

Diss. ETH Nr. 6754

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE  
BEDEUTUNG DER M-LINIENREGION-PROTEINKOMPONENTEN  
FÜR DEN AUFBAU DER QUERGESTREIFTEN MUSKULATUR

Abhandlung

zur Erlangung des Titels eines

Doktors der Naturwissenschaften der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

STREHLER Ernst Emanuel

Dipl. Natw. ETH

geboren am 17. Juni 1954

von Uster (Kt. Zürich)

Prof. Dr. H.M. EPPENBERGER, Referent

Prof. Dr. E. CARAFOLI, Korreferent

1981

Meinen Eltern  
und  
Marie-Antoinette  
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zellbiologie der ETH Zürich unter der Leitung von Prof. Dr. H.M. Eppenberger durchgeführt. Ihm bin ich zu besonderem Dank verpflichtet; seine Unterstützung und sein ständiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit waren von unschätzbarem Wert.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. E. Carafoli für die Uebernahme des Korreferates, Dr. G. Pelloni-Müller und Dr. C.W. Heizmann für ihre Hilfsbereitschaft während den ersten beiden Jahren meines Doktorates sowie allen anderen Mitarbeitern des Institutes für die vielen wertvollen Diskussionen und Anregungen.

Meiner lieben Marie-Antoinette gehört mein besonderer Dank für ihren grossen Einsatz bei der Reinschrift dieser Arbeit.

## INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	8
ABSTRACT	10
ABKÜRZUNGEN	12
EINLEITUNG	14
1. TEIL: "MYOMESIN": EIN STRUKTURPROTEIN DER M-LINIENREGION VON SKELETT- UND HERZ- MUSKELN AUS DEM HUHN	20
1.1. MATERIAL	20
1.1.1. Chemikalien	20
1.1.2. Apparate und Materialien	21
1.1.3. Tiere	22
1.2. METHODEN	23
1.2.1. Lösungen	23
1.2.2. Reinigung der Proteine	24
1.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentrationen	24
1.2.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
1.2.5. Partielle Proteaseverdauung und Peptidanalyse	25
1.2.6. Präparation der Antikörper	26
1.2.7. Reinigung der Antikörper	27
1.2.8. Herstellung der Fab-Fragmente der IgG	28

1.2.9.	Doppelimmundiffusion	29
1.2.10.	Immunreplika-Technik	29
1.2.11.	Herstellung von Gefrierschnitten	30
1.2.12.	Präparation von Myofibrillen	31
1.2.13.	Extraktion von Myofibrillen	32
1.2.14.	Inkubation von Myofibrillen mit Antikörpern	32
1.2.15.	Indirekte Immunfluoreszenz-Technik	33
1.2.16.	Präparation von "glyzerinisierten" Muskelfaserbündeln	34
1.2.17.	Extraktion von Muskelfaserbündeln	35
1.2.18.	Inkubation von Muskelfaserbündeln mit Antikörpern	35
1.2.19.	Elektronenmikroskopie	36
1.3.	RESULTATE	38
1.3.1.	Reinigung von Myomesin, Mitreinigung von "165K-7S-Protein" und Phosphorylase <u>b</u>	38
1.3.2.	Charakterisierung der Antikörper gegen Myomesin und gegen "165K-7S-Protein"	43
1.3.3.	Lokalisierung von Myomesin in Skelett- und Herzmuskelmyofibrillen aus dem Huhn	45
1.3.4.	Extrahierbarkeit von Myomesin aus Skelett- und Herzmuskelmyofibrillen in Puffern verschiedener Ionenstärke	51
1.3.5.	Ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in Brustmuskelmyofibrillen, die in einem Puffer niedriger Ionenstärke extrahiert worden sind	55
1.3.6.	Inkubation von Skelett- und Herzmuskelmyofibrillen mit monovalenten Antikörpern gegen Myomesin	57
1.3.7.	Bindung von Antikörpern gegen Myomesin an Brustmuskelmyofibrillen, deren MM-CK extrahiert worden ist	60

1.3.8.	Sequentielle Inkubationen von Brustmuskelmyofibrillen mit monovalenten Antikörpern gegen MM-CK und gegen Myomesin	62
1.4.	DISKUSSION	67
1.4.1.	Myomesin ist ein Strukturprotein der M-Linienregion von quergestreiften Muskeln	67
1.4.2.	Die M-Linienregion von Hühner-Skelettmuskelmyofibrillen	73
1.4.3.	Die M-Linienregion von Hühner-Herzmuskelmyofibrillen	81
1.4.4.	Funktion der M-Linie	84
2.	TEIL: "MYOMESIN": EIN HOCHSPEZIFISCHER "MARKER" FÜR DIE ENTWICKLUNG QUERGESTREIFTER MUSKULATUR	90
2.1.	MATERIAL	90
2.1.1.	Chemikalien	90
2.1.2.	Apparate und Materialien	91
2.1.3.	Tiere	91
2.2.	METHODEN	92
2.2.1.	Herstellung von Gewebe-Extrakten	92
2.2.2.	Zellkulturen	92
2.2.3.	Indirekte Immunfluoreszenz-Technik an Zellkulturen	93
2.2.4.	Elektronenmikroskopie an Zellkulturen	94
2.2.5.	Bestimmung der Syntheserate von Myomesin in kultivierten Zellen	95
2.2.6.	Uebrige Methoden	96

2.3.	RESULTATE	98
2.3.1.	Gewebe-Spezifität von Myomesin	98
2.3.2.	Auftreten von Myomesin während der Terminal- differenzierung myogener Zellen <u>in vitro</u>	102
2.3.3.	Ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in terminaldifferenzierenden myogenen Zellen	108
2.4.	DISKUSSION	113
2.4.1.	Spezies-, Gewebe- und Organellen-Spezifität der M-Linienproteine	113
2.4.2.	Auftreten der M-Linienregion-Proteinkomponen- ten während der Myogenese	119
2.4.3.	Bedeutung der M-Linienregion-Proteinkomponen- ten für den Aufbau von Myofibrillen	122
	LITERATURVERZEICHNIS	128
	PUBLIKATIONSLISTE	150
	LEBENS LAUF	153

## ZUSAMMENFASSUNG

Das  $M_r$  165.000 M-Protein, von nun an MYOMESIN genannt, wurde aus Hühner-Brustmuskeln gereinigt. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Myomesin konnte dieses Protein in der M-Linienregion von Hühner-Skelettmuskelmyofibrillen, aber auch in der H-Zone von Hühner-Herzmuskelmyofibrillen - denen eine elektronendichte M-Linie fehlt - lokalisiert werden.

