1996) verdaut. Die Lösung setzte sich aus 108 Einheiten/ml Kollagenase (Worthington, Type II) und 0.6 mg/ml Pankreatin in 1-fach-ADS-Puffer zusammen, die nach Filtration auf Eis gehalten wurde.

Nach dem ersten sechs minütigen Verdau wurde, nachdem sich die Gewebestückchen abgesetzt hatten, der erste Überstand verworfen. Es folgte ein 20 minütiger Verdau, der insgesamt fünfmal wiederholt wurde, wobei nun jedesmal der Überstand, in dem sich die isolierten Zellen befanden, abgenommen wurde, und anschließend bei 1400 rpm für sechs Min. bei 20 °C zentrifugiert wurde. Die jeweiligen Pellets wurden in sterilem neugeborenen Kälberserum (Gibco BRL, Deutschland) resuspendiert und bei 37 °C gehalten. Nach Beendigung des Verdaues wurden die erlangten Zellen in Kälberserum erneut (1400 rpm, 20 °C, sechs Min.) zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1-fach-ADS-Puffer resuspendiert und auf einem Percoll-Gradienten, bestehend aus Top-u.-Bottom Percoll, pipettiert (Komiyama et al., 1996). Die Gradienten wurden anschließend für 35 Min. bei 20 °C und 3000 rpm zentrifugiert. In der oberen leichteren Schicht (Top-Percoll: 1.059 g/ml) konzentrierten sich Nicht-Kardiomyozyten (zu 99 % Fibroblasten), die zuerst abpipettiert wurden, und in der unteren, rot markierten, schwereren Schicht (Bottom-Percoll: 1.082 g/ml) befanden sich Kardiomyozyten. Die beiden Zellarten wurden getrennt gesammelt und nochmals mit 1-fach-ADS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (1400 rpm, 20 °C, sechs Min.) und dann in Medium (siehe Punkt II.2.3) aufgenommen. Die Zellzahl wurde hierbei mit der Neubauer-Zählkammer unter Verwendung eines inversen Mikroskops bei 20 facher Vergrößerung bestimmt. Der Anteil der vitalen Zellen wurde durch die Anwendung der Trypanblau Methode getestet. Vitale Zellen nehmen aufgrund der Integrität ihrer Zellmembran den Farbstoff nicht auf und können so unter dem Mikroskop von blaugefärbten, d.h. nicht-vitalen Zellen, unterschieden werden.

Nach dieser Aufreinigung erlangte man zu Beginn eine primäre Zellkultur, die zu 95 % aus neonatalen Kardiomyozyten und zu 5 % aus Fibroblasten bestand (Zellpräparationsmethode I) sowie eine reine Fibroblastenkultur. Da sich jedoch die Fibroblasten regelmässig ca. alle 22 Std. teilten und folglich bei längerer Kulturdauer an Zellzahl deutlich zunahm, wurden folgende Schritte durchgeführt, um die Kontamination der Kardiomyozytenkultur mit Fibroblasten so gering wie möglich

zu halten:

Da sich Fibroblasten schneller als Kardiomyozyten auf einer Kulturschale absetzen, wurde die Zellfraktion bzw. primäre Kultur zweimal über eine Std. in einer Kulturschale im Brutschrank ruhen gelassen, um danach jeweils die im Überstand angereicherten Kardiomyozyten zu gewinnen (Zellpräparationsmethode II). Um nun noch die restlich verbleibenden Fibroblasten in ihrer Zellzahl einzuschränken, wurde als zusätzlicher Ansatz eine Kardiomyozytenkultur gewählt, die nach dem zweimaligen Absetzen (für 1 Std.) mit 0.1 mM BrdU (Bromodeoxyridine, Sigma Deutschland) behandelt wurde. (Zellpräparationsmethode III). BrdU hemmt in dieser Konzentration die Zellteilung der Fibroblasten, ohne dabei negativ auf die Kardiomyozytenkultur zu wirken (Klein et al., 1985). BrdU wurde in einer Konzentration von 50 mM in PBS-Puffer angesetzt und in der entsprechenden Verdünnung direkt ins Medium pipettiert. Bei jedem Mediumwechsel wurde dann auch immer wieder frisches BrdU hinzupipettiert. Somit erlangten wir unterschiedliche primäre Zellkulturen, die an der Anzahl von Kardiomyozyten und Fibroblasten variierten. Um den genauen Anteil von Kardiomyozyten im Verhältnis zu den Fibroblasten zu bestimmen, wurden die Zellen am Tag sechs fixiert (Punkt II.3.1) und zunächst mit dem Antikörper α -Aktinin markiert (Punkt II.3.2), um anschließend mit DAPI (4, 6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma, Deutschland) markiert zu werden.

DAPI bindet an die DNS der einzelnen Zellen, sodass die Zellkerne zur Darstellung kommen. Mittels der α -Aktinin-Markierung konnte man nun Kardiomyozyten von Fibroblasten unterscheiden, um dann durch Zählung der Zellkerne das Verhältnis von Fibroblasten zu Kardiomyozyten zu bestimmen. Um eine Orientierung beim Auszählen der Zellen zu haben, wurden die Zellen auf Koordinaten-markierte-Deckgläser (Eppendorf, Deutschland) gesetzt, wobei ein markiertes Deckglas 37 Felder enthielt.

<u>Percoll-Stock:</u>	Percoll (Fa. Pharmacia)	90 ml	
	10-fach-ADS-Puffer	10 ml /	Dichte 1.110 g/ml
<u>Top-Percoll:</u>	Percoll-Stock	36 ml	
	1-fach-ADS-Puffer	44 ml /	Dichte 1.059 g/ml

<u>Bottom-Percoll:</u>	Percoll-Stock	52 ml
	1-fach-ADS-Puffer	27 ml
	Phenolrot	1 ml / Dichte 1.082 g/ml

II.2.3 Haltung der primären Zellkultur

Die Zellen wurden nach der Aufreinigung in frisch angesetzttem Kulturmedium resuspendiert. Alle Produkte des Mediums stammten von der Fa. Gibco BRL (Deutschland). Die Zellen wurden, je nach Versuchsart, in einer 12-Loch-Platte oder in einer 24-Loch-Platte verteilt, und bei 37 °C in einem 5 % CO₂ und 95 % Luft angereicherten, feuchten Brutschrank gehalten.

Das Medium wurde jeden zweiten Tag unter sterilen Bedingungen gewechselt.

Kulturmedium:	DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)	440 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	L-Glutamin	5 ml
	Fetales Kälberserum	50 ml

Das Kulturmedium wurde bei 4 °C gelagert und vor jedem Mediumwechsel auf 37 °C erwärmt.

Die Kulturschalen, 12-Loch-u.-24-Loch-Platten, stammten von der Firma Nunc (Deutschland).

II.2.4 Bestimmung der Schlagfrequenz von spontan schlagenden

Kardiomyozyten

Die Schlagfrequenz von spontan schlagenden Kardiomyozyten wurde mittels eines inversen Mikroskops bei 20 facher Vergrößerung bestimmt. Es wurden alle Schläge pro Minute gezählt. Hierbei wurden insgesamt 10 Zellen pro Methode gezählt und anschließend statistisch (Student-T-Test) ausgewertet.

II.2.5 Bestimmung der Zellkerngröße von Kardiomyozyten und Fibroblasten

Es wurden jeweils bei 10 Zellkernen nach Aufnahme eines konfokalen Bildes (Punkt II.3.4) der horizontale und vertikale Durchmesser gemessen (Abb. 2), um anschließend die statistischen Mittelwerte und Signifikanzen (Student-T-Test) zu bestimmen. Die Zellkerne wurden durch DAPI markiert, wobei Kardiomyozyten mit einer α -Aktinin Markierung (Punkt II.3) identifiziert wurden.

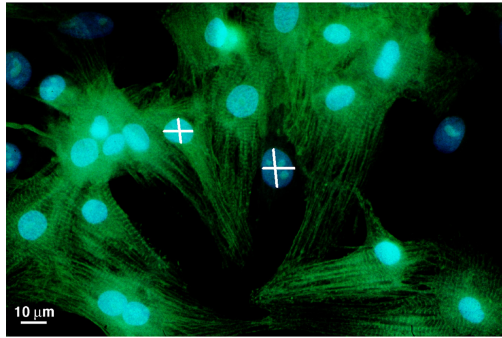


Abb. 2: Darstellung der vertikalen und horizontalen Durchmesser der Zellkernen von Kardiomyozyten und Fibroblasten, die zuvor mit α -Aktinin und DAPI markiert worden sind. Maßstab: 10 μ m

II.3 Markierung der Zellen mittels Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden nach Isolation und gegebenenfalls anschließendem Absetzen direkt auf sterile Deckgläser ausplattiert (Durchmesser von 18 mm, Dicke von 0.17 ± 0.005 mm), die sich in einer 12-Loch-Platte befanden.

Die Zellzahl pro Deckgläschen betrug ca. 100.000. Daraus ergab sich eine Dichte von 40.000 Zellen pro cm^2 . Zu den einzelnen Löchern wurde ein ml Medium zugegeben, und anschließend wurde die Platte im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

II.3.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Die Zellen wurden direkt auf den Deckgläsern in der 12-Loch-Platte fixiert.

Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gründlich gespült. Aufgrund der Tatsache, dass hinsichtlich einer subzellulären S100A1 Lokalisation unterschiedliche Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden beschrieben wurden (Mandinova et al., 1998; Donato et al., 1989), wählten wir folgende zwei Methoden zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen:

(a) Paraformaldehyd-Fixierung mit anschließender TritonX-Permeabilisierung

(b) Octyl-Poe-Permeabilisierung mit anschließender Glutaraldehyd-Fixierung.

Methode (a):

Zellen wurden für 15 Min. mit einer 4 % Paraformaldehydlösung (Fa. Merck, Deutschland) fixiert. Im Anschluss an diese Fixierung wurden die Zellen erneut mit PBS-Puffer gespült, wobei die 12-Loch-Platte für 30 Min. auf einem Schüttler sanft bewegt und alle 10 Min. der Puffer gewechselt wurde, um das restliche Paraformaldehyd auszuwaschen. Die Zellen wurden dann für fünf Min. mit 0.2 % TritonX-100 (Fa. Fluka, Deutschland) permeabilisiert und anschließend wieder über

30 Min. (Schüttler) mehrfach mit PBS-Puffer gewaschen.

PBS-Puffer

137mM NaCl	8.00 g	
3 mM KCl	0.20 g	
10 mM NaH ₂ PO ₄	1.44 g	
2 mM KH ₂ PO ₄	0.24 g	/ ddH ₂ O ad 1l, pH 7.4

4 % Paraformaldehyd-Lösung

4 g Paraformaldehyd

4 g Sucrose / ddH₂O ad 100 ml, pH 7.4

Die Lösung mußte auf 60 °C erwärmt und mit schwacher Base versetzt werden, damit sich das Paraformaldehyd löste. Nach Neutralisation (pH 7) mit schwacher Säure wurde die 4 % Paraformaldehydlösung in 10 ml Einheiten aliquotiert und bei –20 °C aufbewahrt.

0.2 % TritonX-100-Lösung

200 µl TritonX-100

100 ml PBS

Methode (b):

Zellen wurden für 5 Min. mit der Lösung I, bestehend aus Octyl-Poe (Fa. Alexis, Schweiz) und Glutaraldehyd (Fa. Fluka, Deutschland), permeabilisiert und gleichzeitig leicht fixiert (aufgrund der Zugabe von Glutaraldehyd). Anschließend folgte ein kurzer Waschschrift mit Zellpuffer, worauf die endgültige Fixierung mit Glutaraldehyd (Lösung II) für 20 Min. erfolgte. Im Anschluss erfolgte wie bei Methode (a) ein 30 minütiger Waschschrift mit Zellpuffer.

Da Glutaraldehyd aufgrund der höheren Anzahl an freien Aldehydgruppen eine höhere Eigenfluoreszenz als Paraformaldehyd aufweist (Glutaraldehyd zeichnet sich durch 4 freie Aldehydgruppen pro Molekül und Paraformaldehyd durch 1 Gruppe pro Molekül aus), folgte nach der Fixierung ein sogenannter Blockierungsschritt der Aldehydgruppen mit Natriumborhydrid (NaBH₄) für 2x 10 Min. auf Eis. Abschließend wurde wieder ein 30 minütiger Waschschrift durchgeführt.

Lösung I: 2 % Octyl-Poe

0.125 % Glutaraldehyd, in Zellpuffer, pH 6.3

Lösung II: 2 % Glutaraldehyd, in Zellpuffer, pH 6.3

Blockierungslösung: 2 % NaBH₄, in Zellpuffer, pH 6.3

<u>Zellpuffer:</u>	137 mM NaCl	8.0 g	
	5 mM KCl	0.4 g	
	1.1 mM NaH ₂ PO ₄	0.6 g	
	0.4 mM KH ₂ PO ₄	0.06 g	
	5.5mM Glucose	1.0 g	
	4 mM Na ₂ HCO ₃	0.35 g	
	2 mM MgCl ₂	0.4 g	/ ddH ₂ O ad 1l, pH 6.3

II.3.2 Markierung der Zellen

Die Markierung der Zellen wurde ebenfalls direkt in den 12-Loch-Platten durchgeführt. Es wurden vor allem sogenannte indirekte Markierungen durchgeführt, bei denen man zunächst einen primären Antikörper inkubiert und diesen anschließend mit einem entsprechenden spezifischen sekundären Antikörper, an dem ein Fluorochrom gekoppelt ist, detektiert (indirekte Markierung, Abb. 3A).

Die fixierten Zellen wurden mit dem primären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in PBS-Puffer für zwei Std. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden sie kurz mit PBS-Puffer gespült. Der passende sekundäre Antikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in PBS-Puffer für 60 Min. bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle wurde unter den gleichen Bedingungen nur der jeweilige sekundäre Antikörper inkubiert. Ab dem Zeitpunkt der Inkubation des sekundären Antikörpers wurden die Zellen bzw. die 12-Loch-Platte mit einem Karton abgedunkelt, um das Ausbleichen der Fluorochrome durch Lichteinstrahlung zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen für 10 Min. mit PBS-Puffer auf dem Schüttler (abgedunkelt) wurden die Deckgläser unter Mowiol 4-88 (Hoechst, Deutschland) auf einem Glasobjektträger eingedeckelt (Mandinova et al., 1998).

Die Objektträger wurden für 24 Std. bei RT im Dunkeln gelagert und danach bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Bei den sogenannten Doppelmarkierungen wurde zunächst, wie oben beschrieben,

eine einfache Markierung mit Inkubation des primären und sekundären Antikörpers durchgeführt, und nach einem 30 minütigem Waschschrift mit PBS-Puffer erfolgte anschließend die nächste Inkubation eines zweiten primären Antikörpers und dessen zugehörigen spezifischen Sekundärantikörper. In diesen Untersuchungen wurden nur Doppelmarkierungen mit S100A1 und Phalloidin durchgeführt. Da Phalloidin schon direkt mit einem Fluorochrom (Farbstoff) gekoppelt war, bestand somit die Doppelmarkierung aus einer zuerst durchgeführten indirekten S100A1-Markierung (Abb.3A) und einer anschließenden direkten Phalloidin-Markierung (Abb. 3B)

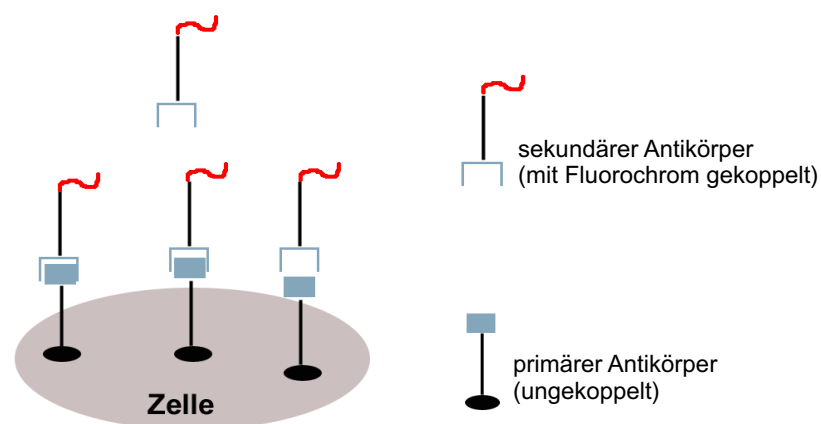


Abb.3A: indirekte Immunfluoreszenzmarkierung. Inkubation des ungekoppelten primären Antikörper und anschließender Inkubation des spezifischen sekundären Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper

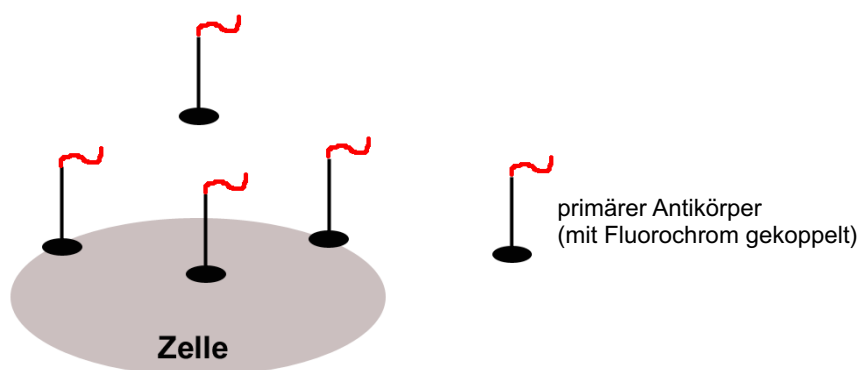


Abb. 3B: direkte Immunfluoreszenzmarkierung. Der Primäre Antikörper ist direkt mit ein Fluorochrom gekoppelt.

II.3.3. Antikörper

Sowohl die primären als auch die sekundären Antikörper waren kommerziell erhältlich und weisen eine spezifische Bindung des jeweiligen Epitops auf. Die optimalen Verdünnungen der unterschiedlichen Antikörper wurden für die Zellen zuvor ausgetestet. Die primären und sekundären Antikörper wurden immer entsprechend in PBS-Puffer verdünnt und bis zur Inkubation mit den Zellen auf Eis gelagert.

Die jeweiligen primären und sekundären Antikörper sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti-S100A1	Maus	1:500	Sigma Deutschland
Anti-Ryanodin-Rezeptor	Maus	1:500	Molecular Probes Niederlande
Anti-SERCA2a	Maus	1:500	Molecular Probes Niederlande
Anti- α (alpha)-Aktinin	Maus	1:3000	Sigma Deutschland
Anti-Desmin	Maus	1:200	Zymed USA
Anti-Tubulin	Maus	1:50	Böhringer Deutschland
Anti-Transferrin	Maus	1:500	Sigma Deutschland
Anti-Caveolin-3	Ziege	1:400	Santa Cruz USA

DAPI ist kein Antikörper, sondern ein Farbstoff, der an DNS bindet und somit die Darstellung des Zellkerns ermöglicht. DAPI (1mg/ml) wurde 1:1000 im PBS-Puffer

verdünnt und jeweils für 10 Min. mit den Zellen inkubiert. Phalloidin ist ein Pilzgift, das spezifisch an filamentöses Aktin bindet. Phalloidin-Alexa 488 wurde in einer Verdünnung von 1:800 verwendet und Phalloidin-Alexa 568 in einer Verdünnung von 1:3000.

Tabelle 2

Sekundärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Esel-anti-Maus-Cy3	Esel	1:3000	Amersham Life Science USA
Kaninchen-anti-Maus-Alexa 488	Kaninchen	1:800	Molecular Probes Niederlande
Esel-anti-Ziege-Alexa 488	Ziege	1:800	Molecular Probes Niederlande

II.3.4 Konfokales Lasermikroskop

Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen, bestehend aus einer Odyssey XL konfokaler Laser-Scanning-Einheit (Noran, USA) und einem Leica Fluoreszenz Mikroskop. Das Mikroskop war mit einer Leica Plan APO 100x Öl-Objektiv-Linse und einer 63-Öl-Objektiv-Linse ausgestattet.

Gesteuert wurde dieses Mikroskop über eine INDY Workstation (Silicon Graphics Inc., USA) mittels eines Software Packetes von Leica (Baschong et al., 1999). Die Lichtquelle für den sekundären Alexa 488-Antikörper und für Phalloidin-Alexa 488 war ein Argon-Laser, der das Fluorochrom mit einer Wellenlänge von 488 nm anregt. Für den Cy3-Antikörper, Phalloidin-Alexa 568 und das Fluorochrom Alexa 568 wurde der Krypton-Laser angewendet, der sein Wirkungsmaximum bei einer Wellenlänge von 568 nm hat. Somit treten Färbungen mit dem sekundären Alexa 488-Antikörper als grünes Bild in Erscheinung und der Cy3-Antikörper führt zu einem roten Bild. Die Bilder wurden mit der zugehörigen Leica-Software (Zürich, Schweiz) bearbeitet.

Die mit DAPI markierten Strukturen mussten mit einer UV-Lampe detektiert werden. Da das konfokale Lasermikroskop nicht mit einem UV-Laser ausgestattet war, wurden diese Bilder mit einem konventionellen Zeiss-Floureszenzmikroskop und der

zugehörigen Kamera aufgenommen. Nach der Entwicklung wurden die Diapositive eingescannt und entsprechend den konfokal erstellten Bilder mit Photoshop auf das gewünschte Format gebracht.

II.4 Stimulation der Zellen mit rekombinantem humanem S100A1

II.4.1 Aufreinigung von rekombinantem humanem S100A1 Protein

Humanes rekombinantes S100A1 wurde mit geringfügigen Veränderungen nach der Methode von Pedrocchi et al. (1994) gereinigt. Die genetisch veränderten E. coli Bakterien wurden von der Abteilung für Klinische Chemie des Kinderspitals Zürich bezogen. Die Bakterien wurden bis zu ihrer Verwendung in 50 % Glycerin in LB-Medium bei -80°C gelagert und bei Bedarf nach folgendem Schema angesetzt:

- 3 ml LB-Medium (autoklaviert)+ 50 µg/ml Ampicillin für Übernachtskultur
- mit Impföse Übernachtskultur aus Vorratsgefäß beimpfen und bei 37°C schütteln
- am nächsten Tag 3 ml Übernachtskultur zu 250 ml LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin hinzugeben
- nach 2-3 Std. OD-Messung bei 600 nm. Ab $\text{OD} > 0.5$ wird 120 µl 1 M IPTG hinzugegeben
- nach 3-4 Std. die Bakteriensuspension bei 10.000 rpm für 20 Min. zentrifugieren
- erzielten Pellets 3 bis 4-mal einfrieren und auftauen (Flüssigstickstoff), um die E. coli zu lysieren, danach in 5-10 ml Extraktionspuffer sonifizieren. Zentrifugation bei 20.000 rpm für 1 Std.
- Zugabe von Ammoniumsulfat zur Proteinlösung bis zu einer Endkonzentration von 1 M, erneute Zentrifugation bei 2000 rpm
- bis zu 5 ml Überstand wurden auf eine 1 ml Octyl-Sepharose-Säule (Fa. Pharmacia) aufgetragen, das Protein in ca. 10 Volumina eluiert nach Umschalten auf Puffer B
- Einkonzentrieren des Eluats in einer Speed-Vac-Pumpe auf 1 bis 2 ml
- Umsalzen über eine Hi-Trap Desalting-Säule (Fa. Pharmacia)

<u>LB-Medium:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7.5)	2.42 g
	LB Broth Base	20.0 g / ddH ₂ O ad 1l

Extraktionspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 6.06 g
50 mM KCl 3.73 g / ddH₂O ad 1l

Um höhermolekulare Verunreinigungen zu entfernen, wurde nach Durchführung der hydrophoben Interaktionschromatographie eine Anionenaustauscherchromatographie mit einer UnoQ-1 Säule der Fa. BioRad angeschlossen. (Ehlermann et al., 2001). Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina Puffer A gespült (Durchflussgeschwindigkeit zwei ml/Min.), danach über eine Minute ein Gradient auf 10 % Puffer B generiert, gefolgt von einem Gradienten über 60 Min. von 10 % auf 40 % des Puffers B. Zum Schluss wurde die Säule mit 100 % Puffer B gespült. Das Protein wurde dann in PBS-Puffer umdialysiert.

