

Zusammenfassung

Im ersten Teil der Doktorarbeit wurde die Kinetik der Ca^{2+} -kontrollierten Konformationsänderungen des skeletalen Troponin I (sTnI) mittels der Stopped-Flow Technik analysiert. Dazu wurde Cys133 auf sTnI mit dem Fluoreszenzreporter 5-iodoacetamidofluorescein (IAF) markiert, und die Kinetik der Fluoreszenzänderungen, welche entweder durch eine schnelle Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]$ (Anschaltkinetik) oder schnelle Erniedrigung der $[\text{Ca}^{2+}]$ (Anschaltkinetik) ausgelöst wurde, analysiert. Diese Analyse wurde sowohl für den isolierten heterotrimetrischen skeletalen Troponin Komplex (sTn) als auch für sTn, welcher in Myofibrillen des Psoasmuskels des Kaninchens inkorporiert wurde, durchgeführt. Sowohl das isolierte als auch das inkorporierte sTn zeigten ein biphasisches Fluoreszenzsignal bei Ca^{2+} -Aktivierung. Während die schnelle Phase (Ratenkonstante $k_{\text{obs}(\text{fast})}^{+\text{Ca}} \gg 1000 \text{ s}^{-1}$) zuvor noch nicht für sTn im Sarkomer beobachtet wurde, ähnelte die $[\text{Ca}^{2+}]$ -abhängige Kinetik der langsameren Phase (Ratenkonstante $k_{\text{obs}(\text{slow})}^{+\text{Ca}}$) der Kinetik des monophasischen sTnI-Signals, welches in einer vorangegangenen Studie in gehäuteten Muskelfasern des Kaninchenpsoas charakterisiert wurde (Brenner & Chalovich, Biophys J 1999 77:2692-708).

Die beobachtete biphasische Kinetik kann mittels zwei aufeinander folgender Konformationsänderungen des sTnI modelliert werden: einer schnellen Änderung, welche mit der Ca^{2+} - Bindung/-Dissoziation an/von Skelett-Troponin C (sTnC) assoziiert ist, gefolgt von einem langsameren An- und Abschalten des sTnI. Dieser langsamere Prozess limitiert die Rate der Aktivierung/Inaktivierung des dünnen Filaments. Die Inkorporation des sTn in das Sarkomer führt zu einer starken Verminderung der Sensitivität des sTn für Ca^{2+} welche v.a. darauf zurückzuführen ist, dass die Inkorporation die OFF-Rate erhöht. Darüber hinaus zeigt der indirekte Vergleich der OFF-Rate mit der myofibrillaren Relaxationskinetik, welche in einem anderen Versuchsaufbau gemessen wurde, dass die intrinsischen kinetischen Eigenschaften des sTnI möglicherweise einen ratenlimitierenden Einfluss auf die Relaxationsgeschwindigkeit ausüben könnten.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wird die Entwicklung einer neuen Methode beschrieben, deren Ziel es ist, den Effekt Kraft-erzeugender Querbrücken auf die Ausschaltungskinetik von sTn festzustellen. IAF-markiertes sTn (sTn^{IAF}) wurde in gehäutete, isometrische, kontrahierende Kaninchen Psoas-Fasern inkorporiert, welche mit dem aktivierbaren Ca²⁺-Chelatbildner Diazo-2 beladen wurden. Durch die UV-induzierte Aktivierung des Ca²⁺-Chelatbildners, wird innerhalb von 3 ms ein plötzlicher Abfall der [Ca²⁺] in der Faser erzeugt. Dadurch kann zum ersten Mal die Abschaltkinetik des sTn^{IAF} simultan mit dem Kraftabfall während der Muskelrelaxation gemessen werden.

Die vorläufigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die in den krafterzeugenden Muskelfasern gemessene Abschaltkinetik des sTn, 1. ähnlich zu der in den lastfrei kontrahierenden Myofibrillen in Stopped-Flow-Experiment gemessenen Abschaltkinetik des sTn ist, und 2. nur unwesentlich schneller als die Kinetik des Kraftabfalls selbst ist. Diese Befunde lassen vermuten, dass 1. kraft-generierende Querbrücken kein starkes positives Feedback auf sTn erzeugen, und 2. die Abschaltkinetik einen raten-limitierenden Einfluss auf die Relaxationsrate des sTn hat. Letzteres würde auch bedeuten, dass das Prinzip der Raten-Modulation der Kontraktionsrate gestreifter Muskeln nicht für den Fall der Relaxationsrate des schnellen Skelettmuskels zutrifft.

Abstract

In the first part of this thesis, the kinetics of Ca^{2+} -controlled conformational change of skeletal troponin I (sTnI) labelled at Cys133 with IAF (5-iodoacetamidofluorescein) were analysed using the stopped-flow technique for the isolated heterotrimeric skeletal troponin complex (sTn) and for sTn incorporated into rabbit psoas myofibrils. Isolated and incorporated sTn exhibited biphasic Ca^{2+} -activation kinetics. Whereas the fast phase ($k_{\text{obs}(\text{fast})}^{+\text{Ca}} \gg 1000 \text{ s}^{-1}$) had not been reported for sTn in the sarcomere, the $[\text{Ca}^{2+}]$ -dependent kinetics of the slower phase $k_{\text{obs}(\text{slow})}^{+\text{Ca}}$ resembled the monophasic kinetics of sTnI reported previously for sTn incorporated in skinned psoas muscle fibers (Brenner & Chalovich, Biophys J 1999 77:2692-708). The obtained biphasic kinetics can be modelled by two sequential conformational changes of sTnI, a fast change associated with Ca^{2+} -binding/dissociation to/from skeletal troponin C (sTnC) followed by slower switch-on/off of sTnI that rate-limits the thin filament activation/inactivation process. Sarcomeric incorporation dramatically lowered the Ca^{2+} -sensitivity of the structural changes of sTnI by increasing the off-rate. Furthermore, comparison of the off-rate with the myofibrillar force relaxation kinetics measured in a mechanical setup indicates that intrinsic kinetic properties of sTnI might contribute in rate-limiting fast skeletal muscle relaxation.

In the second part of the thesis, a new method is developed in order to assess the effect of strong-binding, force-generating cross-bridges on sTn switch-off kinetics. IAF-labelled sTn (sTn^{IAF}) was incorporated in isometric contracting rabbit psoas skinned fibers. sTn^{IAF} switch-off kinetics can be for first time measured in parallel with force relaxation kinetics by UV-induced photolysis of the Ca^{2+} -chelator Diazo-2 which generates sudden (no longer than 3 ms) non diffusion limited decreases of $[\text{Ca}^{2+}]$. Preliminary results suggest that sTn switch-off kinetics are similar after the highly loaded isometric contraction of a muscle fiber as after unloaded contraction of myofibrils in the stopped-flow assay and that the sTn switch-off kinetics are slightly faster than cross-bridges detachment kinetics. Thus, the rate modulation principle of striated muscle force regulation does not seem to apply to the specific

case of force relaxation in skeletal muscle while cross-bridges would not exert a positive feedback on sTn.