Extraktionsversuche mit Puffern verschiedener Ionenstärke zeigten, dass Myomesin nur unter Bedingungen quantitativ extrahiert werden kann, bei denen das gesamte A-Bandenmaterial von Myofibrillen (d.h. die Myosinfilamente) herausgelöst wird. Im Gegensatz zur MM-Kreatinkinase - dem zweiten bisher bekannten Skelettmuskel-M-Linienprotein -, die durch die Fab-Fragmente von anti-MM-Kreatinkinase-Antikörpern vollständig aus den Myofibrillen herausgelöst werden kann, konnte Myomesin durch die Fab-Fragmente der anti-Myomesin-Antikörper nicht quantitativ extrahiert werden. Auch wenn die MM-Kreatinkinase zuerst aus Skelettmuskelmyofibrillen entfernt wurde, was mit dem Verschwinden der elektronendichten M-Linie einherging, blieb Myomesin - wenn auch weniger stark - immer noch an die M-Linienregion gebunden.

Diese Resultate zeigen, dass Myomesin eine integrale Proteinkomponente der M-Linienregion von adulten Skelett- und Herzmuskelmyofibrillen darstellt.

Ausser in Skelett- und Herzmuskeln konnte Myomesin nur noch im Thymus (der myogene Zellen vom Skelettmuskeltyp enthält) nachgewiesen werden, nicht aber in glatten Muskeln oder in irgendwelchen anderen Geweben.

Während der Terminaldifferenzierung von myogenen Zellen in vitro trat Myomesin gleichzeitig mit den meisten anderen muskelspezifischen Proteinen auf; schon in sehr "jungen" Myofibrillen, die erst



aus wenigen parallel nebeneinanderliegenden Myofilamenten bestanden, konnte Myomesin in der entstehenden H-Zone lokalisiert werden. In sich noch teilenden myogenen Zellen oder in Zellen, deren Terminaldifferenzierung unterdrückt wurde, konnte kein Myomesin nachgewiesen werden.

Myomesin stellt somit ein myofibrilläres Protein dar, das sich hervorragend als "Marker" der Terminaldifferenzierung von myogenen Zellen eignet und dessen Funktion im Zusammenbau und/oder Zusammenhalt der Myofibrillen quergestreifter Muskulatur liegen könnte.

## ABSTRACT

The  $M_r$  165,000 M-protein, hereinafter called MYOMESIN, was purified from chicken breast muscle. Rabbit antibodies against chicken myomesin were used to show that this protein is localized within the M-line region of skeletal myofibrils as well as within the H-zone of chicken heart myofibrils lacking an electron-dense M-line.

Quantitative extraction of myomesin from myofibrils could only be achieved under high ionic strength conditions which solubilize the whole A-band material (i.e. the myosin filaments), but not in low ionic strength buffers reported to specifically extract M-line material. While Fab-fragments of antibodies against MM-creatine kinase cause the specific release of this protein and the concomitant disappearance of the electron-dense M-line from skeletal muscle myofibrils, monovalent antibodies against myomesin could not release myomesin quantitatively from either breast or heart myofibrils, but remained bound to the myofibrillar structure. Even when MM-creatine kinase was first removed from skeletal muscle myofibrils, myomesin was still bound, though more weakly, to the M-line region of these myofibrils.

These results indicate that myomesin represents a structural protein component of the M-line region of skeletal and heart myofibrils.

Besides skeletal and heart muscle only thymus (known to contain myogenic cells of the skeletal muscle type) was found to contain myomesin. No myomesin was, however, detected in smooth muscle or any other tissue tested.

During terminal differentiation of myogenic cells in vitro myomesin was first detected in elongated myoblasts; its synthesis rose sharply at the time when most of the major myofibrillar proteins were accumulated. In small myotubes myomesin was shown to be bound

to the forming H-zone of nascent myofibrils consisting of only few aligned myofilaments. No significant amounts of myomesin were, however, detected in dividing presumptive myoblasts or in cells prevented from undergoing normal terminal differentiation.

Myomesin thus represents a myofibrillar protein exceptionally well-suited for the study of muscle cell differentiation. The data suggest that it plays an important role in the assembly and/or maintenance of cross-striated muscle myofibrils.

## ABKÜRZUNGEN

5'-AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
Ara-C	1- $\beta$ -D-Arabinofuranosyl-Cytosin
ATP	Adenosintriphosphat
BB-CK	Kreatinkinase-Dimer bestehend aus zwei B-Untereinheiten
BrdUrd	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DNS	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Aethylenglykol-bis-(2-Aminoäthyläther)N,N'-Tetraessigsäure
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HMM	Heavy Meromyosin
IgG	Immunglobulin G
LMM	Light Meromyosin
MEM	Minimal Essential Medium
MM-CK	Kreatinkinase-Dimer bestehend aus zwei M-Untereinheiten
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
S1, S2	Subfragmente 1 und 2 des Myosinmoleküls
SDS	Natriumdodecylsulfat

TCA Trichloressigsäure

Tris Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan

## EINLEITUNG

Die Grobstruktur der Myofibrillen, der kontraktilen Organelle der quergestreiften Muskulatur, ist schon lange bekannt. Neben der anisotropen (A-) Bande und der durch die Z-Linie unterbrochenen isotropen (I-) Bande beobachtete man schon vor mehr als 100 Jahren eine Struktur in der Mitte der A-Bande, die sich in ihrer Lichttransmission von anderen Stellen der A-Bande unterschied. Diese Struktur wurde als M-Linie bezeichnet, da sie sich jeweils in der Mitte einer kontraktionsfähigen Einheit (Sarkomer) der Myofibrille befindet.