A-Puffer: 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 3.03 g / ddH₂O ad 1l

B-Puffer: 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 3.03 g
1,0 M NaCl 58.44 g / ddH₂O ad 1l

Anschließend wurde die Konzentration des aufgereinigten Proteins bestimmt und dementsprechend in Aliquots bei –20 °C eingefroren.

II.4.2. Konzentrationsbestimmung des rekombinanten S100A1 Proteins

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösungen wurde der BC Protein Assay von der Fa. BioRad (Deutschland) verwendet. Als Standardprotein wurde bovines Serumalbumin (BSA) verwendet, mit dem eine Standardkonzentrationsreihe von 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 und 1 mg/ml angesetzt wurde. Das rekombinante S100A1, welches in PBS-Puffer gelöst war, wurde so verdünnt, dass die Konzentration zwischen 0.1 und 1 mg/ml zu erwarten war.

Bestandteile:

Reagenz A	alkalische Kupfertartrat-Lösung
Reagenz B	verdünntes Folin-Reagenz
Reagenz S	Detergenz

Ansatzprotokoll:

- 50 µl Probenlösung/Standard in Reagenzglas pipettieren
- 250 µl Reagenz A (+ 2 % Reagenz S) dazupipettieren
- 2 ml Reagenz B dazupipettieren und schütteln
- nach 15 Min. (bis max. 1 Std.) bei 750 nm Wellenlänge im Photometer ablesen

II.4.3 Elektrophoresetechnik**II.4.3.1 Polyacrylamidgelelektrophorese**

Da mit dem herkömmlichen Elektrophorese-Verfahren (Laemmli, 1970) mit einem Puffersystem aus Glycin und Tris kaum eine gute Auftrennung von Proteinen unter 10 kDa erzielt wird, gelangte ein neu entwickeltes Elektrophoresepuffersystem nach Ehlermann (Ehlermann et al., 2001) mit Taurin und Tris zum Einsatz. Diese neue Methode erlaubt eine Auftrennung von Proteinen der Größe von 1 bis 100 kDa. Zudem zeichnet sich Taurin durch eine geringere Wärmeentwicklung und Artefaktbildung aus.

Stammlösungen und Puffer:

<u>Elektrophoresepuffer:</u>	0.1 M Tris	12.1 g	
	0.1 M Taurin	12.6 g	
	0.1 % SDS	1.00 g	/ ddH ₂ O ad 1l
	pH nicht einstellen !		
<u>Monomerelösung:</u>	29.1 % Acrylamid	58.2 g	
	0.9 % Bis	1.90 g	/ ddH ₂ O ad 200 ml
<u>Trenngelstammlösung:</u>	1.5 M Tris-HCL (pH 8.8)	18.2 g	/ ddH ₂ O ad 200 ml
<u>Sammelgelstammlösung:</u>	0.5 M Tris-HCL (pH 6.8)	6.05 g	/ ddH ₂ O ad 100 ml
<u>Probenpuffer:</u>	0.5 M Tris-HCL (pH 6.8)	6.05 g	
	5 % SDS	5.00 g	
	10 % Glycerin	10 ml	
	0.05 % Bromphenolblau	50 µl	
	5 % β-Mercaptoethanol	5 ml	/ ddH ₂ O ad 100 ml

Tabelle 3

<u>Gelansatz:</u>	Sammelgel	Trenngel
Stammlösungen	5 % T, 3 % C	15 % T, 3 % C
Monomerlösung (29,1/0,9)	1.65 ml	20 ml
Trenngelstammlösung	-	10 ml
Sammelgelstammlösung	2.5 ml	-
TEMED	100 µl	40 µl
Auffüllen mit Aqua bis	10 ml	200 µl

APS 10 %	100 µl	200 µl
----------	--------	--------

Versuchsablauf:

1. Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel wurden bis auf Ammoniumpersulfat (APS) in einem Reaktionsgefäß gemischt und mit einer Vakuumpumpe entgast. Die gereinigten Glasplatten wurden mit speziellen Gelklammern abgedichtet.
2. APS wurde zum Trenngelansatz hinzupipettiert und nach kurzem Durchmischen luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Zusätzlich wurde das Gel mit 70 % Ethanol vorsichtig überschichtet, um einen gleichmäßigen und glatten Oberrand des Trenngels zu erhalten. Das Gel konnte bei RT auspolymerisieren.
3. Nach 30 bis 60 Min. war das Trenngel auspolymerisiert und die Ethanolschicht konnte abgegossen werden. Das Sammelgel wurde, nach Zugabe von APS, direkt auf das Trenngel gegossen und anschließend wurde der Kamm zur Aussparung der Probenaschen vorsichtig ins Sammelgel eingesteckt. Das Sammelgel war nach ca. 30 Min. auspolymerisiert.

Probenaufbereitung:

Rekombinantes S100A1 wurde im Volumenverhältnis 1:1 mit Probenpuffer vermischt. Dabei wurde das Protein in einer Konzentration von 0.2 bis 1 µg angesetzt. Das Gesamtvolumen der Proben betrug jeweils 20 µl. Anschließend wurden die Proben für 3 Min. bei 95 °C erhitzt und bis zum Auftragen auf Eis gehalten.

Elektrophoresebedingungen:

1. Das mit Proben beladene Gel wurde in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer (Fa. Pharmacia, Freiburg) gestellt, die kontinuierlich auf 4 °C gekühlt wurde. Das Gel wurde mit 50 V (max. 10 V/cm Trennstrecke) gestartet bis die Probe komplett aus den Taschen ins Sammelgel übergetreten waren.
2. Dann wurde eine konstante Stromstärke von 20 mA/cm² (Gelquerschnitt) angelegt.
3. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die unterste Bande (entsprach ca. 9 kDA) des vorgefärbten Proteinstandardgemisches zwei cm vom unteren Gelrand entfernt war.

II.4.3.2. Westernblot von Polyacrylamidgelen

Der Westernblot diente zur Überprüfung des aufgereinigten S100A1 mittels eines spezifischen Antikörpers.

Da das übliche Semi-Dry-Verfahren (Towbin et al., 1979) keinen ausreichenden Transfer von hydrophoben Ca²⁺-bindenden Proteinen auf eine PVDF-Membran gewährleistet, wurde der Transfer in einer Tankblotkammer (Wetzel, Laborgerätebau, Zürich, Schweiz) durchgeführt.

Vorbereitung des Gels:

1. Der interessierende Bereich des Trenngels, die PVDF-Membran (ImmobilonTM-P, Fa. Millipore, Deutschland) und die Whatman Filterpapiere (Fa. Schleicher und Schüll, Deutschland) wurden auf die Größe der Tankblotkammer zurechtgeschitten (z.B. 8x8 cm).
2. Die PVDF-Membran wurde in 100 % Methanol benetzt und anschließend im Transferpuffer äquilibriert.
3. Als erstes wurden auf die eine Hälfte der Kammer luftblasenfrei zwei transferpuffergetränkte Filterpapiere aufgelegt, darauf die PVDF-Membran, das Gel und zum Schluss wieder zwei Filterpapiere. Die Blotkammer wurde dann sorgfältig verschraubt und in den Tank zwischen den zwei Elektroden versenkt, wobei die negativ geladenen Proteine zur positiven gerichteten Membran transferiert wurden.
4. Das Gel wurde dann bei konstanter Spannung (U=50V) für zwei Std. geblotet.

<u>Transferpuffer:</u>	20 % Methanol	200 ml	
	15 mM Taurin	1.82 g	
	15 mM Tris	1.88 g	/ ddH ₂ O ad 1l

II.4.3.3 Spezifische Anfärbung von Antigenen auf Blotmembranen

Die Sensitivität des Westernblots konnte durch Verwendung von Chemilumineszenz gegenüber den herkömmlichen Systemen, wie z.B. Chloronaphtol, erheblich gesteigert werden. Es wurde ein kommerziell erhältlicher Kit der Fa. Tropix (Western-Light Plus™ Chemiluminescent Detection System, Deutschland) verwendet. An Sekundärantikörper gekoppeltes Biotin wurde durch Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase gebunden, welches CSPD® unter Lichtentwicklung umsetzte. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein biotinylierter Proteinstandard eingesetzt.

Kit:

- Chemiluminescent Substrate: 25 mM Ultra reines CSPD® (11.6mg/ml), 100-fach
- I-Block™: hochreines Casein, ohne alkalische Phosphatase-Aktivität
- Nitro-Block™: enhancing material (10mg/ml), 20-fach
- DEA: 99% reines Diethanolamin
- Konjugierter Sekundär-Antikörper: Ziege-anti-Maus-IgG, Biotin-gekoppelt
- AvidinAP: Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat
- 50 % Glycerin in dd H₂O

Reagenzien und Puffer:

<u>Trispuffer (TBS), 10-fach:</u>	0.25 M Tris	30.28 g	
	1.50 M NaCl	87.66 g	
	10 mM CaCl ₂	1.50 g	/ ddH ₂ O ad 1l

<u>Waschpuffer:</u>	10 % TBS 10-fach	50 ml	
	0.1 % Tween-20	500 µl	/ ddH ₂ O ad 500ml

<u>Blockierpuffer:</u>	0.2 % I-Block™	1 g	
	10 % TBS 10-fach	50 ml	
	0.1 % Tween-20	500 µl	/ ddH ₂ O ad 500ml

I-Block wurde zunächst in der Hälfte des Endvolumens aufgelöst und vorsichtig in einem Mikrowellenofen erwärmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Lösung nicht kochte. Anschließend konnten das Restvolumen und Tween-20 dazugegeben werden. Die Lösung wurde vor Gebrauch auf RT abgekühlt.

<u>Assaypuffer:</u>	0.1 M Diethanolamin	2.4 ml/ 2.63 g
	1mM MgCl ₂	50 mg / ddH ₂ O ad 500ml
<u>Substratlösung:</u>	0.24 mM CSPD®	50 µl
	95 % Assaypuffer	4.75 ml
	5 % Nitro-Block™	250 µl
<u>Ablösepuffer:</u>	0.2 M Glycerin-HCl (pH 2.2)	4.5 g
	0.1 % SDS	0.3 g
	1 % Tween-20	3 ml / ddH ₂ O ad 300ml
<u>Avidix-AP:</u>	Western-Light-Plus™ Chemiluminescent Detection System, Tropix, Bedford, MA, USA	

Entwicklungsprotokoll:

- Spülen in Waschpuffer für 5 Min.
- Inkubation in Blockierpuffer für 60 Min. (oder über Nacht)
- Inkubation in Primärantikörper anti-S100A1(1:20000 in Blockierpuffer) für 60 Min.
- Waschen in Blockierpuffer für zweimal 10 Min.
- Inkubation in Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10000) für 30 Min.
- Waschen in Blockierpuffer für zweimal 10 Min.
- Inkubation in Avidix-AP (1:20000 in Blockierpuffer) für 30 Min.
- Waschen in Blockierpuffer für dreimal 10 Min.
- Waschen in Assaypuffer für zweimal 5 Min.
- Inkubation mit Substratlösung für 5 Min.
- Abstreifen der Substratlösung
- Membran in Kunststoffbeutel einlegen und Exposition eines Autoradiographiefilm (Fa. Amersham) für ca. 1-5 Min.

II.4.4 Kopplung des aufgereinigten S100A1 mit Alexa Fluor™ 568

Das aufgereinigte S100A1 Protein wurde im PBS-Puffer dialysiert und in einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt.

Die Kopplung des Proteins wurde mit dem Alexa Fluor™ 568 Protein Labeling Kit (A-10238) von der Firma Molecular Probes durchgeführt. Der Kit enthielt alle nötigen Substanzen und Materialien, die für die Kopplung notwendig waren. Das Fluorochrom

Alexa Fluor™ 568 hatte sein Absorptions- und Fluoreszenzemissionsmaximum zwischen 577 nm und 603 nm, woraus eine spezifische Erregung bei 568 nm resultierte. Das reaktive Fluorochrom reagierte spezifisch mit primären Aminen des zu koppelnden Proteins und bildete somit einen stabilen Protein-Fluorochrom-Komplex. Die Kopplung lief in folgenden Schritten ab:

- 0.5 ml der Proteinlösung wurden mit 50 µl 1 M Natriumbikarbonat (pH 8.3) gemischt.
- Die Proteinlösung wurde mit dem reaktiven Fluorochrom Alexa Fluor™ 568, der in entsprechender Konzentration in einem Gefäß vorlag, gut gemischt.
- Zu dem Reaktionsgefäß wurden 17 µl Hydroxylaminlösung hinzugefügt, um danach bei RT die Lösung für 30 Min. rühren zu lassen.
- Die Reaktionslösung wurde auf eine Säule geladen.
- Daraufhin wurde der Elution-Puffer langsam auf die Säule geladen, bis die erste Farbbande in der Nähe des Säulengrundes erschien.
- Der von der Säule eluierte Puffer wurde aufgefangen und gesammelt.
- Während des Säulenlaufes erkannte man die Auftrennung in zwei Farbbanden. Bei der oberen Bande handelte es sich um das ungekoppelte Fluorochrom, in der unteren Bande ist das gekoppelte Protein enthalten.
- Sowohl das gekoppelte Protein als auch das ungekoppelte Fluorochrom wurden nacheinander in zwei Gefäßen aufgefangen.

Das gekoppelte Protein und das restliche ungekoppelte Fluorochrom wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

II.4.5 Stimulierung der Zellen mit gekoppeltem und freiem rekombinatem S100A1

Die Zellen wurden erstmals 12 Std. nach der Zellpräparation mit rekombinantem S100A1 Protein in einer Konzentration von 1 µM stimuliert. Danach wurde den Zellen jeden zweiten Tag mit dem Mediumwechsel erneut 1 µM S100A1 zugeführt, wobei am Tag sechs die Stimulationsversuche gestoppt wurden.

Stimulationsversuche mit farbstoff-gekoppeltem S100A1 wurden am Tag sechs für 2 Std. sowie für 5 Min. durchgeführt. Auch hier wurde das farbstoff-gekoppelte Protein direkt ins Medium in einer Konzentration von 1 µM pipettiert. Zudem wurde unter Ca^{2+} -abhängigen Kulturbedingungen die Aufnahme von farbstoff-gekoppeltem Protein untersucht. Dabei wurde entweder Ca^{2+} -freies Kulturmedium mit 2 mM Ca^{2+} oder mit 2 mM EGTA angereichert.

Als Negativkontrolle wurde unter den gleichen Bedingungen der Farbstoff Alexa Fluor™ 568 (1 μ M) oder PBS-Puffer verwendet.

Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen fixiert (siehe II.3.1). An fixierten Zellen wurden nach Permeabilisation indirekte Immunfluoreszenz Markierungen mit unterschiedlichen primären Antikörpern durchgeführt.

II.5 Transfektionen von Kardiomyozyten mit einem pEGFP-S100A1-Konstrukt

Da S100A1 in vorherigen Untersuchungen unterschiedlich lokalisiert worden ist, wurden die Zellen mit einem pEGFP-S100A1-Konstrukt transfiziert, um die Lokalisation des überexprimierten pEGFP-S100A1-Fusionsproteins zu analysieren. Die Kardiomyozyten wurden am Tag vier mit einem etablierten Transfektionskit „Effectene Transfection Reagent“ von der Firma Qiagen (Deutschland) transfiziert. Das pEGFP-S100A1-Konstrukt wurde uns freundlicherweise von Frau PD Dr. Cora-Ann Schönenberger zur Verfügung gestellt. 14 Std. nach der Transfektionszeit wurden die Zellen mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und mit frischem Medium für weitere 16 Std. kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die transfizierten Zellen entweder mit 4 % Paraformaldehyd fixiert (Punkt II.2.2) und in Mowiol eingedeckelt, um anschließend mit einem konfokalen Mikroskop Bilder zu erstellen. Oder die transfizierten Zellen wurden ohne Fixierung direkt als Life-Imaging (Echt-Zeit Aufnahme) aufgenommen. Die Transfektionsrate der primären Kardiomyozytenkultur betrug ca. 10 %.

III. Ergebnisse

III.1 Charakterisierung der Zellkulturmodelle

III.1.1 Differenzierung der Kardiomyozyten in Abhängigkeit der Kulturdauer

Zur Charakterisierung des Differenzierungsstatus einer Kardiomyozytenkultur über die Zeit wurden Zellen nach einer Kulturdauer von 24 Std., 48 Std., vier und sechs Tagen fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen α -Aktinin durchgeführt. Alle Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, fixiert und gefärbt wie es unter Punkt II.3 beschrieben worden ist.

Die morphologische Differenzierung der primären Kardiomyozyten ist in der Abb. 4 dargestellt. Nach 24 Std. (Abb. 4A) hatten sich die Kardiomyozyten auf den Deckgläsern zwar abgesetzt, wiesen aber noch eine runde Form auf. α -Aktinin liess sich bereits darstellen, obschon noch keine Z-Scheiben erkennbar waren. Für die Negativkontrolle wurde lediglich der Sekundärantikörper eingesetzt (Esel-anti-Maus-Cy3) (Abb. 4A Bildeinlage). Die Kardiomyozyten fingen bereits nach 24 bis 36 Std. an zu schlagen. Nach 48 Std. begannen sich die Zellen auszubreiten, wurden flacher und nahmen an Volumen zu (Abb. 4B). Allmählich zeichnete sich eine regelmäßigere Anordnung des α -Aktinins ab und Ansätze der Z-Streifen traten hervor.

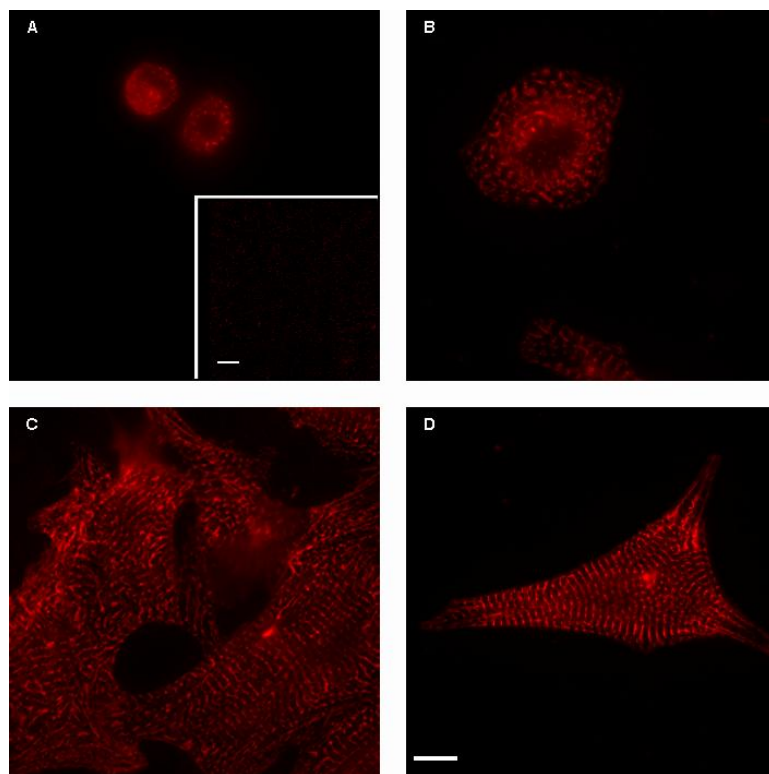


Abb. 4: Markierung der Zellen mit α -Aktinin bei unterschiedlicher Kulturdauer. A: nach 24 Stunden. B: nach 48 Stunden. C: nach vier Tagen. D: nach sechs Tagen. Im Einschub des Bildes A wurde nur der Sekundärantikörper benutzt (Kontrolle). Maßstab: 10 μ m

Nach ungefähr vier Tagen hatten die Kardiomyozyten eine Einzelschicht (Monolayer) synchron schlagender Zellen gebildet und die regelmäßige Anordnung der Sarkomere war deutlich erkennbar (Abb. 4C). Das charakteristische Auftreten von α -Aktinin in geordneten Z-Scheiben von sechs Tage alten Kardiomyozyten wird in der Abb. 4D gezeigt. Aufgrund dieses zeitlichen Verlaufes der Differenzierung von Kardiomyozyten wurden alle Versuche am Tag sechs beendet, zu einem Zeitpunkt also, an dem sich ein Monolayer differenzierter Kardiomyozyten gebildet hatte, der synchrone Kontraktionen aufwies.

Insgesamt wurden Jungtiere von 30 Muttertieren benötigt, wobei pro Wurf durchschnittlich 10 bis 12 Neugeborene verwendet werden konnten. Somit erhielt man bei jeder Zellpräparation, ausgehend von 10 neonatalen Ratten, im Durchschnitt acht Millionen vitale Kardiomyozyten. Der Vitalitätsnachweis und die Anzahl der Kardiomyozyten wurde bereits unter Punkt II.2.2 beschrieben. Allerdings hatte sich die Ausbeute an Kardiomyozyten um zwei Millionen verringert, wenn die Präparationsmethode ein zweimaliges Absetzenlassen (Zellpräparationsmethode II) zur Reduktion der Fibroblasten beinhaltete (siehe unten).

III.1.2 Verhältnis von Kardiomyozyten zu Fibroblasten in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode

Die frisch isolierte Zellpopulation bestand vorwiegend aus Kardiomyozyten, enthielt aber auch eine geringe Anzahl an Fibroblasten, die sich im Gegensatz zu den Kardiomyozyten, in Kultur zu teilen vermögen. Um unterschiedliche Fibroblastenanteile in der Gesamtzellkultur zu erhalten wurden drei unterschiedliche Präparationsmethoden ausgearbeitet (Punkt II.2.2).

Zum einen wurden die Zellen direkt nach der Aufreinigung auf Deckgläser verteilt und in Kultur gehalten (Zellpräparationsmethode I). Zum anderen wurden die Zellen für zwei Mal eine Stunde abgesetzt bevor sie anschließend ausgesät wurden (Zellpräparationsmethode II). Oder die Zellkultur wurde nach dem zweistündigen Absetzen zusätzlich mit BrdU behandelt (Zellpräparationsmethode III).

Zellen, die entsprechend einer dieser Methoden präpariert worden waren, wurden jeweils nach einer Kulturdauer von sechs Tagen fixiert und mit einem Antikörper gegen α -Aktinin (grün) inkubiert. Um das Verhältnis zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten bestimmen zu können, wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI (blau) angefärbt. Zur Erleichterung der Zellkernauszählung wurden die Zellen auf

Koordinaten-Deckgläser ausgesät, wobei zuerst unter dem Mikroskop alle mit DAPI markierten Zellkerne ausgezählt (Abb. 5B) wurden, um anschließend, die anhand der α -Aktinin Markierung identifizierten Kardiomyozyten auszuzählen (Abb. 5A).

