

Alexandra Schneider

Dr. med.

## **Der Einfluß der Extraktion und Rekonstitution des Proteins Calponin auf die Kontraktion und Relaxation permeabilisierter glatter Muskelfasern**

Geboren am 07.06.1973 in Karlsruhe

Reifeprüfung am 06.07.1991 in Karlsruhe

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis SS 2000

Physikum am 27.03.1995 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Karlsbad-Langensteinbach

Staatsexamen am 19.05.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Physiologie

Doktorvater: Prof. Dr. Dr. J.C. Rüegg

Die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins wird als der primäre Mechanismus angesehen, durch den die Kontraktion der glatten Muskulatur reguliert wird. Da es jedoch unter verschiedenen Bedingungen zu einer Dissoziation von Kraft und Phosphorylierung kommt, der sog. „latch state“, wird postuliert, daß noch weitere Faktoren die Kontraktion der glatten Muskulatur regulieren. Potentielle regulatorische Proteine sind die Proteine des dünnen Filaments, Caldesmon und Calponin. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von Calponin für die Kalziumsensitivität der Kraftentwicklung, die Beziehung zwischen Kraft und Phosphorylierung und für die Relaxationsrate zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Bedingungen entwickelt, die es erlauben, Calponin relativ selektiv aus permeabilisierten Muskelpräparaten des Hühnerkaumagens, als einen am besten charakterisierten glatten Muskel, zu extrahieren und den Effekt der Extraktion auf oben genannte Parameter zu untersuchen.

Extrahierte Präparate kontrahieren bei Erhöhung der Kalziumionenkonzentration auf etwa  $1\mu\text{M}$  und relaxieren nach Entzug des Kalziums. Die Kalziumregulierbarkeit bleibt nach

Extraktion also grundsätzlich erhalten. Dies ist anders als im quergestreiften Muskel, in dem die Regulierbarkeit durch Kalzium durch die Extraktion von Troponin aufgehoben wird. Calponin ist also im Gegensatz zu Troponin kein „An/Aus-Schalter“, sondern ein Modulator. Die Inkubation extrahierter Präparate in exogenem Calponin führt zu einer Verlangsamung der Relaxationsgeschwindigkeit. Bemerkenswerterweise beeinflusst die Zugabe von exogenem Calponin die Relaxationsgeschwindigkeit nativer (noch endogenes Calponin enthaltender) gehäuteter Präparate nicht. Die Kalziumsensitivität wird durch die Extraktion erniedrigt und es kommt zu einer Verschiebung der Beziehung zwischen Kraft und Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins, so daß nach der Extraktion von Calponin eine höhere Kalziumionenkonzentration bzw. höhere Phosphorylierungswerte als vor der Extraktion notwendig sind, um ein bestimmtes Kraftniveau zu erreichen. Nach der Extraktion von Calponin ist auch die Maximalkraft und die Kraftentwicklung bei submaximaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung reduziert. Allerdings kann nur letzterer Effekt durch die Rekonstitution der extrahierten Präparate mit gereinigtem Calponin rückgängig gemacht werden. Dies spricht dafür, daß für die Abnahme der Maximalkraft durch das Extraktionsverfahren noch andere Faktoren mitverantwortlich sind, etwa die Extraktion von  $\text{SM}_{22}$ , das zusammen mit Calponin extrahiert wird.  $\text{SM}_{22}$  kommt in der glatten Muskulatur in ähnlich hoher Konzentration wie Calponin vor, allerdings ist die Funktion dieses Proteins bisher ungeklärt. Ungeklärt ist auch der Befund, daß ein Teil der Muskelpräparate, die schon vor der Extraktion von Calponin eine niedrige Kalziumsensitivität aufwiesen, durch das Extraktions-/Rekonstitutionsverfahren bezüglich ihrer Kontraktionseigenschaften überhaupt nicht beeinflusst wurden. Außerdem konnten die Befunde anderer Autoren bestätigt werden, daß die Inkubation von nativen (noch Calponin enthaltenden) Präparaten in Calponin die Kontraktionskraft abschwächt. Dieser Effekt widerspricht allerdings den Extraktions-/Rekonstitutionsversuchen nur scheinbar, da die Überladung der Präparate mit exogenem Calponin –wenn die natürlichen Calponin-Bindungsplätze schon mit endogenem Calponin besetzt sind- möglicherweise eine unphysiologische Wirkung hat.