Mit dem Aufkommen der Elektronenmikroskopie konnte die Anwesenheit einer elektronendichteren "Struktur" in der Mitte der A-Bande bestätigt werden (40), ebenso konnte klar gezeigt werden, dass die dicken Myofilamente, die zur Hauptsache aus Myosin bestehen (43), die ganze A-Bande und damit auch die gesamte M-Linienregion durchziehen (20). In der Folge wurde vor allem der Aufbau dieser dicken Myosinfilamente genauer untersucht.

Der Hauptbestandteil dieser Filamente, Myosin, wurde als etwa 150 nm langes, stäbchenförmiges Molekül mit einer globulären Region an einem Ende beschrieben (56, 108, 146). Letztere konnte später in zwei globuläre Untereinheiten (Subfragmente S1) von je ca. 7 nm Durchmesser aufgelöst werden (118). Die von Gergely (39) begonnenen Studien an proteolytischen Fragmenten von Myosin zeigten, dass dieses Molekül als aus drei verschiedenen funktionellen Einheiten bestehendes Protein aufgefasst werden kann. Myosin S1 besitzt ATPase Aktivität (92) und interagiert mit Aktin (91). Der hinterste Teil des Myosinstäbchens (LMM) ermöglicht die Aggregation der Myosinmoleküle zu Filamenten (126). S2 schliesslich, das zusammen mit LMM den stäbchenförmigen Teil des Myosinmoleküls ausmacht, bildet ein mechanisches Verbindungsstück zwischen LMM und S1 (57, 99).

Eingehende biochemische und ultrastrukturelle Studien an den dicken Myosinfilamenten führten zur Erkenntnis, dass die Myosinmoleküle in diesen Filamenten in einer bipolaren Anordnung aggregiert sind, so dass in der Mitte eine 150 - 200 nm lange Ueberlappungszone der stäbchenförmigen Teile der Myosinmoleküle entsteht (56). Durch die parallele Aneinanderlagerung vieler Myosinfilamente entsteht die myofibrilläre A-Bande; in ihrer Mitte bilden die zentralen Ueberlappungszonen der Myosinfilamente die optisch weniger dichte H-Zone. Die M-Linienstruktur, die ihrerseits in der Mitte der H-Zone senkrecht zu den Myosinfilamenten verläuft, enthält somit nur die stäbchenförmigen LMM-Teile der Myosinfilamente.

Bis vor wenigen Jahren waren weitere Details des Aufbaus der M-Linie einer genaueren Untersuchung unzugänglich. Erst mit der Weiterentwicklung der Elektronenmikroskopie bzw. der Verbesserung der Präparationstechniken konnten neue Einblicke in die Ultrastruktur der M-Linie bzw. der ganzen M-Linienregion gewonnen werden.

Die eingehende Analyse von äusserst dünnen Längs- und Querschnitten durch konventionell präparierte Muskeln sowie durch Muskeln, die im unfixierten Zustand bei tiefen Temperaturen eingefroren worden waren, zeigten, dass die M-Linienregion, insbesondere die M-Linie selbst, eine komplexe Substruktur aus mehreren Komponenten aufweist (38, 58, 67, 76, 96, 99, 100, 116, 117, 121, 128). Aufgrund dieser Studien beschrieben Knappeis & Carlsen (67) und Luther & Squire (76) Modelle für den ultrastrukturellen Aufbau der M-Linie.

Gleichzeitig mit den ultrastrukturellen Untersuchungen wurden vermehrt auch biochemische Versuche durchgeführt, um die Proteine, welche die M-Linienstruktur aufbauen, zu isolieren und zu charakterisieren. Die Extraktion von M-Linienproteinen aus den Myofibrillen wurde dabei auf zwei grundsätzlich verschiedenen Wegen angegangen. Durch die Inkubation von zerkleinertem Muskelgewebe in Puffern niedriger Ionenstärke (z.B. 5 mM Tris-HCl, pH 7,7) konnte die elek-

tronendichte M-Linie schon in weniger als 1 Std. praktisch vollständig aus den Myofibrillen entfernt werden (11, 12, 69, 104, 110, 123). Solchermassen extrahierte Myofibrillen zeigten - mit Ausnahme einer gewissen "Aufblähung" in der Mitte der A-Bande - eine weitgehend intakte Sarkomerstruktur. Auf der anderen Seite führte die Inkubation von Myofibrillen in Puffern hoher Ionenstärke (Puffer, die z.B. 0,6 M KCl enthalten) zu einer fast völligen "Auflösung" des gesamten A-Bandenmaterials (59), weshalb auch solche Hochsalzextrakte als Ausgangsmaterial für die Isolierung von M-Linienproteinen verwendet wurden (85, 133).

Eine der Hauptschwierigkeiten bei der Suche nach M-Linienproteinen besteht darin, dass es keine biologische Nachweismethode für diese Komponenten gibt. Als einzige Kriterien müssen deshalb ultrastrukturelle und/oder immunologische (Immunfluoreszenz-) Daten verwendet werden. Die Isolierung von M-Linienproteinen wird weiter erschwert durch die Tatsache, dass diese Proteine nur einen kleinen Bruchteil (höchstens 2 - 3 % der Masse der Myosinfilamente (56)) der gesamten myofibrillären Proteine ausmachen.