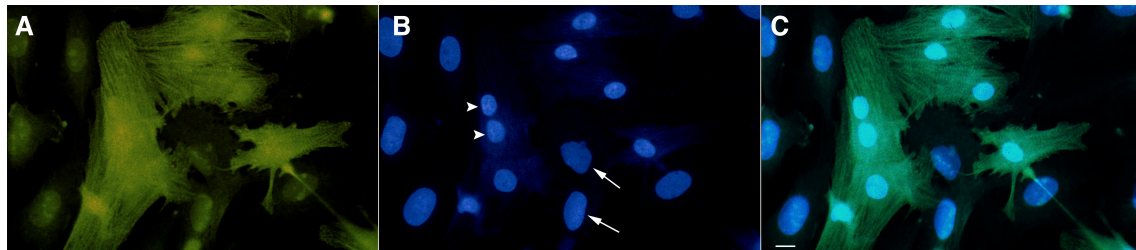


Abb. 5: Doppelfärbung der Zellen mit α -Aktinin und DAPI bei Zellpräparationsmethode I. A: Darstellung der Kardiomyozyten durch α -Aktinin. B: Darstellung der Zellkerne durch DAPI. Pfeile markieren die größeren Kerne der Fibroblasten, die Pfeilköpfe zeigen Kerne der Kardiomyozyten. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 10 μ m

Anhand der quantitativen Erfassung aller Zellen im koordinaten-markierten Bereich des Deckgläschens konnte man das Verhältnis von Kardiomyozyten zu Fibroblasten für jede der drei Zellpräparationsmethoden bestimmen (Abb. 6). So resultierte bei der Zellpräparationsmethode I ein relativer Kardiomyozytenanteil von 45 % und ein Fibroblastenanteil von 55 %. Durch das zweimalige Absetzenlassen bei der Zellpräparationsmethode II erhöhte sich der Kardiomyozytenanteil am Tag sechs auf 66 %. Durch die BrdU Behandlung bei der Zellpräparationsmethode III konnte man den Anteil von Kardiomyozyten weiter auf 89 % steigern.

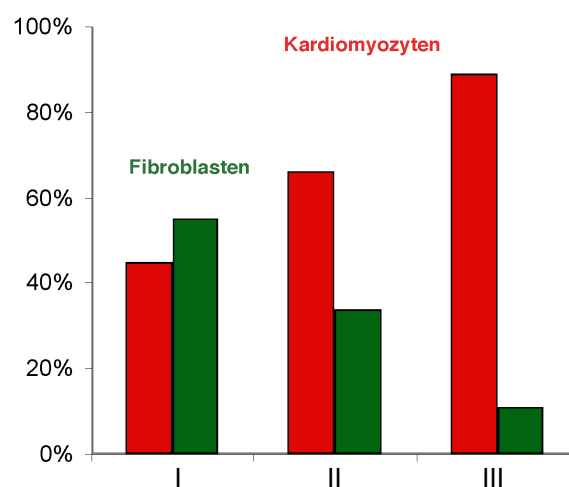


Abb. 6: Kardiomyozyten- und Fibroblastenanteil in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethoden I-III. I: keine weitere Behandlung nach der Aufreinigung. II: zweimaliges Absetzen der Zelle für eine Stunde. III: Absetzen der Zellen (wie bei II) und anschließender regelmäßiger BrdU-Behandlung.

Auch ohne direktes Auszählen der Zellen kann man in der Abb. 7 bereits durch die α -Aktinin und DAPI Markierung den unterschiedlichen Anteil an Kardiomyozyten und Fibroblasten in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethoden erkennen.

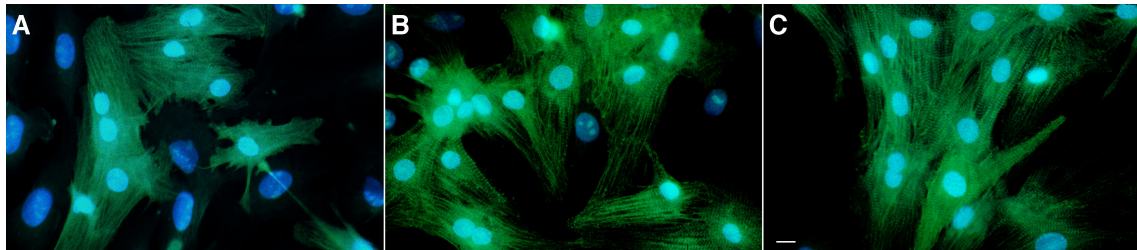


Abb. 7: Doppelfärbung der Zellen mit α -Aktinin und DAPI bei unterschiedlicher Zellpräparationsmethode. A: Zellpräparationsmethode I. B: Zellpräparationsmethode II. C: Zellpräparationsmethode III. Maßstab: 10 μ m

Anhand der mit DAPI durchgeführten Zellkernfärbung konnte dokumentiert werden, dass Zellkerne von Fibroblasten, dargestellt in Abb. 5B (Pfeil), in der Regel größer sind als die von Kardiomyozyten (Abb. 5B, Pfeilköpfe). Dies wurde statistisch bei jeweils 10 Zellkernen beider Zelltypen ausgewertet (Abb. 8). Damit verfügte man neben der Identifizierung mittels einer α -Aktinin Markierung über einen weiteren Differenzierungsmarker für Fibroblasten und Kardiomyozyten.

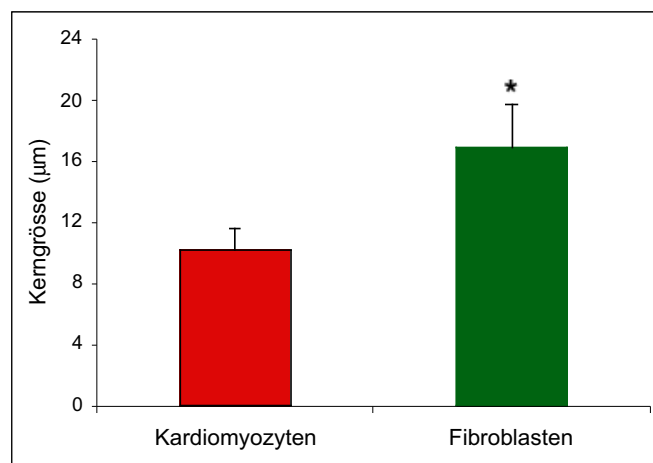


Abb. 8: Bestimmung der Zellkerngröße von Kardiomyozyten und Fibroblasten. Die Zellkerngröße wurde aus dem horizontalen und vertikalen Durchmesser berechnet. Es wurden von beiden Zelltypen jeweils 10 Kerne berechnet. * : $p < 0.05$.

In der Literatur wurde hinsichtlich der Aufreinigung von Kardiomyozyten fast ausschließlich die Zellpräparationsmethode II angewendet (Robert et al., 2001; Rakhit et al., 2001; Gomez et al., 1996). Wie oben gezeigt wurden bei dieser Methode nicht nur Kardiomyozyten isoliert, sondern auch Fibroblasten. Wir haben bei der

Durchführung unserer Zellexperimente jeweils alle drei Zellpräparationsmethoden verwendet, um zu überprüfen, welchen Einfluss möglicherweise der unterschiedliche Fibroblastenanteil auf die Verteilung von S100A1 bzw. auf den Effekt der exogenen S100A1 Stimulationen ausübt.

Als funktioneller Parameter wurde für die unterschiedlichen Zellpräparationsmethoden ferner die spontane Schlagfrequenz der Kardiomyozyten am Tag sechs bestimmt (Abb. 9). Hierbei konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten mit dem relativen Fibroblastenanteil korreliert.

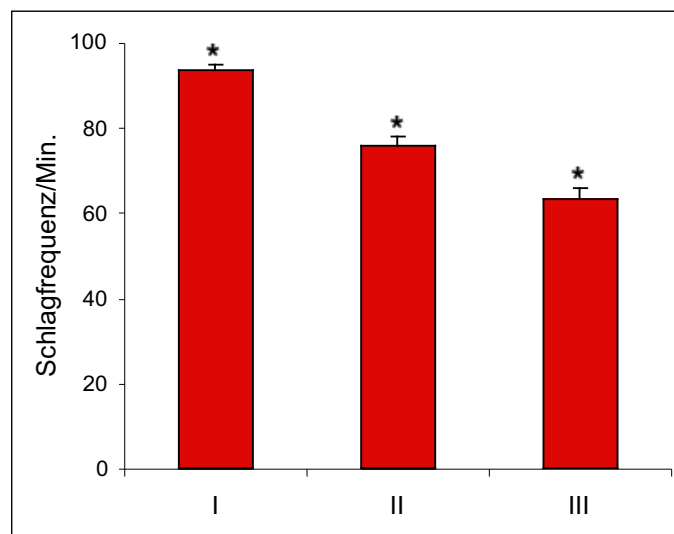


Abb. 9: Schlagfrequenz/Min. von spontan schlagenden Kardiomyozyten bei unterschiedlichen Zellpräparationsmethoden (I-III). * : $p < 0.05$.

III.2 Subzelluläre Lokalisation von endogenem S100A1 in Kardiomyozyten

III.2.1 S100A1 Lokalisation in Abhängigkeit von Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden

S100A1 stellt einen neuen zentralen Regulator der Ca^{2+} -Homöostase und Kontraktilität des Kardiomyozyten dar. Bis dato war jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welche subzelluläre Lokalisation S100A1 in neonatalen Kardiomyozyten aufweist. In adulten Kardiomyozyten wird von zwei unterschiedlichen S100A1 Lokalisationen berichtet. Zum einen wird eine zytoplasmatische und membranständige Lokalisation von S100A1 beschrieben (Donato et al., 1989; Sorci et al., 1999) und zum anderen wird S100A1 zytoplasmatisch und am kontraktilen Apparat lokalisiert (Mandinova et al., 1998; Kato und Kimura, 1985; Haimoto und Kato, 1988). Da bereits auf evtl. fixierungsabhängige Lokalisationen von S00A1 hingewiesen wurde, lokalisierten wir S100A1 in neonatalen Kardiomyozyten in Anhängigkeit von zwei unterschiedlichen Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden (Methode [a] und Methode [b], Punkt II.3.1).

Abb.10 stellt deutlich die unterschiedliche Lokalisation von S100A1 in Abhängigkeit der Fixierungsmethoden dar. Bei einer Paraformaldehydfixierung (Methode [a]) ist S100A1 in neonatalen Kardiomyozyten zytoplasmatisch verteilt (Abb. 10A). Hingegen ist S100A1 nach einer Glutaraldehydfixierung (Methode [b]) am kontraktilen Apparat lokalisiert (Abb. 10B).

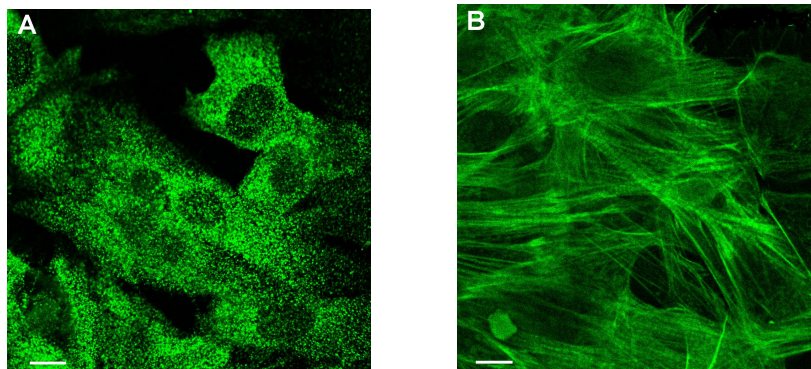


Abb. 10: Lokalisation von S100A1 in neonatalen Kardiomyozyten nach Zellpräparationsmethode I. A: S100A1 Lokalisation nach einer Paraformaldehydfixierung. B: S100A1 Lokalisation nach einer Glutaraldehydfixierung. Maßstab: 10 μm

III.2.2 Transfektionen von Kardiomyozyten mit einem pEGFP-S100A1-Konstrukt

Nachdem wir eine unterschiedliche Lokalisation von S100A1 in Abhängigkeit der Fixierungsmethoden festgestellt hatten, war es unser Ziel, S100A1 unter möglichst nativen Bedingungen zu lokalisieren. Aus diesem Grund transfizierten wir neonatale

Kardiomyozyten mit einem pEGFP-S100A1-Konstrukt, um somit die Lokalisation des überexprimierten pEGFP-S100A1-Fusionsprotein zu analysieren. Sowohl in Echt-Zeit Aufnahmen als auch nach einer Paraformaldehydfixierung zeigte sich ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster ohne Darstellung des kontraktiles Apparates. Aus technischen Gründen konnte keine Fixierung mit Glutaraldehyd an den transfizierten Zellen durchgeführt werden, da durch die anschließende Blockierung mit NaBH_4 ebenso die Fluoreszenz von GFP stark reduziert wurde. Die Echt-Zeit Aufnahme (Abb. 11) von transfizierten Kardiomyozyten spiegelt die S100A1 Lokalisation nach einer Paraformaldehydfixierung wieder, sodass wir uns in Hinsicht auf weitere Immunfluoreszenzuntersuchungen für die Paraformaldehydfixierung entschieden haben.

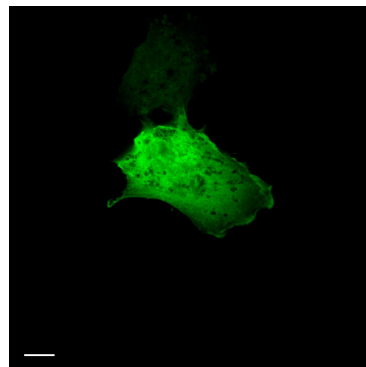


Abb. 11: Lokalisation von pEGFP-S100A1-Fusionsprotein in neonatalen Kardiomyozyten nach Zellpräparationsmethode I. Maßstab: 10 μm

III.2.3 S100A1 Lokalisation in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode

Nachdem die Fixierungsmethode (Paraformaldehyd) für Immunfluoreszenzmarkierungen festgelegt worden war, war es unser Ziel, die Verteilung von S100A1 in neonatalen Kardiomyozyten zu charakterisieren. Hierfür wurden Kardiomyozyten nach den drei oben beschriebenen Zellpräparationsmethoden isoliert. Die Zellen wurden am Tag sechs fixiert und mit einem anti-S100A1-Antikörper und dem zugehörigen Sekundärantikörper markiert. In der Abb. 12 ist gezeigt, dass S100A1 in Abhängigkeit von der Zellpräparationsmethode sehr unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen einnehmen kann.

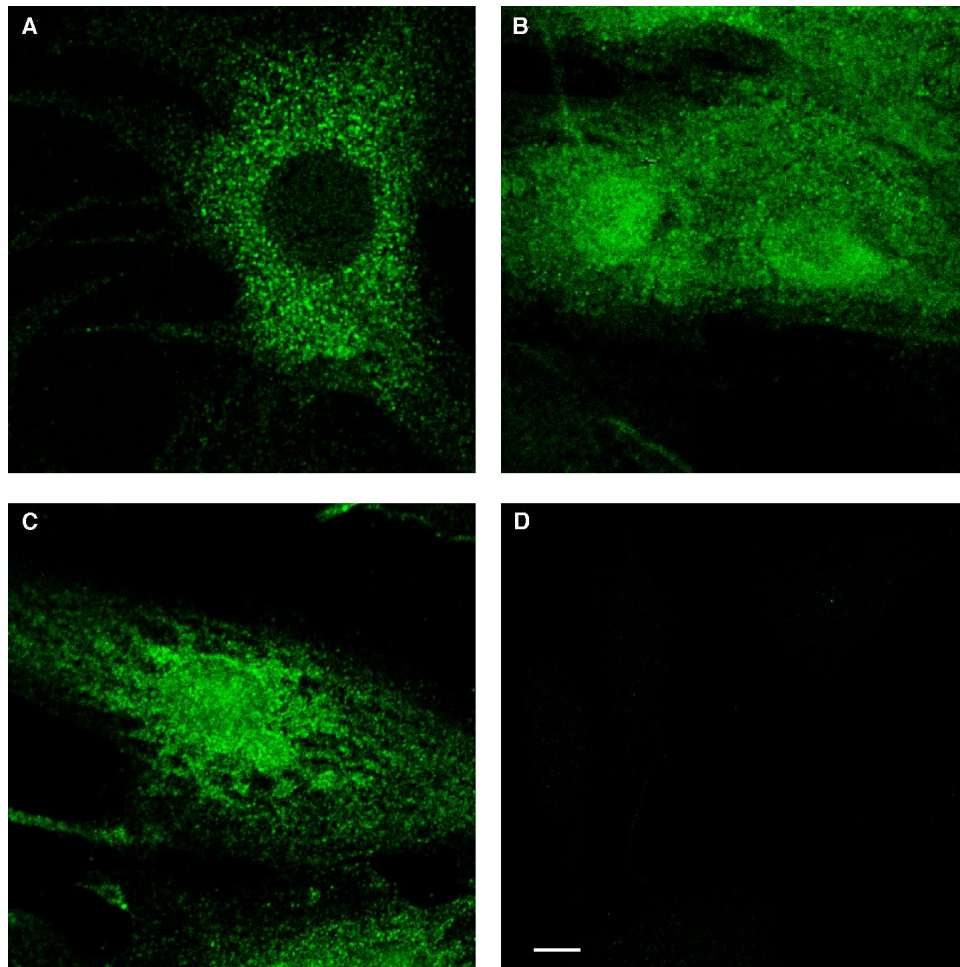


Abb. 12: S100A1 Markierung in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethoden. A: Markierung von S100A1 bei der Zellpräparationsmethode I mit dem Anti-S100A1-Antikörper. B: S100A1 Markierung bei der Zellpräparationsmethode II. C: S100A1 Markierung bei Zellpräparationsmethode III. D: Negativkontrolle, sekundärer Antikörper Kaninchen-anti-Maus-Alexa 488. Maßstab: 5 μm .

Bei der Zellpräparationsmethode I (Abb. 12A), d.h. bei einem Fibroblastenanteil von 55 %, ist S100A1 fein vesikulär im Zytoplasma der Kardiomyozyten lokalisiert. Auffällig ist, dass bei einem geringeren Fibroblastenanteil, S100A1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu detektieren ist (Abb. 12B und 12C). Bei der Zellpräparationsmethode II scheint S100A1 gleichermaßen im Zellkern und im Zytoplasma verteilt zu sein (Abb. 12B), wohingegen bei der Zellpräparationsmethode III (Kardiomyozytenanteil von 89 %) S100A1 intra- und perinukleär angereichert ist.

III.2.4 Sequentiell optische Schnitte der S100A1 Lokalisation in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode

Um die oben beschriebenen Aussagen zu bestätigen, wurden von den S100A1 markierten Zellen mit dem konfokalen Lasermikroskop sequentielle optische Schnitte aufgenommen (Abb. 13-15). Hier ist lediglich das oberste, das mittlere und das

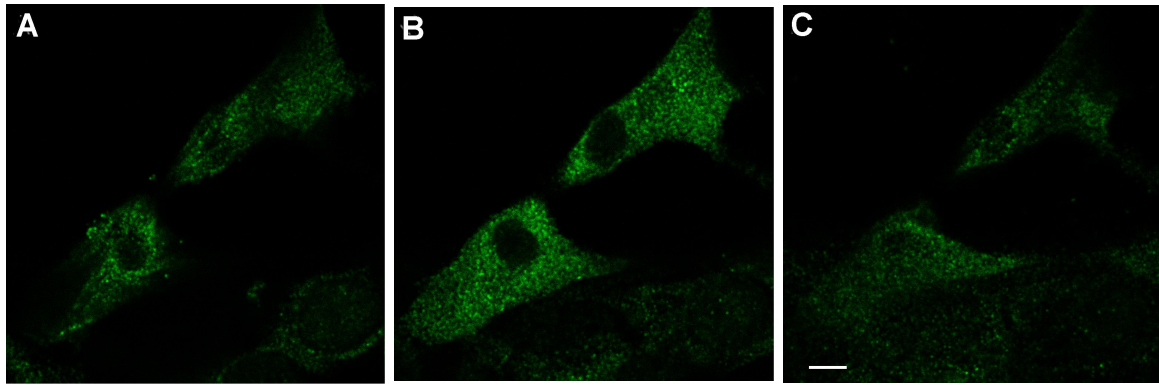


Abb. 13: Präparation der Zellen nach Zellpräparationsmethode I. Optische Schnitte wurden mit S100A1 markierten Zellen im Abstand von 0.2 µm sequentiell aufgenommen. Bild A stellt das erste Bild der aufgenommenen Sequenzreihe dar, Bild B das mittlere und Bild C das letzte Bild. Maßstab: 10 µm

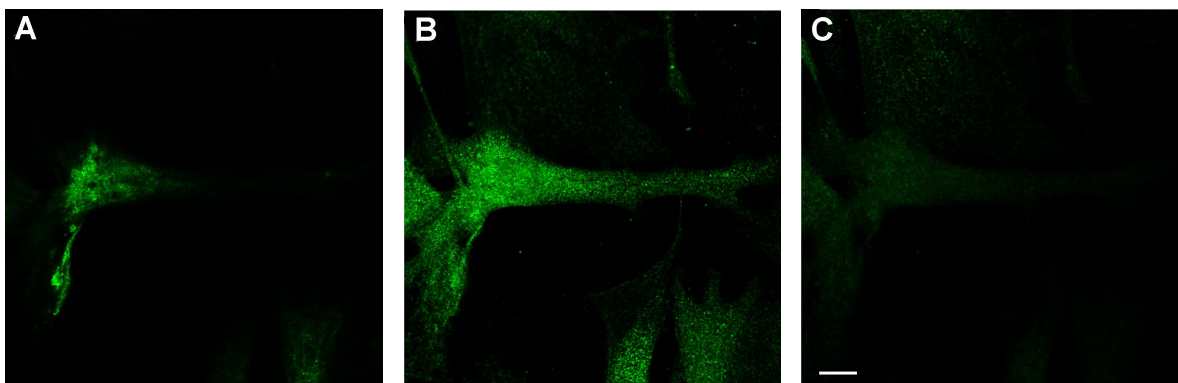


Abb. 14: Präparation der Zellen nach Zellpräparationsmethode II. Optische Schnitte wurden mit S100A1 markierten Zellen im Abstand von 0.2 µm sequentiell aufgenommen. Bild A stellt das erste Bild der aufgenommenen Sequenzreihe dar, Bild B das mittlere und Bild C das letzte Bild. Maßstab: 10 µm

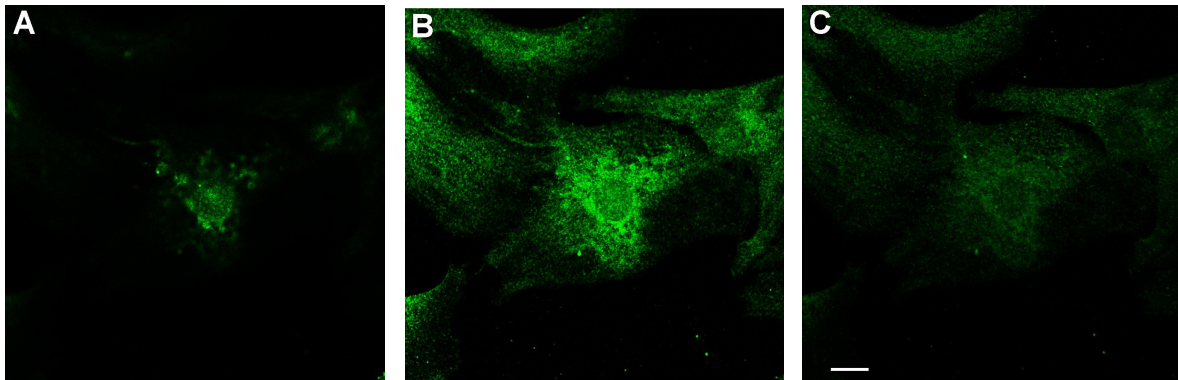


Abb.15: Präparation der Zellen nach Zellpräparationsmethode III. Optische Schnitte wurden mit S100A1 markierten Zellen im Abstand von 0.2 µm sequentiell aufgenommen. Bild A stellt das erste Bild der aufgenommenen Sequenzreihe dar, Bild B das mittlere und Bild C das letzte Bild. Maßstab: 10 µm

letzte Bild der sequentiell aufgenommenen Schnitte gezeigt. Diese Schnitte bestätigten die unterschiedliche Lokalisation von S100A1 in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode bzw. des Kardiomyozyten/Fibroblasten Verhältnisses. Ähnlich zur Abb. 12A verdeutlicht Abb. 13 (Zellpräparationsmethode I), dass hier S100A1 im Zytoplasma, nicht aber im Zellkern lokalisiert ist.