Nachdem anfänglich nur angereichertes M-Linienmaterial aus Niedrigsalzextrakten, aber kaum gereinigte Einzelproteine für M-Linien-Rekonstitutionsversuche und Immunfluoreszenzstudien zur Verfügung standen (11, 69, 110, 123) - wodurch die Interpretationsmöglichkeiten stark eingeschränkt wurden - führten verbesserte biochemische Proteinreinigungsmethoden zur Identifikation von mehreren Proteinen, welche als M-Linienkomponenten in Frage kamen (21, 31, 32, 71, 83-85, 89, 97). Diese Proteine wiesen Untereinheitsmolekulargewichte von ca. 40.000, 100.000 und 160.000 - 170.000 Dalton auf.

Die Schwierigkeit, monospezifische Antikörper gegen ein einzelnes Protein zu erhalten, sowie die Tatsache, dass einige Proteine mehr oder weniger stark an gewisse Regionen der Myofibrille (z.B. auch an die M-Linienregion) binden können, ohne eigentliche Strukturkomponenten der entsprechenden Region zu sein, führte allerdings zu einigen Unsicherheiten bei der eindeutigen Zuordnung der Proteine



zur M-Linienstruktur. Das M-Linienprotein mit dem Untereinheitsmolekulargewicht von ca. 40.000 Dalton, das im nativen Zustand als Dimer vorliegt (89), konnte eindeutig als MM-Kreatinkinase identifiziert werden (137). Aufgrund vieler weiterer detaillierter Studien des Zusammenhangs zwischen MM-CK und der Myofibrillenstruktur kann heute mit einiger Sicherheit angenommen werden, dass ein kleiner Teil (ca. 5 %) der muskulären CK spezifisch an die M-Linienstruktur gebunden ist (137, 140, 142, 143). Demgegenüber müssen zwei weitere Proteine, die ursprünglich der M-Linie zugeschrieben wurden und die später als Phosphorylase b (46, 47, 84, 130, 131, 133) und als "glycogen debranching enzyme" (48, 133) identifiziert werden konnten, aufgrund genauer Antikörperlokalisierungsstudien als "echte" M-Linienstrukturproteine ausgeschlossen werden (45, 47, 48, 133). Ausser MM-CK kommt zurzeit nur noch ein einziges weiteres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 165.000 Dalton als eigentliches Strukturprotein der M-Linienregion in Frage (71, 78, 84, 133). Eine genaue Untersuchung des Zusammenhangs zwischen diesem Protein, das wegen seiner Lokalisierung in der Mitte der Sarkomere von nun an MYOMESIN \* genannt wird, und der Struktur der M-Linie bzw. der M-Linienregion bildet den ersten Teil der vorliegenden Arbeit.

Die Bedeutung der M-Linienstruktur für den Aufbau der Myofibrille ist noch unklar (was auch für das Fehlen eines biologischen Nachweises für M-Linien-spezifische Proteine verantwortlich ist!). Aufgrund der neueren Daten über die Ultrastruktur der M-Linienregion (67, 76, 116, 117, 128) wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese komplexe Struktur für das Zustandekommen der Anordnung der Myosinfilamente in der Mitte der A-Bande sowie für die Aufrechterhaltung dieser Ordnung während des Kontraktions-/Relaxationszyklus verantwortlich sein könnte (67, 99). Andererseits ist die Beschaffenheit der M-Linienstruktur offenbar charakteristisch für jede Spe-

\* Aus dem Griechischen: *μυων μεση*

zies sowie für den Muskel- und den Fasertyp (116, 117). Es gibt sogar quergestreifte Muskeln - wie zum Beispiel die Hühner-Herzmuskulatur - die überhaupt keine elektronendichte M-Linie aufweisen (120, 141), deren Myosinfilamente jedoch in der typischen, streng parallelen Anordnung in der A-Bande der Sarkomere nebeneinanderliegen.

Die Synthese und Akkumulation der (mengenmässig) wichtigsten myofibrillären Proteine während der Entwicklung von Skelett- und Herzmuskelzellen in vivo und in vitro sowie die zeitliche Sequenz des Einbaus dieser Proteine in Myofibrillen wurde schon von manchen Autoren recht eingehend untersucht (2, 16, 17, 31, 34, 36, 37, 44, 51, 55, 63, 65, 82, 93, 111, 113, 139). Ueber den genauen Ablauf der Myofibrillogenese bestehen allerdings kontroverse Meinungen (2, 26, 37, 44, 65, 86, 90, 109, 138, 145). Aufgrund ultrastruktureller Daten gelangten manche Autoren zur Ueberzeugung, dass die Z-Linie (bzw. Z-Linienmaterial) und nicht die M-Linie den Ausgangspunkt für die Entstehung von gut organisierten Myofibrillen bildet (44, 65, 139). In der Tat tritt eine sichtbare elektronendichte M-Linie - verglichen mit der Z-Linie - während der Myofibrillogenese erst relativ spät auf (44, 65).

Wenn die Proteine der M-Linienstruktur - oder wenigstens einige von ihnen - wirklich für den "korrekten" Aufbau der quergestreiften Myofibrillen mitverantwortlich sein sollen, so müssten sie während der Entstehung der Myofibrillen in sich entwickelnden Muskeln schon in einem sehr frühen Stadium verfügbar sein.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird deshalb versucht, das Auftreten von Myomesin im Zusammenhang mit der Myofibrillogenese in embryonalen, myogenen Zellen während der Terminaldifferenzierung in vitro zu verfolgen. Ein besseres Verständnis der bei der Entstehung von funktionsfähigen, quergestreiften Myofibrillen beteiligten möglichen "Organisatorproteine" ist nicht nur von theoretischem Interesse, sondern könnte auch dazu beitragen, gewisse Formen

von abnormaler Muskelentwicklung genauer kennenzulernen. So wurde z.B. bei der Untersuchung der in vitro Myogenese von embryonalen Brustmuskelzellen von Hühnern mit einer vererblichen, rezessiv autosomalen Muskeldystrophie festgestellt, dass die Myosinfilamente in diesen Zellen - verglichen mit denjenigen in normalen Zellen - erst bedeutend später auftreten (1). Die gebildeten Myofibrillen zeigen keine elektronendichte M-Linie, und die Myofilamente innerhalb der Sarkomere sind nur lose organisiert (1).