Aufgrund dieser Immunfluoreszenzdaten lässt sich die Hypothese aufstellen, dass S100A1 von bislang nicht näher definierten Faktoren, wie z. B. von Fibroblasten sezernierten Wachstumsfaktoren, auch in den Zellkern von Kardiomyozyten translozieren kann.

III.2.5 Kolokalisationsuntersuchungen von S100A1 und Aktin (Phalloidin) in neonatalen Kardiomyozyten

Zur weiteren Abklärung der fixierungsabhängigen Lokalisation von S100A1 am kontraktilen Apparat führten wir in Abhängigkeit der beiden Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden Doppelmarkierungen von S100A1 und Aktin (Phalloidin) durch.

In Abb. 16 wird die Doppelmarkierung von S100A1 und Aktin nach einer Paraformaldehydfixierung gezeigt. Bild 16B gibt die bereits bekannte Lokalisation von S100A1 in neonatalen Kardiomyozyten nach Zellpräparationsmethode II wieder. In Bild 16A wird Aktin durch eine Phalloidinmarkierung dargestellt, wobei man eine typische Querstreifung der Sarkomere erkennen kann und ebenso die sogenannten Aktin-Stress-Fiber sichtbar werden. In der Überlagerung dieser beiden Bilder kann man keine direkte Kolokalisation von S100A1 und Aktin erkennen (Abb. 16C).

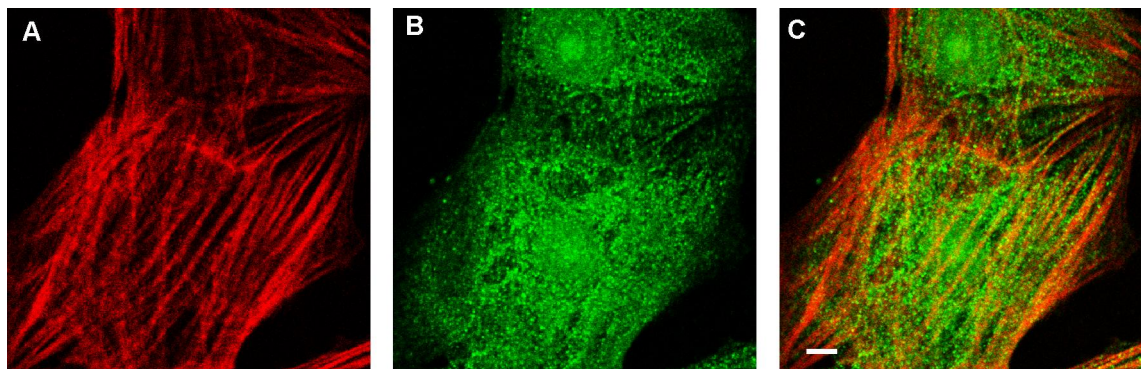


Abb.16: Doppelmarkierung von S100A1 und Phalloidin nach einer Paraformaldehydfixierung in neonatalen Kardiomyozyten nach Zellpräparationsmethode II. A: Darstellung von Aktin durch eine Phalloidinmarkierung. B: Darstellung von S100A1. C: Überlagerung von A und B. Maßstab: 5 μm .

Nach einer Glutaraldehydfixierung und anschließender Doppelmarkierung ist S100A1 (wie bereits in Abb. 10B gezeigt worden ist) am kontraktilen Apparat lokalisiert (Abb. 17A). Aktin weist hingegen die gleiche Lokalisation (Querstreifung, Aktin-Stress-Fibern) auf wie nach einer Paraformaldehydfixierung (Abb. 16A und 17B). Im Gegensatz zu den Paraformaldehyd-fixierten Kardiomyozyten kolokalisiert S100A1 mit Aktin bei der Überlagerung der beiden Bilder A und B (Abb. 17C).

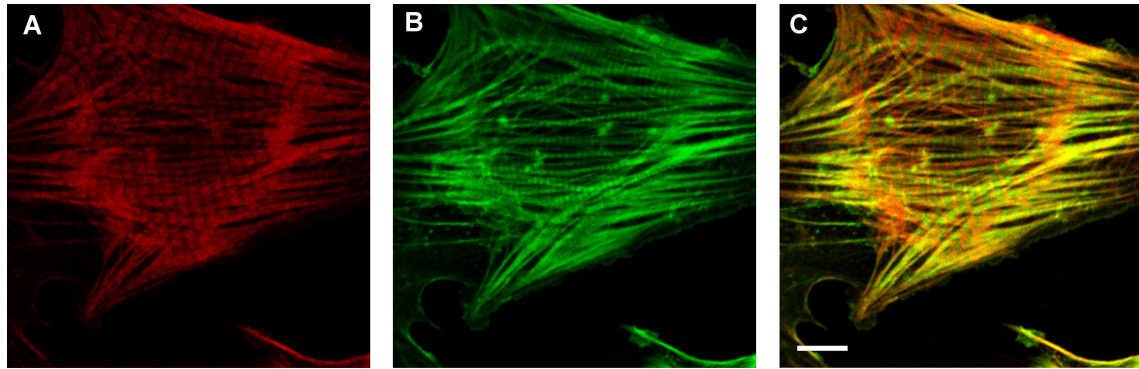


Abb.17: Doppelmarkierung von S100A1 und Phalloidin nach einer Glutaraldehydfixierung in neonatalen Kardiomyozyten nach Zellpräparationsmethode I. A: Darstellung von S100A1. B: Darstellung von Aktin durch eine Phalloidinmarkierung. C: Überlagerung von A und B . Maßstab: 5 μm .

Somit wird durch dieses Experiment zusätzlich bestätigt, dass sowohl die S100A1 Lokalisation als auch die Kolokalisation mit Aktin fixierungsabhängig ist.

III.3 Darstellung von zytoskelettalen und Ca^{2+} -regulierenden Proteinen in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode

III.3.1 Subzelluläre Lokalisation zytoskelettaler Proteine: α -Aktinin, Desmin und Tubulin

Es wurden für alle drei Zellpräparationsmethoden die subzelluläre Lokalisation der drei zytoskelettalen Proteine α -Aktinin, Desmin und Tubulin durch Immunfluoreszenzfärbungen untersucht.

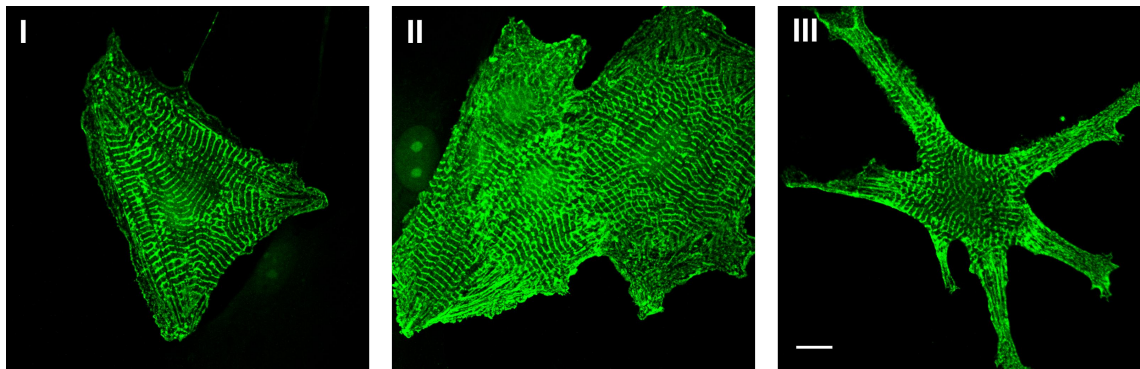


Abb. 18: Lokalisation von α -Aktinin bei Zellpräparationsmethode I, II und III. Maßstab: 10 μm .

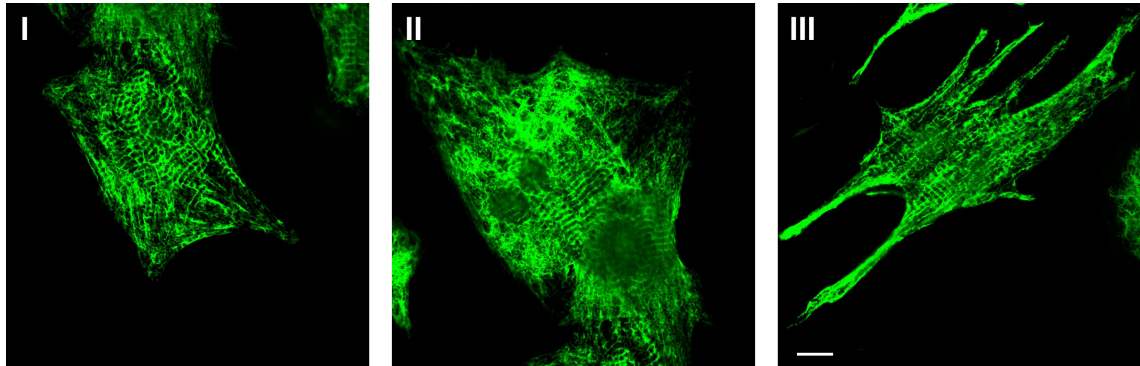


Abb. 19: Lokalisation von Desmin bei Zellpräparationsmethode I, II und III. Maßstab: 10 μm .

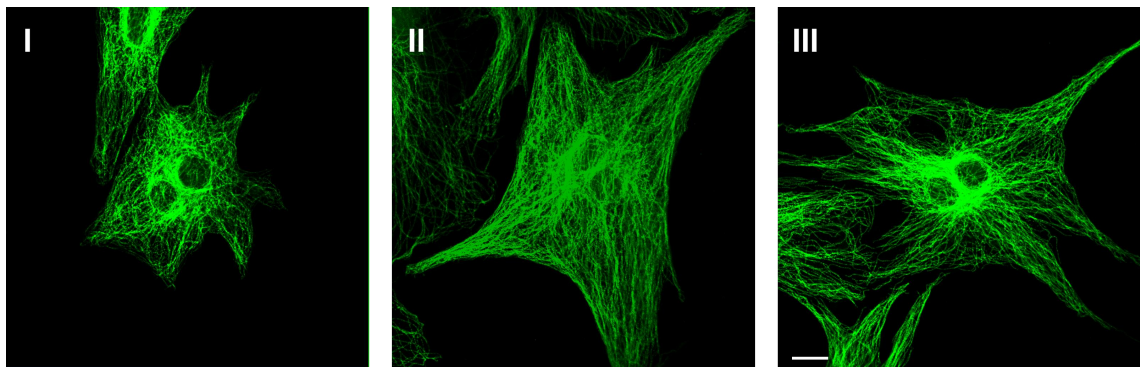


Abb. 20: Lokalisation von Mikrotubuli bei Zellpräparationsmethode I, II und III. Maßstab: 10 μm .

Wie die Abb. 18-20 erkennen lassen, haben die unterschiedlichen Zellpräparationsmethoden keinen optisch signifikanten Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation bzw. Verteilung von α -Aktinin, Desmin und Mikrotubuli.

III.3.2 Subzelluläre Lokalisation Ca^{2+} -regulierender Proteine: Ryanodin-Rezeptor und SERCA2a

Ebenso wurden die zwei Ca^{2+} -regulierenden Proteine Ryanodin-Rezeptor und SERCA2a (sarkoendoplasmatisches Retikulum-ATPase 2a) hinsichtlich ihrer Lokalisation in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethoden untersucht.

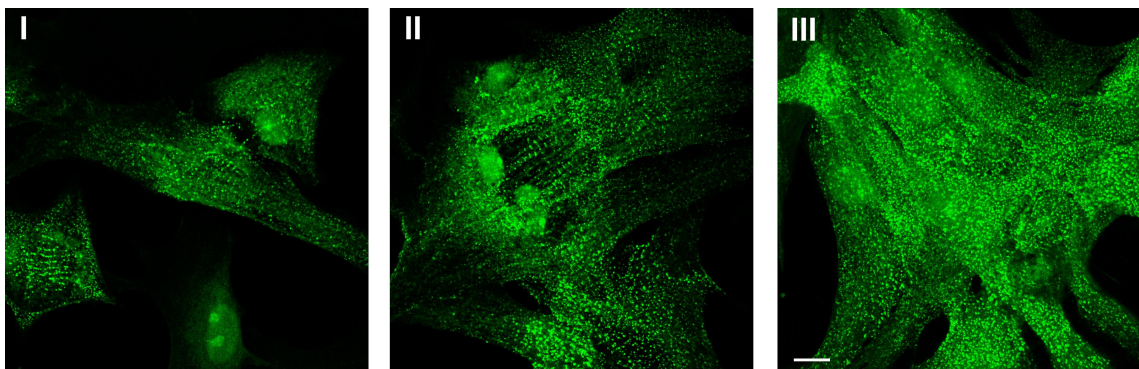


Abb. 21: Lokalisation vom Ryanodin-Rezeptor bei Zellpräparationsmethode I, II und III. Maßstab: 10 μm .

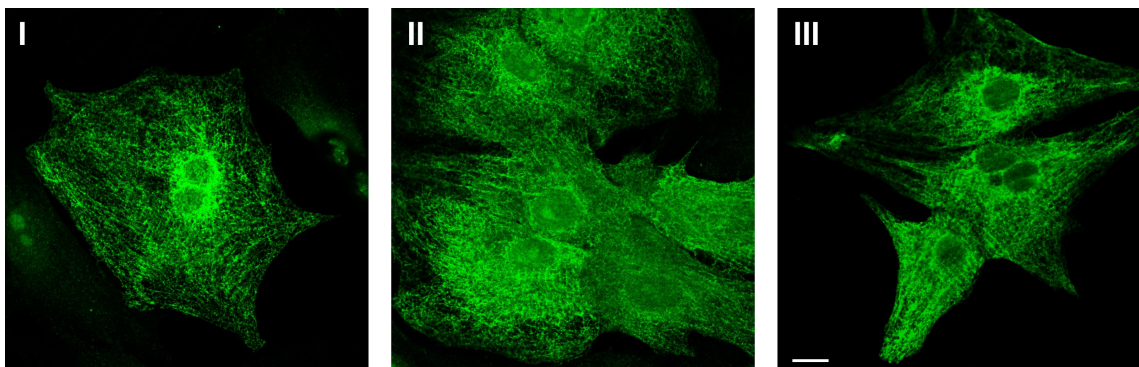


Abb. 22: Lokalisation von SERCA2a bei Zellpräparationsmethode I, II und III. Maßstab: 10 μm .

Auch hier konnte man keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Lokalisation vom Ryanodin-Rezeptor und SERCA2a in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethoden nachweisen.

III.4 Stimulation von Kardiomyozyten mit rekombinantem S100A1

III.4.1 Charakterisierung des aufgereinigten rekombinanten S100A1

Für Stimulationsexperimente mit exogenem S100A1 wurde rekombinantes humanes S100A1 in Bakterien exprimiert (Punkt II.4.1). Nach der biochemischen Aufreinigung des rekombinanten S100A1 wurde dessen Reinheit durch eine Silberfärbung (Abb. 23) sowie die spezifische Identifikation und Intaktheit des Proteins mittels Gelelektrophorese (Punkt II.4.3.1) und anschließend Westernblotting (Punkt II.4.3.2) überprüft. Dabei wurde der spezifische Anti-S100A1-Antikörper von Sigma (Deutschland) benutzt (Abb. 24). Die Abb. 23 (Silberfärbung) bestätigt den hohen Reinigungsgrad des gewonnenen Proteins, wobei die untere Bande der Verdünnungsreihe, in Höhe des 6.5 kD Proteinstandards, dem Proteinmonomer entsprach. Die obere Bande stellte keine Verunreinigung dar, sondern ließ sich dem verbleibenden Proteindimer zuordnen. Der in Abb. 24 dargestellte Western-Blot gibt die spezifische Identifikation des Proteins wieder. Die angefärbte Bande entspricht dem S100-Monomer in einer Höhe von ca. 6.5 kD, was auf eine intakte Größe des S100A1 hindeutet.

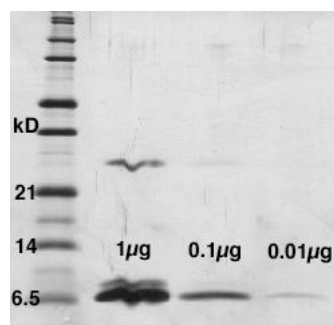


Abb. 23: Silberfärbung des aufgereinigten S100A1 Proteins in einer Verdünnungsreihe von 0.01-1 µg. Links ist der Proteinstandard mit der Größenordnung in kd dargestellt. Das Gel veranschaulicht den Reinheitsgrad des Proteins.

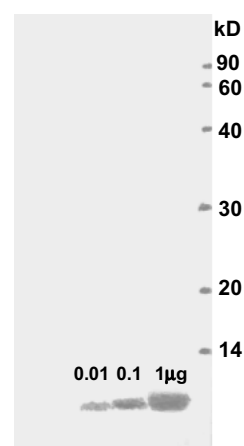


Abb. 24: Westernblot mit dem Anti-S100A1 Antikörper und dem sekundären biotinierten gekoppelten Antikörper Ziege-anti-Maus. Reihe 1-3 Verdünnungsreihe des rekombinanten S100A1 Proteins. Reihe 4: Proteinstandard mit der Größenordnung in kd.

III.4.2 Aufnahme und Charakterisierung des farbstoff-gekoppelten S100A1 in Kardiomyozyten

Zur Beantwortung der Frage, ob exogenes S100A1 von Zellen aufgenommen wird und wie es möglicherweise subzellulär verteilt wird, wurde rekombinant hergestelltes S100A1 mit dem Fluorochrom Alexa 568 gekoppelt (Punkt II.4.4) und den Zellkulturen zugegeben. Alle Stimulationsversuche mit farbstoff-gekoppeltem S100A1 wurden an Zellkulturen, die gemäß den drei unterschiedlichen Zellpräparationsmethoden angesetzt wurden, durchgeführt, wobei 2 Std. nach Zugabe von S100A1 fixiert wurde. In Abb. 25 kann man die Aufnahme des farbstoff-gekoppelten S100A1 in die Kardiomyozyten, gewonnen aus der Zellpräparationsmethode II, erkennen, die durch die zusätzliche Markierung mit α -Aktinin (Abb. 25B) identifiziert wurden. Die Überlagerung der Bilder A und B (Abb. 25C) bestätigt schließlich die Aufnahme von farbstoff-gekoppeltem S100A1 durch Kardiomyozyten.

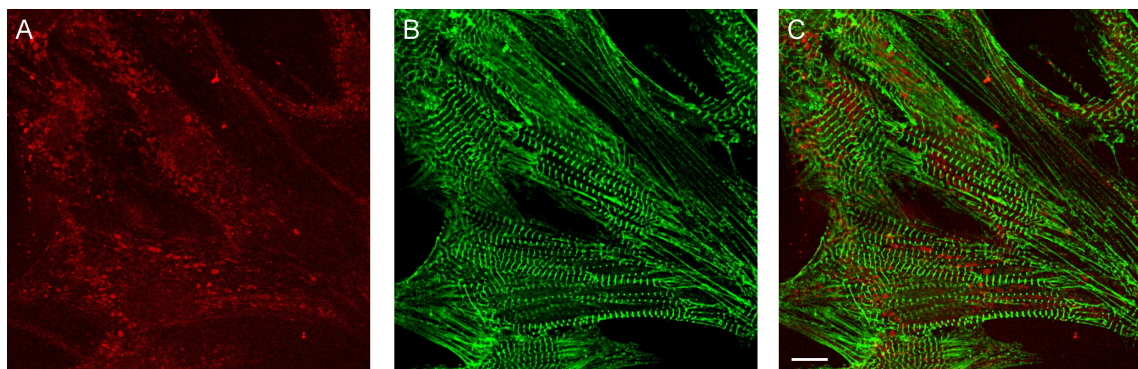


Abb. 25: 2 Stunden Stimulation mit 1 μ M Alexa 568-gekoppeltem S100A1 und Markierung von α -Aktinin. A: Aufnahme von Alexa 568-gekoppeltem S100A1. B: Darstellung von α -Aktinin. C: Überlagerung von A und B. Maßstab: 10 μ m.

Ebenso sind auch Kardiomyozyten, die mit der Zellpräparationsmethode I (Abb. 26A) und III (Abb. 26B) gewonnen wurden, in der Lage das farbstoff-gekoppelte S100A1 aufzunehmen.

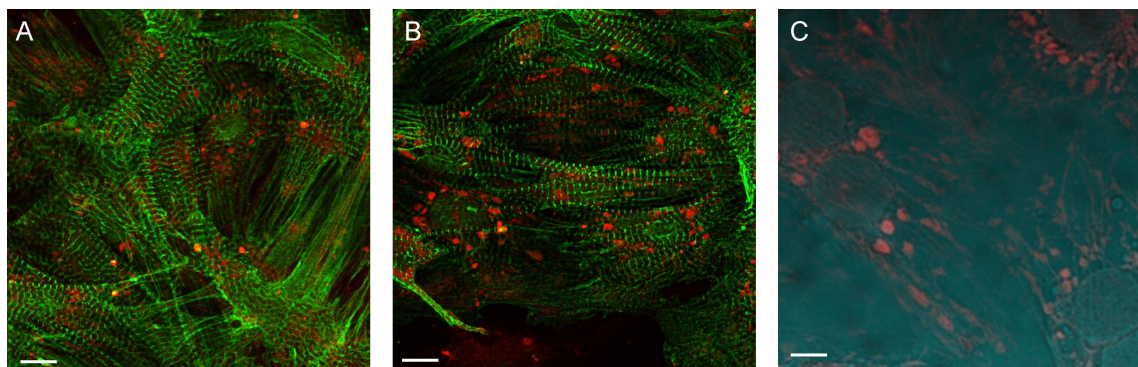


Abb. 26: 2 Std. Stimulation mit 1 μ M Alexa 568-gekoppeltem S100A1 und Markierung von α -Aktinin. A/B: Überlagerung der Bilder von der Aufnahme von S100A1 und der α -Aktinin Markierung, Maßstab: 10 μ m. A: Methode I und B: Methode III. C: Überlagerung der Bilder von der Aufnahme von S100A1 und des zugehörigen DIC (differentielle Interferenz-Kontrastaufnahme)-Bildes, Methode II, Maßstab: 5 μ m.

Wie Abb. 25 und 26 verdeutlichen, ist die Lokalisation des aufgenommenen S100A1 in den Kardiomyozyten bei allen drei Zellpräparationsmethoden ähnlich: zytoplasmatisch und perinukleär, d.h. um den Zellkern angereichert, in Vesikeln, die zum Teil auch größere Konglomerate ausbilden können.

Als Negativkontrolle wurde das ungekoppelte Fluorochrom unter den gleichen Bedingungen in allen 3 Zellpräparationsmethoden eingesetzt. In Abb. 27 erkennt man lediglich die mit α -Aktinin markierten Kardiomyozyten (Abb. 27B), das Fluorochrom alleine lässt sich im Bild A der Abb. 27 nicht darstellen. Gezeigt werden hier nur Kardiomyozyten aus der Zellpräparationsmethode II, da sich diesbezüglich keine Unterschiede für die verschiedenen Zellpräparationsmethoden zeigten.