1. TEIL:  
"MYOMESIN": EIN STRUKTURPROTEIN DER M-LINIENREGION  
VON SKELETT- UND HERZMUSKELN AUS DEM HUHN

---

1.1. MATERIAL

1.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Serva
Adenosin-5'-Monophosphat-Sepharose 4B	Pharmacia
Aethylenglykol-bis-(2-Aminoäthyläther) N,N'-Tetraessigsäure	Sigma
Agar noble	Difco
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Pharmacia
Coomassie Brilliant Blue	Serva
Diäthylaminoäthyl-Zellulose DE-52	Whatman
Dithiothreitol	Sigma
Fluorescein-gekoppeltes Ziegen-anti- Kaninchen-Immunglobulin G	Cappel
Formvar	Balzers
Freunds Adjuvans	Calbiochem
Glutaraldehyd	TAAB
Harnstoff	Schwarz/Mann
Iodacetamid	Serva
N,N'-Methylenbisacrylamid	Eastman-Kodak
Natriumdodecylsulfat	BDH
Osmiumtetroxid	Johnson Matthey Chemicals

Papain	Worthington
Pepstatin	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid	Serva
Readyagarose Typ BW	Readysysteme AG
Rinderserumalbumin	Sigma
Sephadex G-25	Pharmacia
Staphylococcus aureus V8-Protease	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin	Serva
Thimerosal	Sigma
Tissue-Tek II O.C.T. Compound	Miles
Trasylol	Bayer
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Serva

Alle übrigen Chemikalien waren von den Firmen Merck oder Fluka, Qualität p.a.

#### 1.1.2. Apparate und Materialien

Elektronenmikroskop	Siemens Elmi- skop 102
Fotomaterial	Agfa, Ilford
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Standard Model B
Fraktionenkollektoren	ISCO, LKB
Gefriermikrotom	American Optical
Glasmesserbrecher	LKB Knifemaker
Spektrophotometer	Hitachi Perkin Elmer

Trägernetzchen für Ultradünnschnitte

Balzers

Ultramikrotom

LKB Ultratome  
4801 A

**1.1.3. Tiere**

Hühner

Kneuss, Mägen-  
wil/AG

Hasen-Kaninchen

Dr. Rossbach,  
Füllinsdorf/BL

## 1.2. METHODEN

### 1.2.1. Lösungen

- Waschlösung ("Relaxierpuffer"):  
0,1 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7.
- Puffer mit niedriger Ionenstärke ("Niedrigsalzpuffer"):  
5 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 7,7.
- Puffer mit hoher Ionenstärke ("Hochsalzpuffer"):  
0,6 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 0,3 mM DTT, 0,1 M K-Phosphatpuffer, pH 6,4.
- Puffer A:  
0,6 M KCl, 1 mM EDTA, 0,3 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 μM Pepstatin, 0,05 M K-Phosphatpuffer, pH 6,9.
- Puffer B:  
1 mM EDTA, 0,3 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 μM Pepstatin, 0,01 M K-Phosphatpuffer, pH 6,9.
- Puffer C:  
50 mM Tris-HCl, 0,3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 1 μM Pepstatin, pH 7,9.
- PBS:  
0,15 M NaCl, 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,2.
- Plastik-Stocklösung:  
62 ml Epon 812 (Epicote 812), 81 ml Araldit (Fluka A/M), 7 ml Weichmacher (Dibutylphthalat, Fluka D).
- Plastik-Gebrauchslösung:  
1 Teil Plastik-Stocklösung, 1 Teil Epon Härter (2-Dodecyl-Bernsteinsäureanhydrid), 24 Tropfen Epon Beschleuniger (2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-Phenol) pro 10 ml Plastik-Stocklösung/Epon Härter.

### 1.2.2. Reinigung der Proteine

Die Isolierung und Reinigung von Myomesin, "165K-7S-Protein" ("glycogen debranching enzyme") und von Glykogen-Phosphorylase b aus Hühner-Brustmuskeln wird im Resultatteil (1.3.1.) genau beschrieben.

Hühner-"glycogen debranching enzyme", gereinigt nach einer anderen Methode (48), wurde von Dr. C. Heizmann zur Verfügung gestellt.

### 1.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Für die ungefähre Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die Biuret-Absorptionsmethode (74) verwendet. Die Konzentrationen der gereinigten Proteine konnten aus den Absorptionskoeffizienten  $A_{280\text{nm}}^{1\%}$  genau berechnet werden;  $A_{280\text{nm}}^{1\%}$  beträgt für Myomesin 12,2 (133), für "debranching enzyme" 17,8 (48) und für Phosphorylase b 13,2 (47).

### 1.2.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

1,5 mm dicke Polyacrylamid-Plattengele ("slab"-Gele) in Gegenwart von 0,1 % SDS wurden nach Lämmli (70) hergestellt. Die Polyacrylamidkonzentration der Konzentrierungsgele betrug 3,75 %, diejenige der Trenngele je nach Art der aufzutrennenden Proteine 5, 8, 10 oder 12,5 %. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 20 - 25 mA durchgeführt. Die Färbung der Gele erfolgte in 0,25 % (w/v) CBB, 10 % (v/v) TCA, 25 % (v/v) Isopropanol; die Entfärbung in 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure.



#### 1.2.5. Partielle Proteaseverdauung und Peptidanalyse

Zur limitierten Proteolyse von Proteinen in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen und der anschließenden Peptidanalyse wurde nach der Methode von Cleveland et al. (10) vorgegangen:

Mit einer Rasierklinge wurden die interessierenden Proteinbanden aus einem SDS-Polyacrylamidgel, das nach der Elektrophorese nur während ca. 20 Min. gefärbt und während ca. 30 Min. entfärbt worden war, herausgestanzt und in 0,125 M Tris-HCl, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 6,8 während ca. 30 Min. gewaschen. In diesem Puffer konnten die Gelstücklein bei -20 °C aufbewahrt werden.

Die Proteaseverdauung erfolgte in einem 12,5 %- oder 15 %-Polyacrylamid-SDS-Gel. Pro Probenbahn wurden 3 - 5 Gelstücklein (alle das gleiche Protein enthaltend) auf das Konzentrierungsgel aufgeladen. Der freigebliebene Raum um die Gelstücklein wurde mit 10 - 20  $\mu$ l 0,125 M Tris-HCl, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, 20 % Glyzerin, pH 6,8 aufgefüllt. 10  $\mu$ l Proteaselösung (verschiedene Konzentrationen von Staphylococcus aureus V8-Protease in 0,125 M Tris-HCl, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, 10 % Glyzerin, pH 6,8) wurden nun pro Probenbahn aufgetragen und die Elektrophorese bei 10 mA konstanter Stromstärke gestartet. Kurz bevor die Front das Ende des Konzentrierungsgels erreichte, wurde die Elektrophorese für 30 - 60 Min. gestoppt. Während dieser Zeit und während des Durchlaufens der Proteine durch das Konzentrierungsgel erfolgte die Proteolyse. Danach wurde die Elektrophorese wie unter 1.2.4. beschrieben zu Ende geführt.

Die aufgetrennten Peptide wurden zunächst mit CBB angefärbt; zur Erhöhung der Sensitivität des Protein-Nachweises wurde zusätzlich die Silberfärbungsmethode von Merril et al. angewendet.

#### 1.2.6. Präparation der Antikörper

Kaninchen-Antiserum gegen Hühner-MM-CK wurde von Dr. M. Caravatti zur Verfügung gestellt.

Kaninchen-Antiserum gegen Hühner-Brustmuskelyomesin: Eine Lösung von 0,3 mg Myomesin in 1,5 ml Puffer C wurde mit 1,5 ml komplettem Freund's Adjuvans emulgiert. Die Hälfte der Emulsion wurde subkutan in den Rücken, die andere Hälfte intramuskulär in den Oberschenkel eines Kaninchens eingespritzt. Weitere Injektionen erfolgten eine, zwei und fünf Wochen nach der ersten Immunisierung. Im Unterschied zur ersten wurde bei allen folgenden Injektionen inkomplettes Freund's Adjuvans zur Emulgierung der Myomesinlösung verwendet. Nach diesem Schema wurden drei Kaninchen immunisiert. Sechs bis zehn Wochen nach der ersten Injektion wurden die Kaninchen durch Öffnen der Carotis ausgeblutet. Das Blut wurde eine Stunde bei Zimmertemperatur und dann ca. 12 Stunden bei 4 °C zur Gerinnung stehen gelassen. Der Blutkuchen wurde während 10 Min. bei 3.000 x g abzentrifugiert und das Serum bei -20 °C aufbewahrt.

Kaninchen-Antiserum gegen Hühner-Brustmuskel-"165K-7S-Protein": Die Immunisierung erfolgte nach dem für die Immunisierung mit Myomesin beschriebenen Schema. Als Antigen wurde eine Lösung von 0,3 mg "165K-7S-Protein" in 0,5 ml Puffer C und 1,5 ml PBS verwendet.

Kontrollserum (Präimmunserum) wurde von allen Kaninchen durch Entnahme einer Blutprobe vor der ersten Immunisierung gewonnen.

### 1.2.7. Reinigung der Antikörper

Die IgG-Fractionen der Kontrollseren wurden durch Ammoniumsulfatfällung und DEAE-Zellulose-Chromatographie (119, 122) hergestellt.

Antigen-affinitätschromatographisch gereinigte anti-MM-CK-IgG (102) wurden freundlicherweise von Dr. M. Caravatti zur Verfügung gestellt.

Die anti-Myomesin-IgG-Fraktion wurde nach der gleichen Methode (102) durch Antigen-Affinitätschromatographie gewonnen:

Herstellung der Affinitätsmatrix (Myomesin-Sepharose 4B):

1 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde während 15 Min. in 5 ml 1 mM HCl gequollen und dann auf einer Glasfilternutsche mit ca. 200 ml 1 mM HCl gewaschen.

Zu diesem gewaschenen Gel wurden ca. 15 mg Myomesin, gelöst in 8 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl, pH 8,9) zugegeben und die Mischung während ca. 20 Std. bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Kopplung wurde die Myomesin-Sepharose auf einer Glasfilternutsche mit ca. 100 ml Kopplungspuffer gewaschen und die noch freien Bindungsstellen mit 10 ml 1 M Aethanolamin, pH 8 abgesättigt (2 Std., 4 °C). Die Myomesin-Sepharose wurde nun abwechslungsweise mit je 50 ml 1 M NaCl, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5 und 1 M NaCl, 0,1 M Acetatpuffer, pH 4 gewaschen (3 Zyklen). Zum Schluss wurde das Gel mit 100 ml PBS, 1 mM EDTA, 0,01 % Thimerosal gewaschen und in dieser Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

Herstellung der anti-Myomesin-IgG-Fraktion:

Eine angereicherte anti-Myomesin-IgG-Fraktion wurde

durch Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung über Sephadex G-25 (102, 122) erhalten.

Die angereicherte anti-Myomesin-IgG-Fraktion (erhalten aus 12 ml anti-Myomesin-Serum) wurde nun auf eine Myomesin-Sepharose-4B-Säule (0,6 x 3 cm), equilibriert in PBS, 0,1 mM EDTA, aufgezogen. Die Säule wurde zuerst mit PBS, 0,1 mM EDTA und dann mit PBS, 0,1 mM EDTA, 1 M NaCl gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte mit 1 - 2 Säulenvolumen 4 M  $MgCl_2$  oder 1 M Propionsäure. Die eluierten Proteine wurden sofort auf einer in PBS, 0,1 mM EDTA equilibrierten Sephadex-G-25-Säule entsalzt und bei -20 °C aufbewahrt.