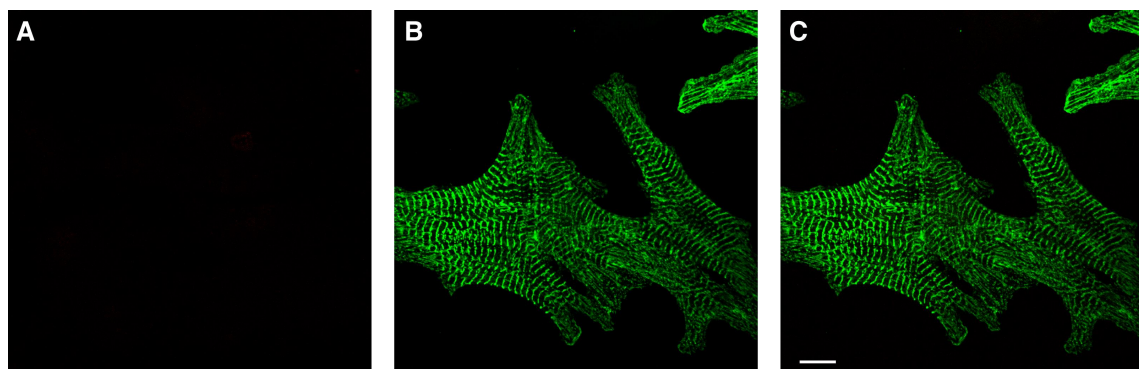


Abb. 27: 2 Stunden Stimulation mit 1 μ M Alexa 568 (Fluorochrom) und Markierung von α -Aktinin. A: Darstellung des Fluorochroms Alexa 568. B: Darstellung von α -Aktinin. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 10 μ m.

Nachdem die Aufnahme von farbstoff-gekoppeltem S100A1 in Kardiomyozyten unabhängig von der Zellpräparationsmethode gezeigt werden konnte, wurde die Aufnahme von S100A1 in Abhängigkeit der Zeit (5 und 120 Min.) analysiert. Abb. 28 bestätigt schon nach 5 Min. eine Aufnahme von farbstoff-gekoppeltem S100A1 in die Kardiomyozyten. Während die oben gezeigten Aufnahmen nach einer Inkubationsdauer des farbstoff-gekoppelten S100A1 von 120 Min. entsprechen (Abb. 25-26).

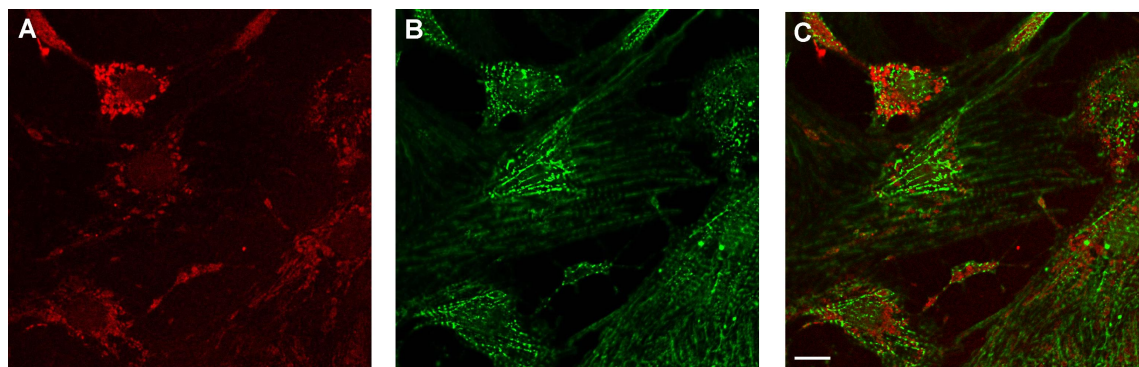


Abb. 28: 5 min Stimulation mit 1 μ M Alexa 568-gekoppeltem S100A1 und Markierung von α -Aktinin. A: Aufnahme von Alexa 568-gekoppeltem S100A1. B: Darstellung von α -Aktinin. C: Überlagerung von A und B. Maßstab: 10 μ m.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass einerseits der gekoppelte Farbstoff nach Aufnahme von S100A1 in die Zelle vom Protein abgespalten wird und andererseits der gekoppelte Farbstoff einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von S100A1 haben könnte, wurden die Zellen nach S100A1 Stimulation mit einem spezifischen Anti-S100A1-Antikörper markiert, der kreuzreaktiv ist auf die Isoformen von Mensch und Ratte. In Abb. 29-30 ist die Aufnahme von farbstoff-gekoppeltem S100A1 in Kardiomyozyten (Bild A) aus den 3 verschiedenen Zellpräparationsmethoden sowie die immunhistochemische Markierung des endogenen S100A1 (Bild B) dargestellt. In der Überlagerung der Bilder A und B kann man im Zytosol nur zum Teil bei allen drei Methoden eine Kolokalisation von farbstoff-gekoppeltem und endogenem S100A1 erkennen. Zudem wurde das farbstoff-gekoppelte S100A1 nicht in den Zellkern von Kardiomyozyten aus den Zellpräparationsmethoden II und III aufgenommen, wobei das endogene S100A1 unter diesen Bedingungen im Zellkern lokalisiert war (Abb. 30 und 31). Dies bestätigt auch die Aufnahme des DIC-Bildes (differentielle Interferenz-Kontrastaufnahme) von Abb. 26C. Hier kann man eine Aussparung des Zellkernes von farbstoff-gekoppeltem S100A1 erkennen. Möglicherweise befindet sich das aufgenommene (farbstoff-gekoppelte) S100A1 in einem anderen Kompartiment als das endogene S100A1.

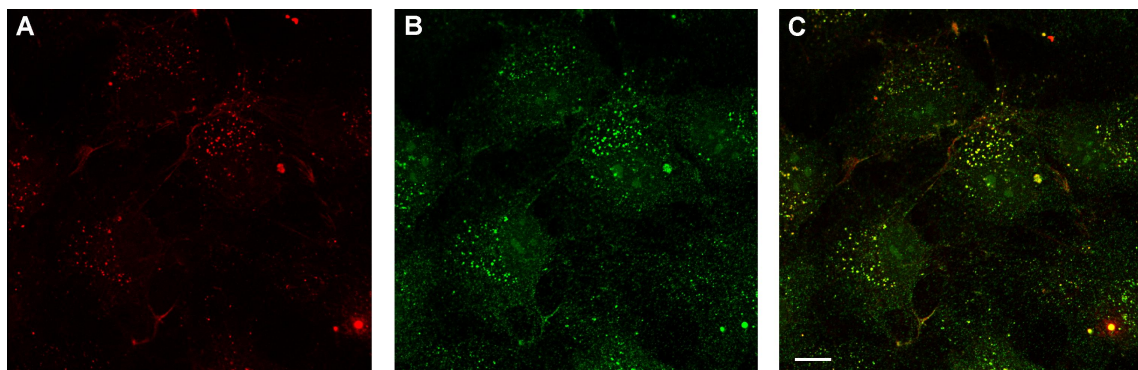


Abb. 29: 2 Stunden Stimulation mit 1 μM Alexa 568-gekoppeltem S100A1 und Markierung von S100A1 bei Zellpräparationsmethode I. A: Aufnahme von Alexa 568-gekoppeltem S100A1. B: Darstellung von endogenem S100A1. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 10 μm .

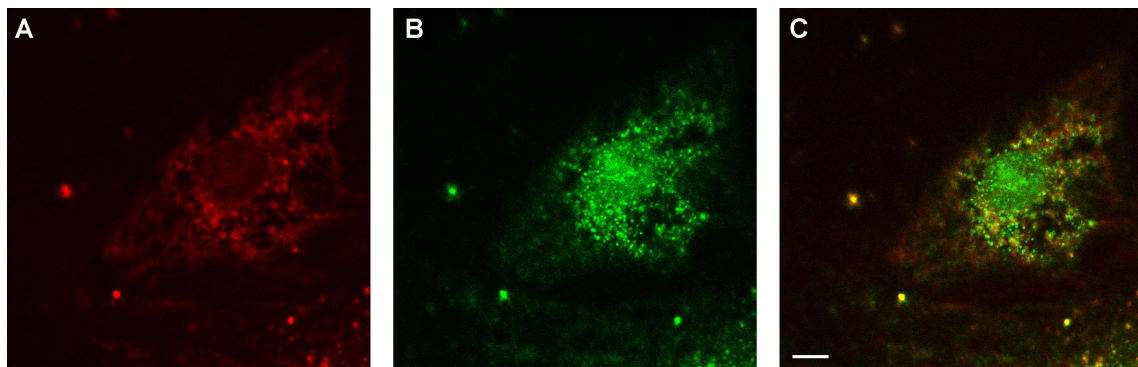


Abb. 30: 2 Stunden Stimulation mit 1 μM Alexa 568-gekoppeltem S100A1 und Markierung von S100A1 bei Zellpräparationsmethode II. A: Aufnahme von Alexa 568-gekoppeltem S100A1. B: Darstellung von endogenem S100A1. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 5 μm .

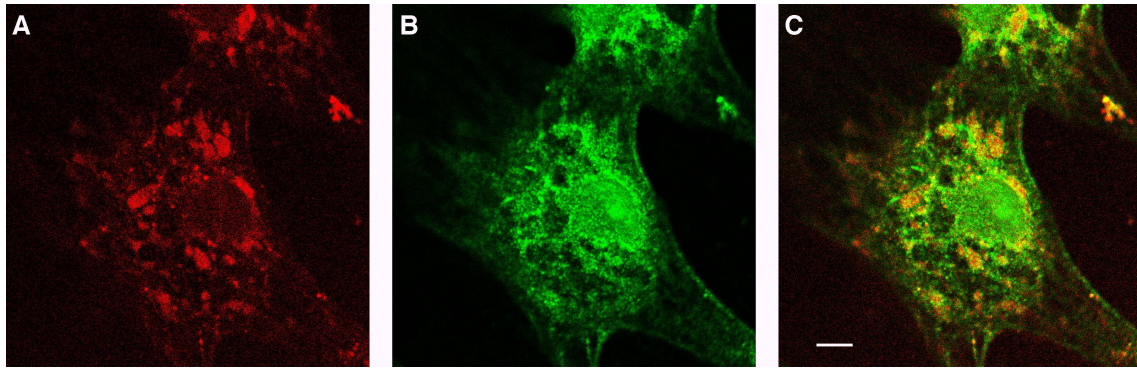


Abb. 31: 2 Stunden Stimulation mit 1 μM Alexa 568-gekoppeltem S100A1 und Markierung von S100A1 bei Zellpräparationsmethode III. A: Aufnahme von Alexa 568-gekoppeltem S100A1. B: Darstellung von S100A1. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 5 μm .

Zur weiteren Abklärung der Aufnahme von farbstoff-gekoppeltem S100A1 wurden die Zellen vor einer S100A1 Stimulation in Ca^{2+} -reichem oder Ca^{2+} -freiem (EGTA) Medium inkubiert. Wie aus Abb. 32 und 33 deutlich hervorgeht, ist die Aufnahme von farbstoff-gekoppeltem S100A1 Ca^{2+} -abhängig. Zellen, die in EGTA-haltigem Medium kultiviert wurden, waren nicht in der Lage, das farbstoff-gekoppelte S100A1 Protein aufzunehmen (Abb. 33).

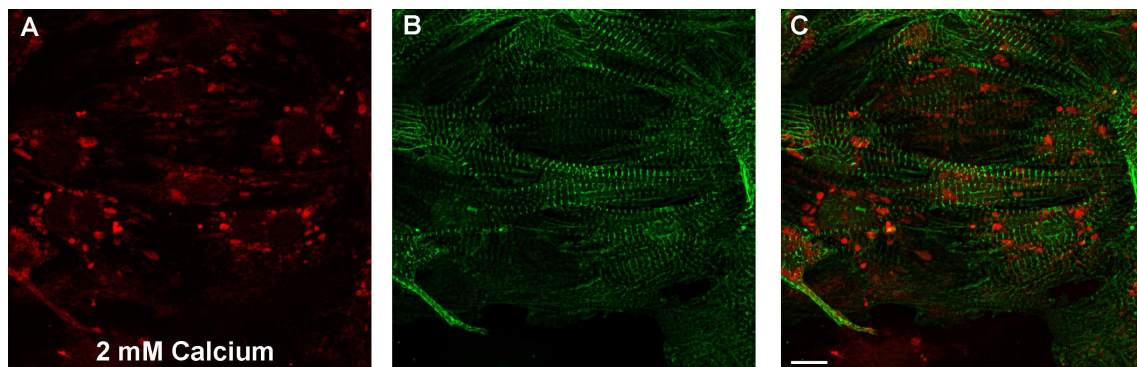


Abb. 32: 2 Stunden Stimulation mit 1 μM Alexa 568-gekoppeltem S100A1 in Ca^{2+} -haltigem Medium und anschließender Markierung von α -Aktinin bei Zellpräparationsmethode II. A: Aufnahme von Alexa 568-gekoppeltem S100A1. B: Darstellung von α -Aktinin. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 10 μm .

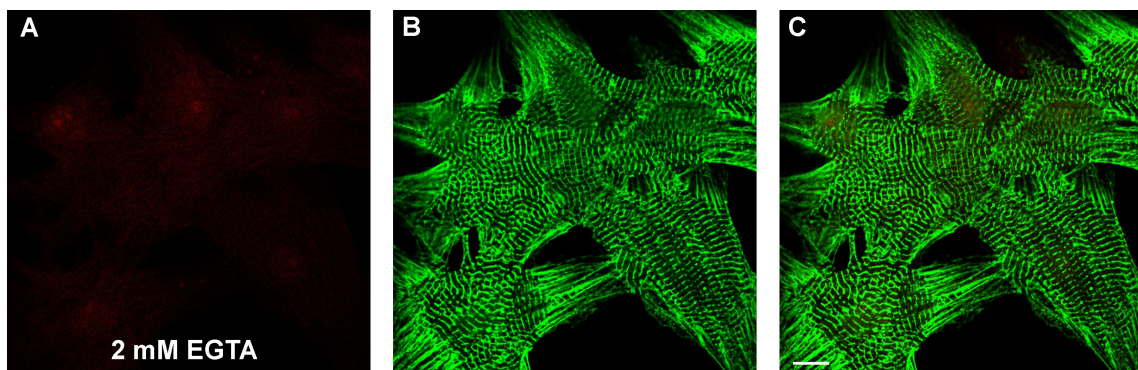


Abb. 33: 2 Stunden Stimulation mit 1 μM Alexa 568-gekoppeltem S100A1 in EGTA-haltigem Medium und anschließender Markierung von α -Aktinin bei Zellpräparationsmethode II. A: Aufnahme von Alexa 568-gekoppeltem S100A1. B: Darstellung von α -Aktinin. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 10 μm .

Um den Aufnahmemechanismus von farbstoff-gekoppeltem S100A1 näher zu analysieren, wurden die stimulierten Zellen mit einem Anti-Transferrin-Antikörper (Abb. 34B) und einem Caveolin-Antikörper (Abb. 35B) markiert. Beide Antikörper werden häufig zur Darstellung von endozytotischen Aufnahmemechanismen (Pelkmans et al., 2001) benutzt. Anhand dieser Antikörper lässt sich eine weitere Einteilung der Endozytose vornehmen: der Transferrin-Antikörper detektiert endozytotische Prozesse, die über „early endosomes“ ablaufen, während der Caveolin-Antikörper spezifisch die endozytotische Aufnahme über „Caveolae“ darstellt. Wie in der Abb. 34C gezeigt werden kann, stimmt das Färbungsmuster der aufgenommenen „S100A1-Vesikel“ mit Transferrin markierten Vesikeln überein. Hingegen zeigt sich für „S100A1-Vesikel“ und Caveolin keine spezifische Kolokalisation (Abb. 35C). Daher wird S100A1 über einen endozytotischen Mechanismus internalisiert, wobei dieser Prozess möglicherweise über einen „early endosomes-pathway“ stattfindet und nicht über einen „caveolae-pathway“.

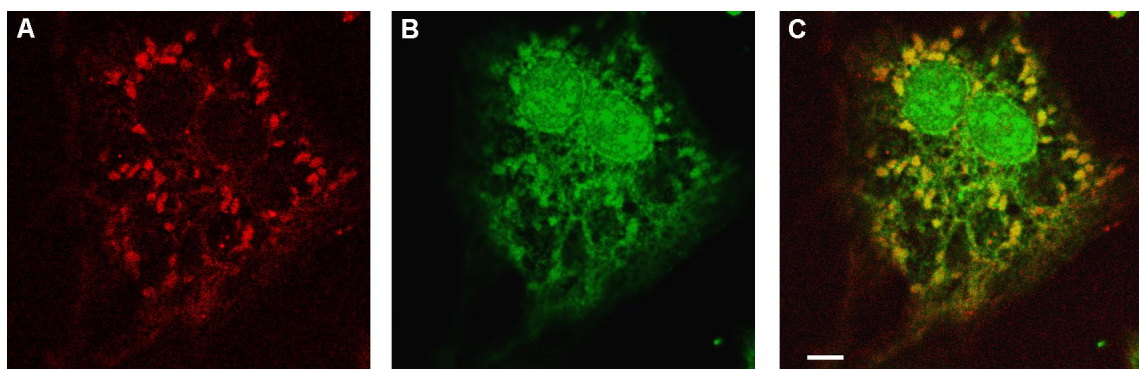


Abb. 34: 2 Stunden Stimulation mit 1 μ M Alexa 568-gekoppeltem S100A1 und Markierung von Transferrin bei Zellpräparationsmethode II. A: Aufnahme von Alexa 568-gekoppeltem S100A1. B: Darstellung von Transferrin. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 5 μ m.

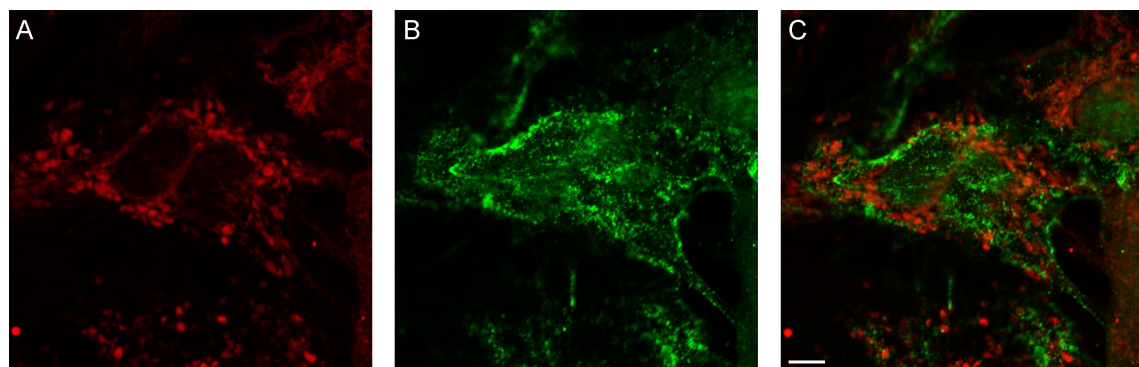


Abb. 35: 2 Stunden Stimulation mit 1 μ M Alexa 568-gekoppeltem S100A1 und Markierung von Caveolin bei Zellpräparationsmethode II. A: Aufnahme von Alexa 568-gekoppeltem S100A1. B: Darstellung von Caveolin. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 5 μ m.

Bei allen drei Zellpräparationsmethoden wurden die Stimulationsversuche mit farbstoff-gekoppeltem S100A1 durchgeführt. Da bei allen drei Methoden die Resultate hinsichtlich der Transferrin und Caveolin Markierung übereinstimmten, werden hier nur die Bilder von der Zellpräparationsmethode II gezeigt. Dasselbe gilt für die Negativkontrolle: die Zellen wurden nur mit ungekoppeltem Farbstoff (Fluorochrom) stimuliert, um anschließend auf die gleiche Art und Weise mit dem Anti-Transferrin-Antikörper (Abb. 36) bzw. Anti-Caveolin-Antikörper (Abb. 37) markiert zu werden. Erwartungsgemäß ließ sich das Fluorochrom alleine nicht darstellen (Abb. 36/37A).

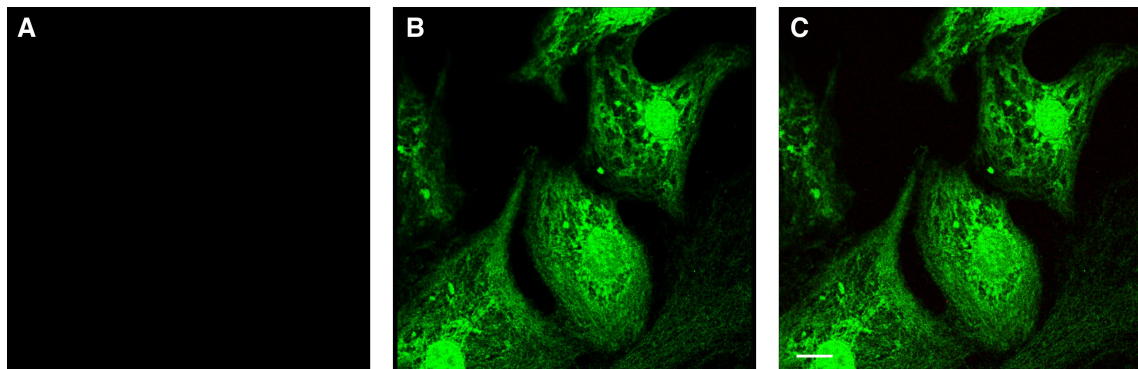


Abb. 36: 2 Stunden Stimulation mit 1 μ M Alexa 568 (Fluorochrom) und Markierung von Transferrin. A: Darstellung des Fluorochroms Alexa 568. B: Darstellung von Transferrin. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 10 μ m.

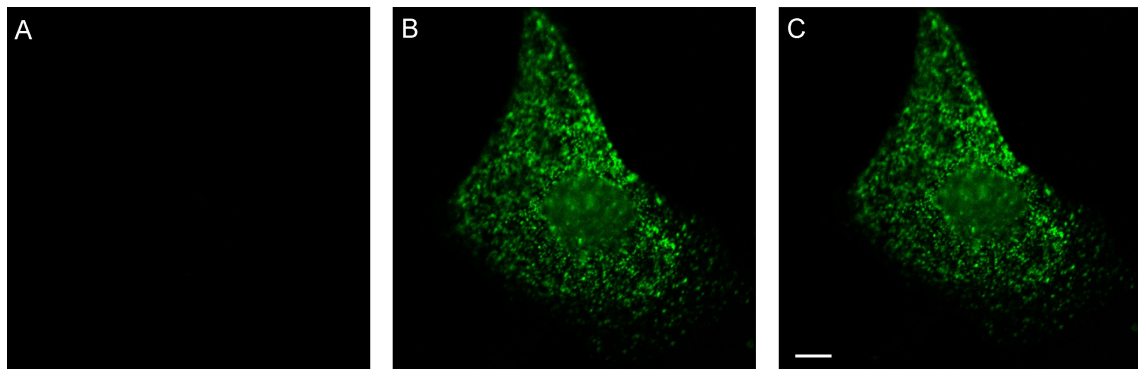


Abb. 37: 2 Stunden Stimulation mit 1 μ M Alexa 568 (Fluorochrom) und Markierung von Caveolin. A: Darstellung des Fluorochroms Alexa 568. B: Darstellung von Caveolin. C: Überlagerung von Bild A und B. Maßstab: 5 μ m.