#### 1.2.8. Herstellung der Fab-Fragmente der IgG

Zur limitierten Papainverdauung der anti-Myomesin-IgG zu Fab- und Fc-Fragmenten wurde nach Porter (105) vorgegangen:

Eine Lösung von anti-Myomesin-IgG wurde gegen 0,1 M K-Phosphatpuffer, 2,5 mM EDTA, 3 mM Azid, pH 7 dialysiert. Pro ml IgG-Lösung wurden 0,116 ml einer frisch angemachten Cystein-Stocklösung (0,1 M Cys, 2,5 mM EDTA, 0,1 M K-Phosphatpuffer, pH 7) zugegeben (Endkonzentration von Cystein: 10 mM). Die partielle Verdauung der IgG wurde nun durch Zugabe einer frisch angemachten Stocklösung (1 mg/ml) von Papain gestartet (0,5 mg Papain/100 mg IgG). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C während 8 Std. Die Verdauung wurde durch Zugabe von Iodacetamid (Endkonzentration 23 mM) gestoppt. Nach weiteren 30 Min. Inkubationszeit bei 37 °C wurde das pH der Lösung mit 0,1 n NaOH auf 7,0 eingestellt und die Fab-Präparation während 15 Std. bei 0 - 4 °C gegen einen Boratpuffer (0,15 M NaCl, 0,02 M Borsäure, pH auf 8 mit NaOH) dialy-

siert. Die Lösung wurde weitere 4 Std. bei 0 °C stehen gelassen und danach die präzipitierten Fc-Fragmente während 20 Min. bei 16.000 x g abzentrifugiert. Der Ueberstand (anti-Myomesin-Fab-Lösung) wurde gegen 0,1 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7 dialysiert. Die Fab-Fragmente wurden durch Vakuumdialyse konzentriert und bei -20 °C aufbewahrt.

#### 1.2.9. Doppelimmundiffusion

Doppelimmundiffusionstests nach Ouchterlony (95) wurden in 0,8 % (w/v) Agar noble, 25 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,5 durchgeführt. Die Diffusion der Proteine erfolgte während 24 - 48 Std. bei 4 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer. Nach der Inkubation wurden die "Ouchterlony-Platten" während ca. 3 Tagen in 0,9 % NaCl gewaschen, während 30 - 60 Min. mit Amidoschwarz (5 g Amidoschwarz, 450 g Aethanol, 100 g Essigsäure, 450 ml H<sub>2</sub>O) gefärbt und in 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

#### 1.2.10. Immunreplika-Technik

Der Nachweis von Antigenen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte mittels der Immunreplika-Technik (115). Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese direkt mit einer Antiserum enthaltenden 0,6 %igen Agaroselösung übergossen (1,2 % (w/v) Readyagarose unter Erhitzen in H<sub>2</sub>O lösen und im Wasserbad bei 50 - 56 °C halten; kurz vor dem Giessen des Immunreplika-Gels je 1 Teil Agaroselösung und 1 Teil Antiserum zusammengeben und mischen). Pro cm<sup>2</sup> Geloberfläche wurden ca. 100 µl

Antiserum enthaltende Agaroselösung benötigt. Nach dem Erstarren des Immunreplika-Gels erfolgte die Inkubation während 4 - 12 Std. bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Feuchtkammer. Das Immunreplika-Gel wurde unter leichtem Schütteln in PBS vom darunterliegenden Polyacrylamidgel losgelöst und während ca. 3 Tagen in PBS gewaschen. Die Färbung der Antigen-Antikörperpräzipitate erfolgte in 0,05 % (w/v) CBB in 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure während 3 - 5 Min.

#### 1.2.11. Herstellung von Gefrierschnitten

Aus Alufolie wurden kleine wannenförmige Gefässe (von ca. 1,5 cm Länge und ca. 0,5 cm Breite und Höhe) geformt und etwa bis zur Hälfte mit Tissue-Tek-Einbettungsmedium gefüllt.

Mit einem Skalpell wurden ca. 1 cm x 0,2 cm x 0,2 cm grosse Gewebestücke aus frischen Hühnerorganen herausgeschnitten und sofort in die mit Tissue-Tek halbgefüllten Alufoliengefässe gelegt. Die Alufolienwannen wurden mit Tissue-Tek aufgefüllt und bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Weiterverarbeitung wurde ein eingebettetes, gefrorenes Gewebestück bei -20 °C zu einem Stück von ca. 0,5 cm Kantenlänge geschnitten und auf dem Präparathalter des Gefriermikrotoms (das vorher auf -20 °C vorgekühlt worden war) mit einem Tropfen Wasser angefroren. Schnitte von 6 - 12 µm Dicke wurden auf gereinigten Deckgläsern oder Objektträgern aufgenommen und während ca. 1 Std. bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Danach wurden sie direkt für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen (1.2.15.) weiterverwendet.