III.5 Auswirkung der S100A1 Stimulation auf die Morphologie von Kardiomyozyten

III.5.1 Effekte der S100A1 Stimulation auf zytoskelettale Proteine

Um einen möglichen Effekt von S100A1 auf die subzelluläre Verteilung zytoskelettaler Proteine, wie α -Aktinin, Desmin und Tubulin, untersuchen zu können, wurden Stimulationsexperimente mit aufgereinigtem rekombinantem S100A1 durchgeführt (Punkt III.4.1).

Die Stimulationsdauer betrug sechs Tage, wobei 1 μ M rekombinantes S100A1 jeden zweiten Tag exogen zur Kultur hinzugefügt wurde (Punkt II.4.5). Am Tag sechs wurden die Zellen fixiert und mit Antikörper gegen die oben genannten drei zytoskelettalen Proteine markiert. Da sich die Ergebnisse innerhalb der drei Zellpräparationsmethoden nicht grundsätzlich unterscheiden, werden hier nur die Bilder von Zellen gezeigt, die nach der Zellpräparationsmethode II gewonnen wurden.

In der Abb. 38 ist die subzelluläre Lokalisation von α -Aktinin dargestellt. α -Aktinin ist an den Z-Streifen eines Sarkomers lokalisiert, sodass der regelmäßige Aufbau der Sarkomere wie in Abb. 38 sichtbar wird. Hierbei wird deutlich, dass hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von α -Aktinin kein relevanter Unterschied zwischen der S100A1 Stimulation (Abb. 38A) und der Kontrolle (Abb. 38B) besteht.

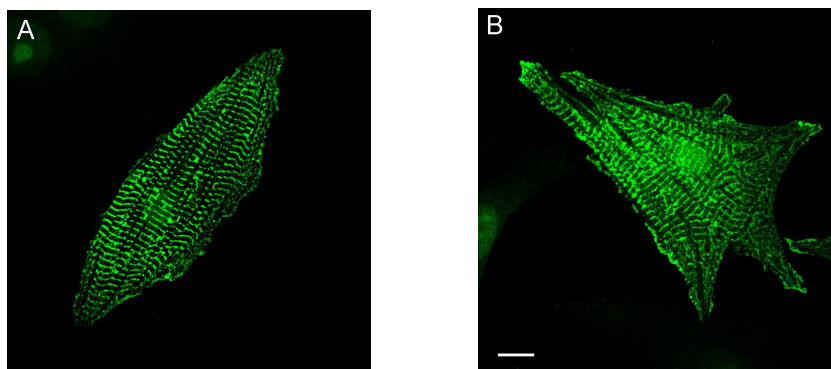


Abb. 38: Lokalisation von α -Aktinin unter 6 Tagen Stimulationsdauer mit 1 μ M rekombinantem S100A1 Protein bei der Zellpräparationsmethode II. A: S100A1 Stimulation. B: Kontrolle, ohne Zugaben von rekombinantem S100A1. Maßstab: 10 μ m.

In Abb. 39 wird das Intermediärfilament Desmin dargestellt. Die Desmin Lokalisation der S100A1 stimulierten Kardiomyozyten (Abb. 39A) entspricht derjenigen der Kontrollkultur bzw. unstimulierten Kardiomyozyten (Abb. 39B).

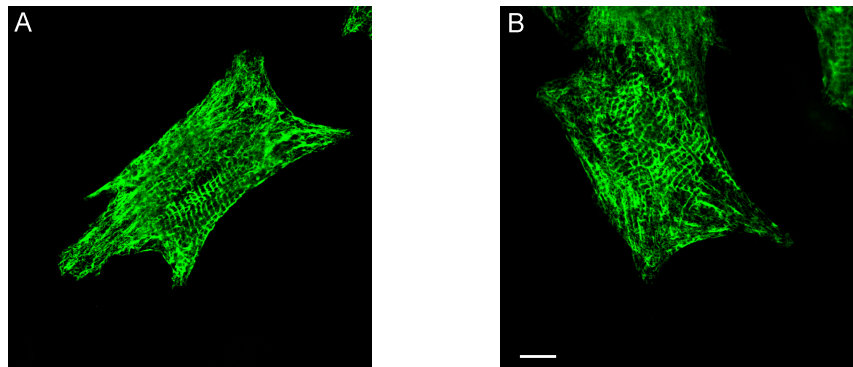


Abb. 39: Lokalisation von Desmin unter 6 Tagen Stimulationsdauer mit 1 µM rekombinantem S100A1 Protein bei der Zellpräparationsmethode II. A: S100A1 Stimulation. B: Kontrolle, ohne Zugaben von rekombinantem S100A1. Maßstab: 10µm.

Auch die Verteilung der Mikrotubuli (Abb. 40) lässt keinen signifikanten Unterschied zwischen stimulierten Zellen (Abb. 40A) und Kontrollzellen (Abb. 40B) erkennen, obwohl beschrieben ist, dass S100A1 die Polymerisation von Mikrotubuli in vitro inhibiert (Donato et al., 1985; Donato, 1988).

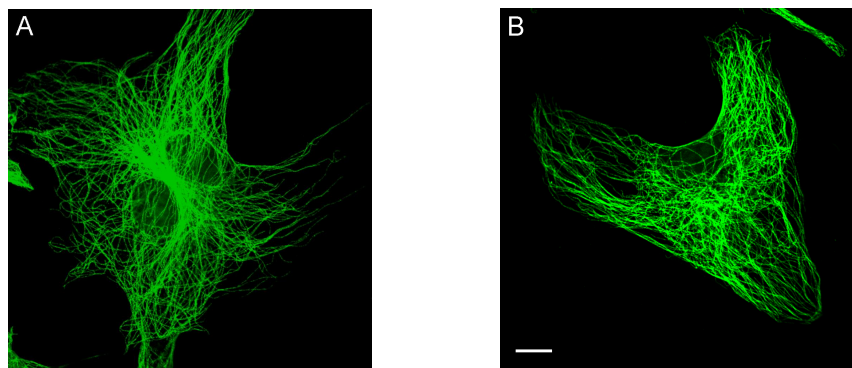


Abb. 40: Lokalisation von Mikrotubuli unter 6 Tagen Stimulationsdauer mit 1 µM rekombinantem S100A1 Protein bei der Zellpräparationsmethode II. A: S100A1 Stimulation. B: Kontrolle, ohne Zugaben von rekombinantem S100A1. Maßstab: 10µm.

III.5.2 Effekte der S100A1 Stimulation auf Ca²⁺-regulierende Proteine

Der Ryanodin-Rezeptor und die Ca²⁺-ATPase des sarkoendoplasmatischen Retikulums (SERCA) gehören in der Herzmuskelzelle zu den entscheidenden Ca²⁺-regulierenden Proteinen. Diese beiden Proteine regulieren die Ca²⁺-Aufnahme und Abgabe durch das sarkoplasmatische Reticulum (SR), wobei SERCA2a Ca²⁺ in das SR pumpt und der Ryanodin-Rezeptor Ca²⁺ vom SR in das Zytoplasma freisetzt. Somit wird Ca²⁺ entweder für die Kontraktion der Muskelzelle verfügbar, oder es wird

während der Erschlaffung wieder in das SR zurückgepumpt und dort gespeichert. Da ein Einfluss von S100A1 auf die Funktion des Ryanodin-Rezeptors (Treves et al., 1997) und der SERCA beschrieben wurde (Most et al., 2001), wurden die Effekte der S100A1 Stimulation (Punkt III.4.2) mit Hinsicht auf die subzelluläre Lokalisation der SERCA2a und des Ryanodin-Rezeptors in Kardiomyozytenkulturen untersucht. In Abb. 41 ist die Lokalisation von SERCA2a in Kardiomyozyten gezeigt, wobei das Bild A (Abb. 41) die Zellen nach S100A1 Stimulation zeigt und das Bild B (Abb. 41) unstimulierte Zellen (Kontrolle) darstellt. Ein Vergleich der zwei Bilder ergab keinen relevanten Unterschied hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von SERCA2a in S100A1 stimulierten und nicht stimulierten Zellen.

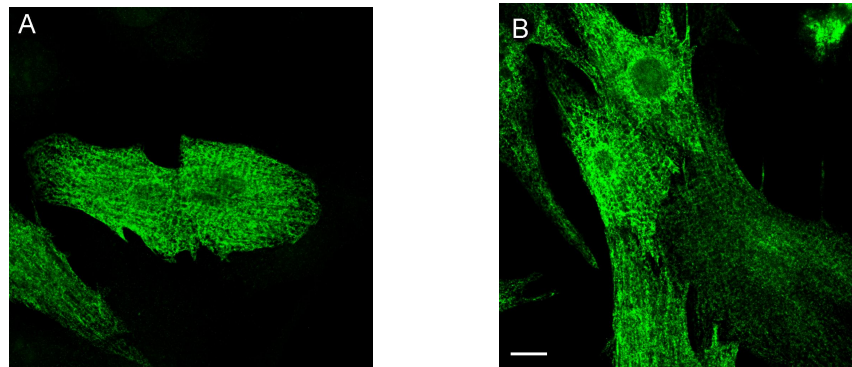


Abb. 41. Lokalisation von SERCA2a unter 6 Tagen Stimulationsdauer mit 1 μ M rekombinantem S100A1 Protein bei der Zellpräparationsmethode II. A: S100A1 Stimulation. B: Kontrolle, ohne Zugaben von rekombinantem S100A1. Maßstab: 10 μ m.

Ebensowenig konnte man bei der Lokalisation des Ryanodin-Rezeptors (Abb. 42) einen relevanten Unterschied zwischen S100A1 stimulierten Zellen und Kontrollzellen erkennen.

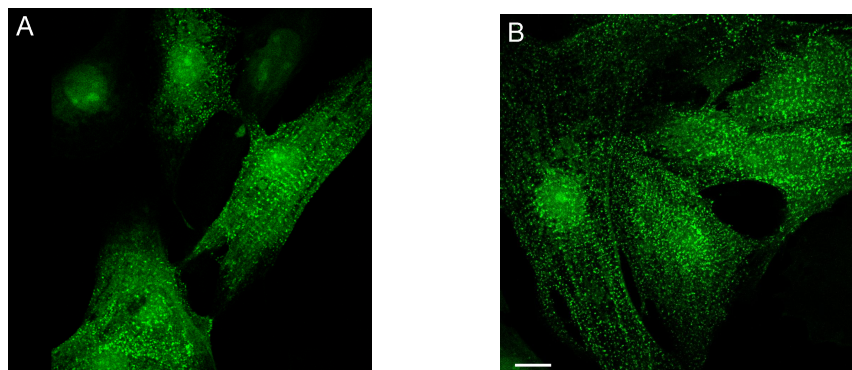


Abb. 42: Lokalisation des Ryanodin-Rezeptors unter 6 Tagen Stimulationsdauer mit 1 μ M rekombinantem S100A1 Protein bei der Zellpräparationsmethode II. A: S100A1 Stimulation. B: Kontrolle, ohne Zugaben von rekombinantem S100A1. Maßstab: 10 μ m.

III.5.3 Funktionelle Effekte in S100A1 stimulierten Kardiomyozyten

Nachdem die Zellen von allen drei Zellpräparationsmethoden für 6 Tage lang mit 1 μ M aufgereinigtem rekombinatem S100A1 Protein stimuliert worden waren (Punkt II.4.5), wurde am Tag sechs die Schlagfrequenz von spontan schlagenden Kardiomyozyten bestimmt (Punkt II.2.4). In Abb. 43 sind die Schlagfrequenzen unstimulierter Zellen als gelbe Balken und die von S100A1 stimulierten Zellen als rote Balken dargestellt. Hieraus geht deutlich hervor, dass die Schlagfrequenz in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethoden durch extrazelluläre Zugabe von S100A1 gesteigert werden kann. Bei der Zellpräparationsmethode I, die einen hohen Anteil an Fibroblasten und auch bereits eine hohe Schlagfrequenz aufwies, konnte keine weitere Frequenzsteigerung durch S100A1 Stimulation hervorgerufen werden. Bei Methode II, die mit einem signifikant niedrigeren Fibroblastenanteil korreliert, konnte eine erhöhte Schlagfrequenz durch S100A1 Stimulation induziert werden, die allerdings zur Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich war ($p=0.16$). Eine signifikante Steigerung ($p=0.02$) der Schlagfrequenz nach einer S100A1 Stimulation konnte nur bei der Zellpräparationsmethode III, d.h. bei einem Fibroblastenanteil von nur 10 %, festgestellt werden.

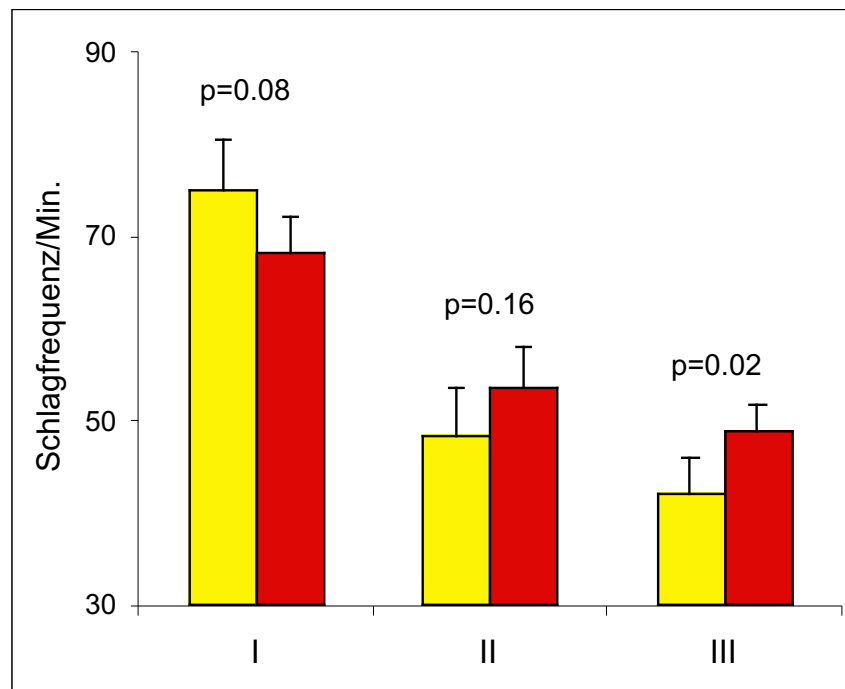


Abb. 43: Bestimmung der Schlagfrequenz nach 6 Tagen Stimulation mit 1 μ M rekombinantem S100A1 Protein in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethoden (Methode I-III). Gelbe Balken: Kontrolle, unstimulierte Zellen. Rote Balken: S100A1 Stimulation.

III.6 Auswirkung der S100A1 Stimulation auf Fibroblasten

III.6.1 Aufnahme des farbstoff-gekoppelten S100A1 in Fibroblasten

Da möglicherweise auch extrazellulär zugeführtes S100A1 in Fibroblasten aufgenommen wird und dort möglicherweise einen Einfluss auf die Sezernierung von Wachstumsfaktoren haben kann, wurde auch an reinen Fibroblastenkulturen eine S100A1 Stimulation durchgeführt. Die Fibroblastenkulturen wurden für 5 Min. bzw. 2 Std. mit farbstoff-gekoppeltem S100A1 stimuliert. Wie man in Abb. 44 erkennen kann, wird das farbstoff-gekoppelte S100A1 nach kurzer Inkubation (5 Min.) bereits in die Fibroblasten aufgenommen. Nach 5 Min. findet man das farbstoff-gekoppelte S100A1 zum Teil noch an der Zellmembran angereichert (Abb. 44A), während es nach 2 Std. in Vesikeln vor allem perinukleär im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 44B)

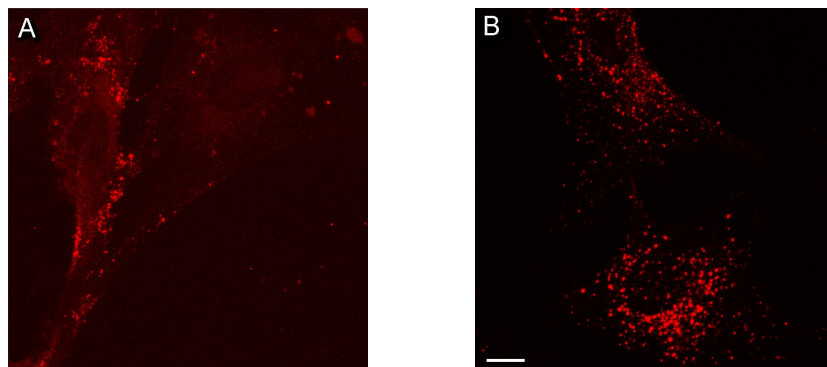


Abb. 44: Stimulation der Fibroblasten mit 1 μ M Alexa 568-gekoppeltem S100A1. A: 5 Minuten. B: 2 Stunden. Maßstab: 10 μ m.

III.6.2 Funktionelle Effekte in S100A1 stimulierten Fibroblasten

Da für andere S100 Proteine ein proliferativer Effekt beschrieben wurde, sollte auch der Einfluss von S100A1 auf das Wachstumsverhalten von Fibroblasten untersucht werden. Hierfür wurden Fibroblastenkulturen fünf Tage lang mit 1 μ M rekombinantem S100A1 stimuliert und jeweils nach 24 Std. die Zellzahl der Fibroblasten bestimmt. Als Kontrollexperiment wurden die Fibroblastenkulturen lediglich mit PBS-Puffer stimuliert. Da die Fibroblasten unter ähnlichen Bedingungen wie die Kardiomyozyten kultiviert werden sollten, wurden die Fibroblasten zum einen in Zellmedium (DMEM) mit 10 % FCS und zum anderen mit einem BrdU Zusatz kultiviert. Um hinsichtlich der Zelldichte vergleichbare Verhältnisse zu wahren, wurden für alle vier Gruppen jeweils unter den gleichen Bedingungen 100.000 ausgezählte Fibroblasten in kleine Kulturschälchen verteilt, wobei die Gruppe mit BrdU-Behandlung nach 1 Std. zusätzlich 0.1 mM BrdU direkt ins Medium erhielt.

Wie aus Abb. 45 deutlich hervorgeht, kann die Zellzahl bei den BrdU-behandelten Fibroblasten durch die exogene S100A1 Stimulation signifikant nach bereits 72 Std. gesteigert werden (hellblaue Linie, $p < 0.05$). Bei den nicht BrdU-behandelten Fibroblasten konnte keine signifikante Steigerung der Zellzahl durch S100A1 Stimulation festgestellt werden.

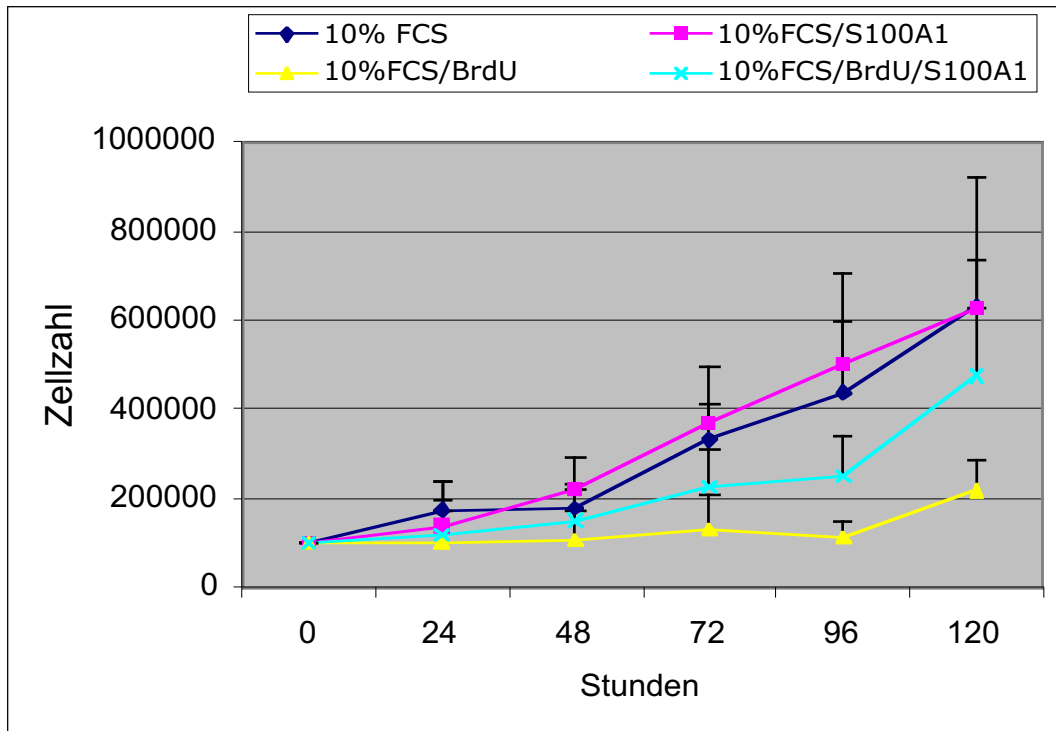


Abb. 45: Stimulation der Fibroblasten mit 1 μ M rekombinantem S100A1 mit und ohne BrdU-Behandlung (+/- BrdU). Die Zellzahl wurde immer nach 24 Std. mittels der Naubauer Zählkammer bestimmt.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals untersucht werden, welche extrazellulären bzw. exogenen Effekte S100A1 auf die Morphologie und Funktion von Kardiomyozyten hat. Um dies anhand eines Modelles kultivierter Kardiomyozyten definiert durchführen zu können, mussten zunächst die basalen Zellkulturbedingungen genau untersucht und die subzelluläre Lokalisation von endogenem S100A1 dokumentiert werden, um dann in einem zweiten Schritt die Effekte von extrazellulär appliziertem S100A1 untersuchen zu können.

IV.1. Charakterisierung der basalen Zellkulturbedingungen

Bei jeder Zellpräparation neonataler Kardiomyozyten kommt es zu einer signifikanten Kontamination durch Fibroblasten. Aus diesem Grund wählten wir drei definierte Zellkulturbedingungen, in denen (bei einer guten Reproduzierbarkeit) das Verhältnis von Kardiomyozyten zu Fibroblasten variiert wurde. In Bezug auf funktionelle Analysen von Kardiomyozyten ist der Fibroblastenanteil von großer Bedeutung, da Fibroblasten Wachstumsfaktoren sezernieren, die sich auf die Funktion und Entwicklung von Kardiomyozyten auswirken (Ruwhof et al., 2000; Ruwhof et al., 2001; Bick et al., 1998; Nishida et al., 2003). Im Modell des „*cardiac tissue engineering*“ wurde gezeigt, dass eine Kokultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten zu einem früheren Zeitpunkt geordnete Zellkontraktionen und eine ausgeprägte kardiale Zelldifferenzierung aufwiesen als eine relativ reine Kardiomyozytenkultur (van Luyn et al., 2002). Hieraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass von Fibroblasten sezernierte Faktoren für die Aktivierung der Kardiomyozyten von Bedeutung sind.

Aufgrund der oben genannten Studien, die signifikante Effekte von Fibroblasten auf Kardiomyozyten nachwiesen, charakterisierten wir in unserer Studie drei unterschiedliche Zellpräparationsmethoden, die sich durch ein unterschiedliches Verhältnis von Kardiomyozyten zu Fibroblasten auszeichneten und so Analysen zu extrazellulären Effekten von S100A1 unter definierten Bedingungen erlaubten.

Zellen der drei Zellkulturmethoden wurden alle am Tag sechs hinsichtlich der spontanen Schlagfrequenz der Kardiomyozyten und des Verhältnisses Kardiomyozyten versus Fibroblasten untersucht. Der Tag sechs wurde deshalb als zeitlicher Endpunkt gewählt, da sich nach morphologischen Analysen zu diesem Zeitpunkt ein Monolayer differenzierter Kardiomyozyten mit synchronem Kontraktionsverhalten gebildet hatte. Die drei unterschiedlichen Zellkulturbedingungen wiesen am Tag sechs sowohl Unterschiede in Hinblick auf das Verhältnis von Kardiomyozyten

zu Fibroblasten als auch auf die Untersuchung der spontanen Schlagfrequenz auf. Die Reduktion der Fibroblastenanzahl ging mit einer Abnahme der spontanen Schlagfrequenz der Kardiomyozyten einher. So hatten Kardiomyozyten der Zellpräparationsmethode I, die sich durch einen Fibroblastenanteil von 55 % auszeichneten, eine Schlagfrequenz von ca. 95/Min., wobei die Kardiomyozyten der Zellpräparationsmethode III bei einem Fibroblastenanteil von 11 % eine signifikante Reduktion der Schlagfrequenz auf ca. 65/Min. zeigten. Hieraus kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass die Fibroblastenanzahl auch in unserem Modell die Schlagfrequenz von Kardiomyozyten beeinflusst. Dieses Ergebnis muss also bei der Interpretation der S100A1 Stimulationsversuche berücksichtigt werden.

IV.2 Die Lokalisation von endogenem S100A1 in Kardiomyozyten ist abhängig von der Zellkulturmethode und der Fixierungsmethode

In der Vergangenheit wurde S100A1 mittels Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie (EM) im Herz- und Skelettmuskel unterschiedlich lokalisiert. So zeigten elektronenmikroskopische Daten von Haimoto und Kato die Lokalisation von S100A1 an subzellulären Strukturen des Sarkolemms, des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), des Zellkernes und des kontraktilen Apparates (Kato und Kimura, 1985; Haimoto und Kato, 1988). Ebenso zeigte Maco in EM Aufnahmen eine Lokalisation von S100A1 im Zytoplasma und am kontraktilen Apparat humaner Herzbiopsien (Maco et al., 2001; Maco et al., 2000). Donato et al. konnten in ihren Lokalisationsstudien zeigen, dass S100A1 an den Membranen des Sarkolemms, des SR, der Mitochondrien und der transversalen Tubuli, nicht aber am kontraktilen Apparat lokalisiert ist (Donato et al., 1989; Sorci et al., 1999; Arcuri et al., 2002). Aufgrund dieser widersprüchlichen Daten war es daher unser Ziel, S100A1 in neonatalen Kardiomyozyten unter definierten Bedingungen zu lokalisieren. Zum einen wurde die S100A1 Lokalisation in Abhängigkeit der Fixierungsmethode analysiert und zum anderen wurde untersucht, welchen Einfluss der Fibroblastenanteil auf die S100A1 Lokalisation hat.

IV.2.1 Die Lokalisation von endogenem S100A1 in Kardiomyozyten ist abhängig von der Fixierungsmethode

Da in den oben genannten Lokalisationsstudien unterschiedliche Fixierungsmethoden angewendet wurden, untersuchten wir die Lokalisation von S100A1 in Kardiomyozyten in Abhängigkeit von zwei häufig verwendeten Fixierungs- bzw. Permeabilisierungsmethoden. Zunächst wurde die Lokalisation von S100A1 nach

einer Paraformaldehydfixierung mit anschließender TritonX-100-Permeabilisierung bestimmt. Bei dieser Fixierung/Permeabilisierung war S100A1 fein vesikulär im Zytoplasma verteilt (Abb. 10A). Im Gegensatz hierzu wurde S100A1 in Zellen, die mit Octyl-Poe permeabilisiert und anschließend mit Glutaraldehyd fixiert wurden, am kontraktilem Apparat (Darstellung der typischen Querstreifung von Kardiomyozyten) lokalisiert (Abb. 10B). Diese unterschiedlichen Ergebnisse wurden durch Doppelfärbungen von S100A1 und Aktin (Phalloidin) bestätigt. Bei der Paraformaldehydfixierung konnte keine spezifische Kolo-kalisation zwischen dem Myofilament Aktin und S100A1 festgestellt werden (Abb. 16), hingegen konnte S100A1 nach einer Glutaraldehydfixierung mit Aktin kolo-kalisiert werden (Abb. 17). So wird deutlich, dass die Lokalisation von S100A1 stark von der Fixierungs- und Permeabilisierungsmethode abhängig ist. Um S100A1 unter möglichst nativen Bedingungen lokalisieren zu können, wurden Zellen mit einem pEGFP-S100A1-Konstrukt transfiziert, um dadurch so die Lokalisation des überexprimierten pEGFP-S100A1-Fusionsproteins zu analysieren. In Echt-Zeit Aufnahmen und nach Paraformaldehydfixierung zeigte sich ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster des pEGFP-S100A1-Fusionsproteins ohne Darstellung von Aktin-Stressfibern (Abb. 11). Eine Abhängigkeit der S100A1 Lokalisation von der Fixierungsart wurde bereits von Donato postuliert (Donato et al., 1989). Donato et al. konnten an elektronenmikroskopischen Aufnahmen von adulten Rattenherzen zeigen, dass S100A1 im Sarkoplasma (Zytoplasma der Muskelzelle), am Sarkolemm und an den Membranen der Mitochondrien, des SR und der transversalen Tubuli verteilt war. Im Gegensatz hierzu hatten Haimoto und Kato S100A1 mittels Immuno-EM zytoplasmatisch und zum Teil schwach am kontraktilem Apparat lokalisiert (Kato und Kimura, 1985; Haimoto und Kato, 1988). Für beide Studien (Donato und Haimoto) wurden unterschiedliche Fixierungsmethoden verwendet. Aufgrund der Diskrepanz zu den Daten von Haimoto und Kato stellte Donato die These auf, dass während der Fixierungsprozedur des Gewebes zytoplasmatisches S100A1 an die Myofilamente diffundiert und somit dort detektiert werden kann. Die Lokalisationsdaten von Donato wurden erneut von Sorci und Arcuri (Sorci et al., 1999; Arcuri et al., 2002) bestätigt, auch sie konnten keine Lokalisation von S100A1 an den Myofilamenten nachweisen. Lediglich Maco und Mandinova zeigten in neueren Arbeiten (Maco et al., 2000, Maco et al., 2001, Mandinova et al., 1998) eine zusätzliche Lokalisation von S100A1 an Myofilamenten bzw. an Aktin. Allerdings wurden die Proben bei Maco et al. mit derselben Fixierungsprozedur wie bei Haimoto und Kato behandelt, während Mandinova et al.

Glutaraldehyd als Fixierungsmittel verwendeten.

Aufgrund der mit dem pEGFP-S100A1-Fusionsprotein zusätzlich gewonnenen Daten, scheinen mildere Fixierungsbedingungen wie Paraformaldehyd geeigneter zu sein, die subzelluläre Lokalisation von S100A1 zu beschreiben, während stärkere Fixative wie Glutaraldehyd möglicherweise zu einer artefiziellen Koloalisation mit Aktin führt. Weiterführende immunhistochemische Studien zu Ca^{2+} -bindenden Proteinen der S100 Familie sollten daher unter mildereren Fixierungsbedingungen erfolgen.

IV.2.2 Die Lokalisation von endogenem S100A1 in Kardiomyozyten ist abhängig von der Zellkulturmethode

Nach Festlegung der definierten Zellkulturbedingungen und der Fixierungsmethode wurde S100A1 am Tag sechs mittels Immunfluoreszenz in neonatalen Kardiomyozyten lokalisiert. Hierbei konnten wir in Abhängigkeit der Zellpräparationsmethode eine Translokation von S100A1 feststellen. Bei einem Fibroblastenanteil von 55 % war S100A1 fein vesikulär im Zytoplasma verteilt (Zellpräparationsmethode I). Unter kontinuierlicher Reduktion der Fibroblastenanzahl veränderte sich das Verteilungsmuster von S100A1. Bei der Zellpräparationsmethode II, d.h. bei einem Fibroblastenanteil von 35 %, konnte S100A1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert werden. Bei einem Fibroblastenanteil von lediglich 11 % (Zellpräparationsmethode III) wies S100A1 hingegen ein perinukleäres und intranukleäres Verteilungsmuster auf.

Eine Translokation anderer S100 Proteine wie S100A13 und S100A6 in den Zellkern konnte unter Stressbedingungen bereits gezeigt werden (Hsieh et al., 2002). Mit dieser Studie gelang es erstmals, auch eine Translokation von S100A1 in Zellkerne neonataler Kardiomyozyten nachzuweisen. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da S100A1 keine klassische Kernerkennungssequenz enthält. Weitere Studien müssen nun zeigen, inwiefern S100A1 möglicherweise einen neuen kardialen Transkriptionsfaktor darstellt.

Da Kardiomyozyten der Zellpräparationsmethode III aufgrund des verminderten Fibroblastenanteils größerem Stress ausgesetzt sind als Zellen der Zellpräparation I, könnte die Aktivierung eines „Rescue Pathway“ ein Grund für die Translokation von S100A1 in den Zellkern sein. Hier könnte S100A1 evtl. die Zellen vor Apoptose schützen. Unterstützt wird diese Theorie durch die Untersuchungen von Huttunen et al., die zeigen konnten, dass S100A1 über eine Aktivierung von RAGE die Überlebensrate von Neuronen steigert (Huttunen et al., 2000). Darüber hinaus hat

S100B in nanomolarer Konzentration einen anti-apoptotischen Effekt, da es über den Transkriptionsfaktor NF-kappa B die Expression des anti-apoptotischen Protein Bcl-2 hochreguliert (Huttunen et al., 2000). Es ist daher möglich, dass somit auch S100A1 im Allgemeinen eine anti-apoptotische Wirkung hat.

IV.3 Effekte von extrazellulär zugefügtem S100A1 auf Kardiomyozyten und Fibroblasten

Da für das Ca^{2+} -bindende S100A1 Protein intrazelluläre und extrazelluläre Effekte beschrieben wurden, war es unser Ziel, morphologische und funktionelle Effekte einer extrazellulären S100A1 Stimulation an neonatalen Kardiomyozyten zu analysieren. Die Untersuchungen umfassten morphologische und funktionelle Analysen. Die morphologischen Lokalisationsuntersuchungen bezogen sich auf die drei zytoskelettalen Proteine Desmin, Tubulin und α -Aktinin sowie auf die beiden Ca^{2+} -regulierenden Proteine Ryanodin-Rezeptor und SERC2a. Funktionell wurde die spontane Schlagfrequenz der Kardiomyozyten und die Proliferationsrate von Fibroblasten in Abhängigkeit einer S100A1 Stimulation untersucht.

IV.3.1 Extrazelluläres S100A1 hat keine Auswirkung auf die Morphologie von zytoskelettalen Proteinen

Aufgrund bereits beschriebener Interaktionen zwischen S100A1 und zytoskelettalen Proteinen untersuchten wir in neonatalen Kardiomyozyten die Morphologie dieser Proteine nach einer S100A1 Stimulation. In biochemischen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass S100A1 die Polymerisation von Mikrotubuli inhibiert. Dabei bindet S100A1 das einzubauende Tubulin und fördert zugleich dessen Absonderung (Donato et al., 1985; Donato, 1988). Auf eine ähnliche Art und Weise nimmt S100A1 Einfluss auf den Aufbau der Intermediärfilamente vom Typ III: S100A1 bindet an die N-terminale Kopfdomäne der Untereinheiten, wodurch deren Einbau inhibiert wird. Dies hat zur Folge, dass die Polymerisation und zugleich auch das Längenwachstum der Intermediärfilamente (GFAP [glial fibrillary acidic protein] und Desmin) beeinflusst wird (Garbuglia et al., 1999; Sorci et al., 1999). Ebenfalls wurde eine spezifische Interaktion von S100A1 mit dem CapZ-Protein beschrieben (Ivanenkov et al., 1996). CapZ ist subzellulär an der Z-Bande (Z-Scheibe) von Muskelfasern und Herzmuskelzellen lokalisiert, wobei die Funktion dieses Proteins noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. Um eine mögliche Interaktion von S100A1 an der Z-Bande nachzuweisen, wählten wir für unsere Untersuchungen zur

Darstellung der Z-Bande das zytoskelettale Protein α -Aktinin.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden neonatale Kardiomyozyten unter definierten Zellkulturbedingungen für sechs Tage mit rekombinantem S100A1 (in einer Gesamtkonzentration von 1 μ M) stimuliert. In den darauffolgenden Lokalisationsuntersuchungen konnte bei den drei untersuchten zytoskelettalen Proteinen (Tubulin, Desmin und α -Aktinin) kein morphologisch relevanter Unterschied im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen festgestellt werden. Alle drei Proteine wiesen eine regelrechte subzelluläre Lokalisation in Kardiomyozyten auf. Ebenso konnte kein Unterschied in Abhängigkeit vom Fibroblastenanteil (Zellpräparationsmethode I-III) aufgezeigt werden.

Somit konnten wir erstmals zeigen, dass durch eine extrazelluläre S100A1 Stimulation keine relevanten Unterschiede von Desmin, Mikrotubuli und α -Aktinin in Hinblick auf ihre morphologische Lokalisation in neonatalen Kardiomyozyten hervorgerufen werden können. Bestätigt werden diese Daten durch die morphologischen Untersuchungen an S100A1 überexprimierenden Kardiomyozyten (mit Hilfe eines S100A1 adenoviralen Gentransfers), die im Vergleich zu Kontrollzellen ebenfalls keine Veränderungen in Hinblick auf die Morphologie und Vitalität der Kardiomyozyten aufzeigten (Most et al., 2001). Diese Daten sind insbesondere deshalb von besonderem Interesse, da S100A1 als neues positives inotropes Molekül ein interessanter Kandidat zur Gentherapie der Herzinsuffizienz darstellt. Eine Überexpression dieses Protein hätte also mit grosser Wahrscheinlichkeit keine negativen Auswirkungen auf das Zytoskelett.

IV.3.2 Extrazelluläres S100A1 hat keine Auswirkung auf die Morphologie von Ca^{2+} -regulierenden Proteinen

Die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten wird durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert (Berridge, 1990). Das SR bedingt im wesentlichen die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase (Ebashi, 1972). Aus diesen Gründen wurden die zwei Ca^{2+} -regulierenden Proteine Ryanodin-Rezeptor und SERCA2a des SR morphologisch nach exogener S100A1 Stimulation untersucht. Der Ryanodin-Rezeptor wird durch den transsarkolemmalen Ca^{2+} -Einstrom via Dihydropyridinrezeptor aktiviert, wodurch es zum Ausstrom von Ca^{2+} aus dem SR in den Intrazellularraum kommt und eine Muskelkontraktion ausgelöst wird (Ca^{2+} induced Ca^{2+} release) (Marks, 2000). SERCA2a pumpt dann das Ca^{2+} wieder in das Lumen des SR zurück, wodurch die Muskelrelaxation ausgelöst wird.

S100A1 nimmt in mehrerer Hinsicht Einfluss auf die Muskelkontraktion. So ist S100A1 in der Lage über eine direkte Interaktion mit dem Ryanodin-Rezeptor des Skelettmuskels, die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals positiv zu beeinflussen (Treves et al., 1997), woraus ein vermehrter Ca^{2+} -Strom aus dem SR und folglich eine stärkere Kontraktion resultiert. Zudem konnte eine direkte Steigerung der myokardialen Kontraktilität durch S100A1 *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden (Most et al., 2001). Daraus resultierte die Frage, inwieweit S100A1 auch Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der zwei Ca^{2+} -regulierenden Proteine nimmt.

Insgesamt konnten im Vergleich zu den Kontrollzellen keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation vom Ryanodin-Rezeptor und der SERC2a durch eine S100A1 Stimulation festgestellt werden. Somit zeigten unsere morphologischen Untersuchungen, dass eine extrazelluläre S100A1 Stimulation in neonatalen Kardiomyozyten keinen direkten Einfluss auf das intrazelluläre Verteilungsmuster vom Ryanodin-Rezeptor und SERC2a ausübt. Dieses Resultat wird durch biochemische Daten von Most et al. unterstützt, die sowohl *in vitro* (im Modell der isolierten Herzmuskelzelle) als auch *in vivo* (im transgenen Tiermodell) zeigten, dass der S100A1 Gentransfer die systolische und diastolische Funktion des Herzmuskels positiv steigert, ohne dabei das Expressionsverhalten vom Ryanodin-Rezeptor und SERC2a zu beeinträchtigen (Most et al., 2001).

IV.3.3 Steigerung der Proliferationsrate von Fibroblasten durch eine S100A1 Stimulation

Um einen direkten Proliferationseffekt durch S100A1 auf Fibroblasten nachzuweisen, wurden reine Fibroblastenkulturen auf zwei unterschiedliche Arten kultiviert: (a) Fibroblasten in DMEM mit 10 % FCS und (b) Fibroblasten in DMEM mit 10 % FCS und der Zugabe von BrdU. BrdU ist ein Mitose-Inhibitor, der während der S-Phase an die DNA bindet (Joyce et al., 1998). Verglichen zu einem 10 % FCS-haltigem Kulturmedium wird durch die Zugabe von BrdU eine Reduktion auf ein ca. 1 % FCS-haltiges Kulturmedium erreicht (Klein et al., 1985). BrdU wurde aus folgenden zwei Gründen in der Fibroblastenkultur verwendet: 1.) um die gleichen Zellkulturbedingungen herzustellen wie bei der Kardiomyozytenpräparation (Zellpräparationsmethode III, Zugabe von 0.1 mM BrdU) und 2.) um durch ein niedriges Proliferationsniveau einen direkten Effekt von S100A1 beobachten zu können (im Serum [FCS] sind bereits eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren vorhanden, die auch die Zellproliferationsrate beeinflussen können).

Nachdem wir Fibroblasten unter definierten Zellkulturbedingungen fünf Tage lang mit 1 μM rekombinantem S100A1 stimuliert hatten, wurde alle 24 Std. die Zellzahl bestimmt. Nur für Fibroblasten, die unter Zugabe von BrdU kultiviert wurden, konnte durch die S100A1 Stimulation ab dem dritten Tag eine signifikante Steigerung der Zellzahl festgestellt werden. Bei den unstimulierten Kontrollzellen, die ebenfalls mit BrdU behandelt wurden, konnte eine relativ konstante Zellzahl über den gesamten Zeitraum beobachtet werden. Fibroblasten ohne BrdU-Behandlung zeigten sowohl unter S100A1-Stimulation als auch unter unstimulierten Bedingungen eine relativ ähnliche und nicht signifikante Zunahme der Zellzahl. Die Proliferation dieser Fibroblasten wird folglich durch das 10 % FCS-haltige Medium verursacht, sodass die proliferativen S100A1 Effekte, wie sie bei den BrdU-behandelten Fibroblasten aufgezeigt werden konnten, durch das Serum überspielt werden.

Hiermit konnten wir zeigen, dass durch eine extrazelluläre S100A1 Stimulation die Proliferationsrate von Herzfibroblasten gesteigert werden kann, die möglicherweise auf eine gesteigerte Aktivität der Ndr Protein Kinase („nuclear serine/threonine protein kinase“) durch S100A1 zurückzuführen sein könnte. Die Ndr Protein Kinase beeinflusst die Zellteilung und Zellmorphologie (Millward et al., 1995), wobei Untersuchungen von Millward eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der Ndr Protein Kinase durch S100A1 und S100B zeigten (Millward et al., 1998).

Ferner konnten auch Zimmer et al. proliferative Effekte von S100A1 bei PC12 Zellen (Phächromozytomzellen) nachweisen, wobei der Mechanismus nicht näher beschrieben wurde (Zimmer et al., 1998). Welcher Effekt nun für die hier beschriebene S100A1 induzierte Fibroblastenproliferation verantwortlich ist, bleibt zunächst offen und wird in weiteren Experimenten zu klären sein. Welche biologisch sinnvolle Funktion eine solche Stimulation von Fibroblasten durch S100 Proteine haben soll, ist bislang ebenso unbekannt und benötigt weitere Untersuchungen.

IV.3.4 Extrazelluläres S100A1 steigert die spontane Schlagfrequenz der Kardiomyozyten in Abhängigkeit des Fibroblastenanteils

Nachdem wir keinen relevanten Effekt auf die Morphologie von zytoskelettalen und Ca^{2+} -regulierenden Proteine durch eine S100A1 Stimulation zeigen konnten, untersuchten wir, inwieweit S100A1 die spontane Schlagfrequenz von Kardiomyozyten beeinflusst. Dabei wurden Zellen nach allen drei Zellpräparationsmethoden präpariert und mit S100A1 stimuliert. Daraufhin wurde die Schlagfrequenz von Kardiomyozyten am Tag sechs unter einem Lichtmikroskop

bestimmt. Hierbei steigerte S100A1 signifikant die Schlagfrequenz von Kardiomyozyten der Zellpräparationsmethode III, die zugleich auch mit BrdU behandelt wurden (niedriger Fibroblastenanteil). Bei der Zellpräparationsmethode I, die einen hohen Anteil an Fibroblasten und damit auch bereits eine hohe Schlagfrequenz aufwies, konnte keine weitere Frequenzsteigerung durch S100A1 Stimulation beobachtet werden. Zellen der Methode II (mittlerer Fibroblastenanteil) wiesen durch S100A1 Stimulation eine höhere Schlagfrequenz auf, die jedoch zur Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich war.

Da S100A1 in beiden Zelltypen (Kardiomyozyten und Fibroblasten) aufgenommen werden kann, kommen zwei mögliche Theorien für die Steigerung der Schlagfrequenz in Betracht: Zum einen könnte S100A1 einen direkten Effekt auf die Kardiomyozyten ausüben, indem es nach dessen Aufnahme durch Beeinflussung von Schrittmacherzellen positiv chronotrop wirkt. Diese Erklärung erscheint jedoch als sehr unwahrscheinlich, da im S100A1 transgenen Tier keinerlei Veränderung der Herzfrequenz gegenüber den Wildtypen beobachtet wurde (Most et al., 2001). Zum anderen könnte S100A1 auch indirekt einen positiven chronotropen Effekt auf neonatale Kardiomyozyten ausüben, indem es Auswirkungen auf die Fibroblasten aufweist. Denn nach Aufnahme von S100A1 in Fibroblasten kommt es zur Proliferation derselben, wobei es möglicherweise auch zu einer vermehrten Sekretion von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren kommt, die ihrerseits an neonatalen Kardiomyozyten als parakrine Faktoren die Chronotropie von Kardiomyozyten beeinflussen können. Interessanterweise konnte von Merle et al. gezeigt werden, dass Fibroblasten-Wachstumsfaktoren („basic fibroblast growth factors“) zum einen über spezifische Rezeptoren („bFGF“ [basic fibroblasts growth factor]) wie auch über eine Aktivierung von Voltage-unabhängigen Ca^{2+} -Kanälen die Schlagfrequenz von Kardiomyozyten zu steigern vermögen (Merle et al., 1995). Diese Befunde sind auch mit der hier durchgeführten Charakterisierung der verschiedenen Zellpräparationsmethoden in Einklang zu bringen, da mit Zunahme der Fibroblastenanzahl, und somit auch deren Wachstumsfaktoren, die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten zunimmt. Welche biologische Relevanz nun durch eine solche S100A1 induzierte Fibroblastenproliferation und daraus resultierender Schlagfrequenzsteigerung neonataler Kardiomyozyten haben kann, ist bislang noch unklar. Da die Kontraktion neonataler Kardiomyozyten unter S100A1 Stimulation zwar in höherer Frequenz erfolgten, aber nicht tachykard waren, und ferner regelmäßiger d.h. rhythmischer erfolgten, bleibt zu vermuten, dass die Stimulation

mit S100A1 zu einer beschleunigten Reifung neonataler Kardiomyozyten führt.

IV.4 Definition zellulärer Aufnahmemechanismen von S100A1 durch Kardiomyozyten und Fibroblasten

Um die Aufnahme von S100A1 zu visualisieren, wurde rekombinantes S100A1 mit dem Farbstoff Alexa 568 gekoppelt. Hierbei zeigte sich bereits nach 5 Min. farbstoffgekoppeltes S100A1 sowohl in Kardiomyozyten als auch in Fibroblasten. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass die Aufnahme von Farbstoffgekoppeltem S100A1 Ca^{2+} -abhängig erfolgt bzw. durch EGTA-haltiges Medium blockiert werden kann. Um einen möglichen endozytotischen Prozess als Aufnahmemechanismus für S100A1 zu überprüfen, wurden die Zellen nach einer S100A1 Stimulation mit zwei unterschiedlichen Antikörpern markiert. Zum einen wurde ein Anti-Transferrin Antikörper benutzt, der einen „*early endosomes*“ abhängigen Aufnahmemechanismus detektiert, sowie ein Anti-Caveolin-3 Antikörper, der einen „*Caveolae*“- abhängigen Pathway markiert. *Caveolae* sind flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran, die erstmals vor 50 Jahren entdeckt wurden (Conner und Schmidt, 2003) und in Kardiomyozyten mit Komponenten wichtiger Signaltransduktionswege assoziiert sind.

Auf Grund dieser zusätzlichen Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass S100A1 endozytiert wird und dass dieser Aufnahmevorgang über „*early endosomes*“ nicht aber über „*Caveolae*“ abläuft (Abb. 34/35). Die Tatsache, dass S100A1 über einen spezifischen Mechanismus in die Herzmuskelle aufgenommen wird unterstreicht die Hypothese, dass mit der S100A1 Internalisierung auch spezifische intrazelluläre Effekte verbunden sind. Da auch mit dem Kompartiment der „*early endosomes*“ wichtige Signaltransduktionskomponenten wie z.B. MAP-Kinasen, Ras und Raf kolokalisieren (Sorkin, 2002), muss angenommen werden, dass S100A1 auch auf zentrale Signaltransduktionsprozesse wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose Einfluss hat.

V. Zusammenfassung

Das Ca^{2+} -bindende Protein S100A1 stellt aufgrund seiner positiv inotropen Effekte ein neues Kandidatenprotein zur Behandlung der Herzinsuffizienz dar. Bekannt ist, dass andere Isoformen der S100 Proteinfamilie auch extrazelluläre Funktionen aufweisen, wobei für einige wenige die Sekretions- und Aufnahmemechanismen bereits bekannt sind. Da für das kardiale S100 Protein S100A1 hierzu keinerlei Daten vorliegen, eine S100A1 Therapie der Herzinsuffizienz im Sinne einer parenteralen oder oralen Darreichung von S100A1 Peptiden jedoch ein interessanter Ansatz zur Entwicklung einer neuen Therapie der Herzinsuffizienz darstellt, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den zellulären Aufnahmemechanismus sowie die damit verbundene zelluläre Funktion und subzelluläre Verteilung von S100A1 näher zu untersuchen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass farbstoffgekoppeltes S100A1 Ca^{2+} -abhängig über einen endozytotischen Mechanismus in Kardiomyozyten und Fibroblasten aufgenommen wird. Auch wenn in dieser Arbeit der Aufnahmemechanismus noch nicht ganz geklärt werden konnte, so ist zu bemerken, dass endozytisiertes S100A1 mit dem Kompartiment der „early endosomes“ kolokalisiert, das zugleich mit Proteinkinasen der Signaltransduktion assoziiert ist. Somit sind auch spezifische S100A1 Effekte z. B. auf die Signaltransduktion von MAP Kinasen („mitogen-activated protein kinase“) zu vermuten, wie sie bereits schon für andere S100 Proteine gezeigt werden konnten.

Als funktioneller Parameter zur Untersuchung der extrazellulären Funktionen von S100A1 wurde die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten untersucht. Es zeigte sich, dass mit S100A1 behandelte Kardiomyozyten eine regelmäßige und höhere Schlagfrequenz aufweisen als Kontrollzellen. Diese Effekte können jedoch nicht im herkömmlichen Sinne als positiv chronotrop bezeichnet werden, da im transgenen Tier keinerlei Einfluss von S100A1 auf die Herzfrequenz nachgewiesen werden konnte. Vielmehr könnte dieser Effekt auf eine beschleunigte Reifung neonataler Kardiomyozyten z. B. durch Aktivierung MAP Kinasen abhängiger Signaltransduktionsprozesse zurückzuführen sein. Die genauen molekularen Mechanismen müssen hier ebenso noch geklärt werden wie die Frage, ob ein solcher Effekt direkt am Kardiomyozyten und/oder indirekt am Fibroblasten angreift.

Bisherige Studien wiesen in biochemischen Rekonstitutionsassays eine spezifische Hemmung der Vernetzung von Komponenten des Zytoskelettes (Mikrotubuli, Desmin

und α -Aktinin) durch S100A1 auf. Überraschenderweise zeigte sich keinerlei Veränderung der subzellulären Verteilung von Mikrotubuli, Desmin oder α -Aktinin, sodass die Befunde früherer Arbeiten nicht auf die schlagende Kardiomyozyte zu übertragen sind. Eine Erhöhung der lokalen S100A1 Konzentrationen im Herzen z. B. im Rahmen einer Peptidtherapie würde wahrscheinlich keinen negativen Einfluss auf die Struktur des kardialen Zytoskeletts haben.

Für die Charakterisierung weiterer pleiotroper Effekte von S100A1 ist es von besonderer Bedeutung, die genaue subzelluläre Lokalisation dieses Proteins zu kennen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die subzelluläre Lokalisation von S100A1 im Kardiomyozyten in ganz entscheidendem Maße von den gewählten Zellkulturbedingungen wie auch von der Fixierungsmethode abhängig ist. So konnte gezeigt werden, dass S100A1 entgegen der bisherigen Lehrmeinung nicht nur im zytoplasmatischen Kompartiment lokalisiert ist, sondern in Abhängigkeit der Zellkulturbedingungen zwischen einem zytoplasmatischen Verteilungsmuster und einer nukleären Anreicherung wechselt. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass S100A1 die Aktivität von der Ndr-Kinase reguliert, muss jetzt die neue Hypothese generiert werden, dass S100A1 als ein kardialer Expressionsfaktor eine wichtige Rolle in der Adaption des Herzmuskels im Rahmen pathophysiologischer Belastungsreaktionen spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ferner erstmals der Nachweis geführt werden, dass S100A1 wie andere S100 Proteine auch schnell durch endozytotische Mechanismen in Kardiomyozyten aufgenommen wird und dort messbare Effekte auf die Funktion ausübt. Darüberhinaus konnte mit dem Nachweis der Kerngängigkeit von S100A1 die Grundlage für ein neues Forschungskonzept gelegt werden, in dem S100A1 als neuer kardialer Expressionsfaktor zu charakterisieren sein wird. Darüber hinaus stellen diese Daten eine wichtige Grundlage zur Entwicklung einer S100A1 Peptidtherapie zur Behandlung der Herzinsuffizienz dar.

1. Adhikari B B,Wang K: S100A1 modulates skeletal muscle contraction by desensitizing calcium activation of isometric tension, stiffness and ATPase. FEBS Lett **497**, 95-98 (2001).
2. Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R,Donato R: Annexin V, annexin VI, S100A1 and S100B in developing and adult avian skeletal muscles. Neuroscience **109**, 371-388 (2002).
3. Baschong W, Duerrenberger M, Mandinova A,Suetterlin R: Three-dimensional visualization of cytoskeleton by confocal laser scanning microscopy. Methods Enzymol **307**, 173-189 (1999).
4. Baudier J,Gerard D: Ions binding to S100 proteins. II. Conformational studies and calcium- induced conformational changes in S100 alpha alpha protein: the effect of acidic pH and calcium incubation on subunit exchange in S100a (alpha beta) protein. J Biol Chem **261**, 8204-8212 (1986a).
5. Baudier J, Glasser N,Gerard D: Ions binding to S100 proteins. I. Calcium- and zinc-binding properties of bovine brain S100 alpha alpha, S100a (alpha beta), and S100b (beta beta) protein: Zn²⁺ regulates Ca²⁺ binding on S100b protein. J Biol Chem **261**, 8192-8203 (1986b).
6. Belot N, Pochet R, Heizmann C W, Kiss R,Decaestecker C: Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton. Biochim Biophys Acta **1600**, 74-83 (2002).
7. Berridge M J: Calcium oscillations. J Biol Chem **265**, 9583-9586 (1990).
8. Bick R J, Snuggs M B, Poindexter B J, Buja L M, Van Winkle W B: Physical, contractile and calcium handling properties of neonatal cardiac myocytes cultured on different matrices. Cell Adhes Commun **6**, 301-310 (1998).
9. Brett W, Mandinova A, Remppis A, Sauder U, Ruter F, Heizmann C W, Aebi U,Zerkowski H R: Translocation of S100A1(1) calcium binding protein during heart surgery. Biochem Biophys Res Commun **284**, 698-703 (2001).

10. Conner S D, Schmid S L: Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37-44 (2003).
11. Donato R: Calcium-independent, pH-regulated effects of S-100 proteins on assembly- disassembly of brain microtubule protein in vitro. *J Biol Chem* **263**, 106-110 (1988).
12. Donato R: S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 637-668 (2001).
13. Donato R: Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* **60**, 540-551 (2003).
14. Donato R, Giambanco I, Aisa M C, di Geronimo G, Ceccarelli P, Rambotti M G, Spreca A: Cardiac S-100a0 protein: purification by a simple procedure and related immunocytochemical and immunochemical studies. *Cell Calcium* **10**, 81-92 (1989).
15. Donato R, Isobe T, Okuyama T: S-100 proteins and microtubules: analysis of the effects of rat brain S- 100 (S-100b) and ox brain S-100a0, S-100a and S-100b on microtubule assembly-disassembly. *FEBS Lett* **186**, 65-69 (1985).
16. Donato R: Perspectives in S-100 protein biology. *Cell Calcium* **12**, 713-726 (1991).
17. Du X J, Cole T J, Tennis N, Gao X M, Kontgen F, Kemp B E, Heierhorst J: Impaired cardiac contractility response to hemodynamic stress in S100A1- deficient mice. *Mol Cell Biol* **22**, 2821-2829 (2002).
18. Duarte W R, Iimura T, Takenaga K, Ohya K, Ishikawa I, Kasugai S: Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 416-420 (1999).
19. Ebashi S: Calcium ions and muscle contraction. *Nature* **240**, 217-218 (1972).
20. Ehlermann P, Redweik U, Blau N, Heizmann C W, Katus H A, Remppis A:

Separation of low molecular weight proteins with SDS-PAGE using taurine as a new trailing ion. *Gen Physiol Biophys* **20**, 203-207 (2001).

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

22. Garbuglia M, Verzini M, Sorci G, Bianchi R, Giambanco I, Agnietti A L, Donato R: The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. *Braz J Med Biol Res* **32**, 1177-1185 (1999).

23. Gomez J P, Fares N, Potreau D: Effects of Bay K 8644 on L-type calcium current from newborn rat cardiomyocytes in primary culture. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 2217-2229 (1996).

24. Haimoto H, Kato K: S100a0 (alpha alpha) protein, a calcium-binding protein, is localized in the slow-twitch muscle fiber. *J Neurochem* **48**, 917-923 (1987).

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

26. Heizmann C W, Cox J A: New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals* **11**, 383-397 (1998).

27. Heizmann C W, Hunziker W: Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends Biochem Sci* **16**, 98-103 (1991).

28. Hofmann M A, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, et al.: RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97**, 889-901 (1999).

29. Hsieh H L, Schafer B W, Cox J A, Heizmann C W: S100A13 and S100A6 exhibit distinct translocation pathways in endothelial cells. *J Cell Sci* **115**, 3149-3158 (2002).

30. Huttunen H J, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti A L, Donato R, Rauvala H: Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* **275**, 40096-40105 (2000).
31. Ivanenkov V V, Dimlich R V, Jamieson G A, Jr.: Interaction of S100a0 protein with the actin capping protein, CapZ: characterization of a putative S100a0 binding site in CapZ alpha- subunit. *Biochem Biophys Res Commun* **221**, 46-50 (1996).
32. Joyce N C, Harris D L, Zieske J D: Mitotic inhibition of corneal endothelium in neonatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 2572-2583 (1998).
33. Kato K, Kimura S: S100a0 (alpha alpha) protein is mainly located in the heart and striated muscles. *Biochim Biophys Acta* **842**, 146-150 (1985).
34. Kiewitz R, Acklin C, Minder E, Huber P R, Schafer B W, Heizmann C W: S100A1, a new marker for acute myocardial ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 865-871 (2000).
35. Klein I, Daoud M, Whiteside T: Development of heart cells in culture: studies using an affinity purified antibody to a myosin light chain. *J Cell Physiol* **124**, 49-53 (1985).
36. Komiyama M, Soldati T, von Arx P, Perriard J C: The intracompartamental sorting of myosin alkali light chain isoproteins reflects the sequence of developmental expression as determined by double epitope-tagging competition. *J Cell Sci* **109**, 2089-2099 (1996).
37. Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
38. Maco B, Mandinova A, Durrenberger M B, Schafer B W, Uhrik B, Heizmann C W: Ultrastructural distribution of the S100A1 Ca²⁺-binding protein in the human heart. *Physiol Res* **50**, 567-574 (2001).
39. Maco B, Uhrik B, Heizmann C W: Distribution of the Ca²⁺-binding S100A1 protein at

different sarcomere lengths of slow and fast rat skeletal muscles. *Gen Physiol Biophys* **19**, 237-244 (2000).

40. Mandinova A, Atar D, Schafer B W, Spiess M, Aebi U, Heizmann C W: Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium. *J Cell Sci* **111**, 2043-2054 (1998).

41. Marks A R: Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ Res* **87**, 8-11 (2000).

42. Merle P L, Feige J J, Verdeti J: Basic fibroblast growth factor activates calcium channels in neonatal rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* **270**, 17361-17370 (1995).

43. Mikkelsen S E, Novitskaya V, Kriajevska M, Berezin V, Bock E, Norrild B, Lukanidin E: S100A12 protein is a strong inducer of neurite outgrowth from primary hippocampal neurons. *J Neurochem* **79**, 767-776 (2001).

44. Millward T A, Heizmann C W, Schafer B W, Hemmings B A: Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *Embo J* **17**, 5913-5922 (1998).

45. Moews P C, Kretsinger R H: Refinement of the structure of carp muscle calcium-binding parvalbumin by model building and difference Fourier analysis. *J Mol Biol* **91**, 201-225 (1975).

46. Moore B W: A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **19**, 739-744 (1965).

47. Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Plegier S T, Reppel M, Borries M, Niroomand F, Pieske B, Janssen P M, Eschenhagen T, et al.: S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13889-13894 (2001).

48. Mouta Carreira C, LaVallee T M, Tarantini F, Jackson A, Lathrop J T, Hampton B Burgess W H, Maciag T: S100A13 is involved in the regulation of fibroblast growth

factor-1 and p40 synaptotagmin-1 release in vitro. J Biol Chem **273**, 22224-22231 (1998).

49. Nishida S, Nagamine H, Tanaka Y, Watanabe G: Protective effect of basic fibroblast growth factor against myocyte death and arrhythmias in acute myocardial infarction in rats. Circ J **67**, 334-339 (2003).

50. Novitskaya V, Grigorian M, Kriaievska M, Tarabykina S, Bronstein I, Berezin V, Bock E, Lukanidin E: Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. J Biol Chem **275**, 41278-41286 (2000).

51. Pedrocchi M, Schafer B W, Durussel I, Cox J A, Heizmann C W: Purification and characterization of the recombinant human calcium-binding S100 proteins CAPL and CACY. Biochemistry **33**, 6732-6738 (1994).

52. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A: Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. Nat Cell Biol **3**, 473-483 (2001).

53. Persechini A, Moncrief N D, Kretsinger R H: The EF-hand family of calcium-modulated proteins. Trends Neurosci **12**, 462-467 (1989).

54. Rakhit R D, Mojet M H, Marber M S, Duchon M R: Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes. Circulation **103**, 2617-2623 (2001).

55. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C: Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. J Biol Chem **272**, 9496-9502 (1997).

56. Remppis A, Greten T, Schafer B W, Hunziker P, Erne P, Katus H A, Heizmann C W: Altered expression of the Ca(2+)-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. Biochim Biophys Acta **1313**, 253-257 (1996).

57. Robert P, Tsui P, Laville M P, Livi G P, Sarau H M, Bril A, Berrebi-Bertrand I: EDG1 receptor stimulation leads to cardiac hypertrophy in rat neonatal myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1589-1606 (2001).
58. Ruwhof C, van Wamel A E, Egas J M, van der Laarse A: Cyclic stretch induces the release of growth promoting factors from cultured neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem* **208**, 89-98 (2000).
59. Ruwhof C, van Wamel A E, van der Valk L J, Schrier P I, van der Laarse A: Direct, autocrine and paracrine effects of cyclic stretch on growth of myocytes and fibroblasts isolated from neonatal rat ventricles. *Arch Physiol Biochem* **109**, 10-17 (2001).
60. Schäfer B W, Heizmann C W: The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* **21**, 134-140 (1996).
61. Schäfer B W, Wicki R, Engelkamp D, Mattei M G, Heizmann C W: Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* **25**, 638-643 (1995).
62. Selinfreund R H, Barger S W, Pledger W J, Van Eldik L J: Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3554-3558 (1991).
63. Sorci G, Bianchi R, Giambanco I, Rambotti M G, Donato R: Replicating myoblasts and fused myotubes express the calcium-regulated proteins S100A1 and S100B. *Cell Calcium* **25**, 93-106 (1999).
64. Sorkin A, Von Zastrow M: Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 600-614 (2002).
65. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354 (1979).

66. Treves S, Scutari E, Robert M, Groh S, Ottolia M, Prestipino G, Ronjat M, Zorzato F: Interaction of S100A1 with the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle. *Biochemistry* **36**, 11496-11503 (1997).
67. van Luyn M J, Tio R A, Gallego y van Seijen X J, Plantinga J A, de Leij L F, DeJongste M J, van Wachem P B: Cardiac tissue engineering: characteristics of in unison contracting two- and three-dimensional neonatal rat ventricle cell (co)-cultures. *Biomaterials* **23**, 4793-4801 (2002).
68. Yamasaki R, Berri M, Wu Y, Trombitas K, McNabb M, Kellermayer M S, Witt C, Labeit D, Labeit S, Greaser M, et al.: Titin-actin interaction in mouse myocardium: passive tension modulation and its regulation by calcium/S100A1. *Biophys J* **81**, 2297-2313 (2001).
69. Zimmer D B, Cornwall E H, Landar A, Song W: The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* **37**, 417-429 (1995).
70. Zimmer D B, Cornwall E H, Reynolds P D, Donald C M: S100A1 regulates neurite organization, tubulin levels, and proliferation in PC12 cells. *J Biol Chem* **273**, 4705-4711 (1998).

VII. Danksagung

Ich danke Herrn **Prof. Dr. med. H.A. Katus**, der mir meinen Arbeitsplatzes in der Medizinischen Klinik II zur Verfügung gestellt hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **PD Dr. med. Andrew Remppis** für die interessante Themenstellung, sowie Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente. Zugleich gilt ein großer Dank an die ganze Laborgruppe Remppis, wobei mich vor allem **Dr. med. Philipp Ehlermann** und **Dr. med. Michael Reppel** unterstützt haben. Dabei gilt mein ganz besonderer Dank Herrn **Dr. med. Patrick Most**, der zum Gelingen dieser Arbeit, der Experimente und Veröffentlichungen sehr viel beigetragen hat.

Auch Herrn **Prof. Ueli Aebi** bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, der mich in seinem Labor am Biozentrum (Basel, Schweiz) aufgenommen hat, mir alle technischen Möglichkeiten geboten hat, und mich vor allem durch seine fachliche Kompetenz unterstützte. Zudem hat er mir das jetzige MDPHD-Stipendiat überhaupt erst ermöglicht.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau **PD Dr. Cora-Ann Schoenenberger**, die mich durch ihr unermüdliches Engagement, ihre fachliche Kompetenz, ihre persönliche Hilfsbereitschaft und ihre Geduld unterstützt und gefördert hat und entscheidend zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin danke ich Frau **Dr. Birthe Fahrenkrog** und Frau **Gabriele Haug-Dietrich** für die Durchsicht dieser Arbeit und Herrn **Dr. Joachim Köser**, der mich immer durch neue Artikel und Experimente inspiriert hat.

Ebenso danke ich **meiner Familie**, die mir überhaupt diesen beruflichen Werdegang ermöglicht hat.

Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann **Oliver**, der immer wieder viel Geduld hinsichtlich dieser Arbeit aufgebracht hat. Ohne ihn und seine unermüdliche Unterstützung wäre diese Arbeit und mein jetziger Werdegang nicht möglich gewesen.

VIII. Curriculum vitae**Persönliche Daten**

Name	Melanie Börries
Geburtsdatum	25.8.1971
Geburtsort	Oldenburg in Oldenburg
Familienstand	verheiratet

Schul Ausbildung

Grundschule	1978-1982	Dötlingen
Orientierungsstufe	1982-1984	Lüneburg
Gymnasium	1984-1992	Lüneburg

Sozialdienst

Freiwilliges soziales Jahr	1992-1993	Hannover
----------------------------	-----------	----------

Beruf Ausbildung

Staatlich anerkannte Krankenpflegehelferin	1993-1994
an der Universität zu Lübeck	

Medizinische Ausbildung

Vorklinik	1994-1996	Medizinische Universität zu Lübeck
Klinik	1996-2001	Medizinische Universität zu Lübeck
3. Staatsexamen	April 2001	Medizinische Universität zu Lübeck

Beruflicher Werdegang

MDPhD-Stipendiat Maurice-E.-Müller-Stiftung	Beginn Mai 2001
am Biozentrum der Universität zu Basel, Schweiz	

Klinische Ausbildung in der Kardiologie, Departement	Januar-März 2002
Herz und Gefäße, Inselspital, Universitätsspital Bern	Januar-März 2003

Dissertation

Experimenteller Teil	März 1997-2002
Abgabe	2003

Publikationen:

Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Reppel M, Börries M, Pieske B, Jansson PML, Eschenhagen T, Karczewski P, Smith GL, Koch WJ, Katus HA, Remppis A (2001): S100A1: A regulator of myocardial contractility.
Proc Natl Acad Sci USA 98: 13889-13894.

Remppis A, Most P, Löffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Pleger S, Börries M, Reppel M, Fischer J, Koch WJ, Smith GL, Katus HA (2002): The small EF-hand Ca^{2+} binding protein S100A1 increase contractility and Ca^{2+} cycling in rat cardiacmyocytes.
Basic Res Cardiol 97: I/56-I/62.

Boerries M, Most P, Eicher C, Schweda C, Ehlermann P, Pleger ST, Koch WJ, Katus HA, Schoenenberger C-A and Andrew Remppis (2003): Extracellular S100A1 protein inhibits apoptosis of ventricular rat cardiac myocytes via activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) pathway.
JBC., in press., 2003.

Most P, Eicher C, Boerries M, Schweda C, Löffler E, Ehlermann P, Pleger S, Wedel T, Soellner S, Koch WJ, Katus HA, Schoenenberger C-A and Andrew Remppis: Extracellular S100A1 protein improves $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger activity in neonatal cardiomyocytes.
Cardiovasc Res., submitted, 2003.