### 1.2.12. Präparation von Myofibrillen

Myofibrillen aus Hühner-Brust- und Herzmuskeln wurden nach der Methode von Kundrat und Pepe (69) präpariert: Frische Brustmuskeln wurden in kalte (4 °C) Waschlösung (= "Relaxierpuffer") gelegt. Ganze Muskelfaserbündel (ca. 5 cm lang und 0,5 cm dick) wurden nun mit einem Skalpell so ausgeschnitten, dass sie noch an beiden Enden mit dem Rest des Brustmuskels verbunden waren. Mit Nylonfaden wurden die Faserbündel an einem Holzstäbchen befestigt, leicht gestreckt und erst dann ganz aus dem Brustmuskel herausgeschnitten. Die an den Holzstäbchen befestigten Faserbündel wurden in eine mit kalter Waschlösung gefüllte Petrischale gelegt und mit einer Injektionsnadel in kleine, dünne Faserbündelchen zerzupft. Die Faserbündel-Suspension wurde in einem Sorvall Omnimixer während 3 x 6 Sek. bei Stellung 6 homogenisiert, durch Nylongaze filtriert (zur Entfernung grösserer Gewebestücke) und durch wiederholtes (2 - 3 x) Zentrifugieren (10 Min. bei 1.000 x g) und Resuspendieren in Waschlösung gereinigt. Die so entstandene Myofibrillensuspension konnte bei 4 °C während 1 - 2 Tagen aufbewahrt werden.

Zur Präparation von Herzmuskelmyofibrillen wurden frische, ganze Herzen verwendet, die sofort nach der Sektion in kalte Waschlösung gelegt worden waren. Die Herzen wurden von Blutgefässen und Fett befreit und in einer mit kalter Waschlösung gefüllten Petrischale in kleine Fasern zerzupft. Die Weiterverarbeitung der entstehenden Faser-Suspension erfolgte wie bereits oben für die Präparation von Brustmuskelmyofibrillen beschrieben.

### 1.2.13. Extraktion von Myofibrillen

0,5 ml einer Suspension (ca. 20 v/w) von frisch präparierten, gut gewaschenen Myofibrillen wurde in einer Tischzentrifuge während 1 Min. zentrifugiert. Der Ueberstand wurde verworfen und die abzentrifugierten Myofibrillen in 0,5 ml der jeweiligen Extraktionslösung resuspendiert und auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Die Extraktionszeiten werden im Resultatteil bei den jeweiligen Experimenten angegeben. Nach der Extraktion wurde die Suspension erneut in der Tischzentrifuge zentrifugiert (während 1 Min. nach Extraktionen in "Niedrigsalzpuffer" und während 5 Min. nach Extraktionen in "Hochsalzpuffer"). Der Ueberstand (Extrakt) wurde entweder sofort für Doppelimmundiffusionstests oder elektrophoretische Analysen weiterverwendet oder bei -20 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Die extrahierten Myofibrillen wurden in Waschlösung resuspendiert, durch mehrmaliges Zentrifugieren/Resuspendieren gewaschen und schliesslich für weitere Extraktionen, elektrophoretische Proteinanalysen oder Antikörperinkubationen (1.2.14.) und nachfolgende Immunfluoreszenzstudien (1.2.15.) weiterverwendet.

### 1.2.14. Inkubation von Myofibrillen mit Antikörpern

Gut gewaschene Myofibrillen wurden in 0,5 ml einer Lösung von Antikörpern in Waschlösung bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Antikörperkonzentrationen und die Inkubationszeiten werden bei der Besprechung der jeweiligen Experimente im Resultatteil angegeben. Nach der Inkubation wurden die Myofibrillen abzentrifugiert und der Ueberstand in ein Reagenzglas transferiert. Die



Proteine im Ueberstand wurden durch Zugabe von 2 ml Aceton (vorgekühlt auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) präzipitiert und die Mischung während 30 Min. bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  stehengelassen. Danach wurden die ausgefällten Proteine bei  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert (15 Min. bei  $20.000 \times g$ ), in  $40\text{ }\mu\text{l}$  Lämmli-Probenpuffer (70) gelöst und für die elektrophoretische Auftrennung in Polyacrylamidgelen verwendet.

Die Myofibrillen wurden in Waschlösung resuspendiert, durch mehrmaliges Zentrifugieren/Resuspendieren gewaschen und für Immunfluoreszenzstudien (1.2.15.) verwendet.

#### 1.2.15. Indirekte Immunfluoreszenz-Technik

An Myofibrillen:

Die gut gewaschenen, mit Antikörpern inkubierten (1.2.14.) Myofibrillen wurden in einer Verdünnung (1 : 50) des sekundären Antikörpers (FITC-gekoppelte Ziegen-anti-Kaninchen-IgG) in Waschlösung suspendiert und während 1 Std. bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Myofibrillen abzentrifugiert, in Waschlösung resuspendiert und durch mehrmaliges Zentrifugieren/Resuspendieren gewaschen. Auf einen Objektträger wurde nun zuerst 1 Tropfen der Myofibrillensuspension und dann 1 Tropfen Glyzerin gegeben und das Ganze mit einem Deckglas überdeckt. Die Myofibrillen wurden im Fluoreszenzmikroskop unter Phasenkontrast und Fluoreszenzanregung angeschaut und auf Ilford HP5-Film fotografiert (Belichtungszeiten: 2,5 Sek. für Phasenkontrastaufnahmen, 30 Sek. für Fluoreszenzaufnahmen).

An Gefrierschnitten:

Luftgetrocknete Gefrierschnitte auf Deckgläsern oder

Objektträgern (1.2.11.) wurden kurz (ca. 5 Min.) in PBS gewaschen und dann während 15 - 30 Min. in einem Tropfen (80 - 100  $\mu$ l) einer Antikörperlösung (10 - 20  $\mu$ g IgG/ml PBS) inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS (ca. 15 Min.) wurden die Schnitte während 15 - 30 Min. in einem Tropfen einer Lösung von fluoreszierendem sekundärem Antikörper (1 : 50 in PBS verdünnt) inkubiert und schliesslich während ca. 30 Min. in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden in einem Tropfen Glycerin zwischen Objektträger und Deckglas eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

#### 1.2.16. Präparation von "glyzerinisierten" Muskelfaserbündeln

Das Aufziehen von frischen Brustmuskelfaserbündeln auf Holzstäbchen erfolgte wie unter 1.2.12. für die Präparation von Myofibrillen beschrieben. Die Faserbündel wurden nun bei 4 °C während ca. 24 Std. abwechselungsweise je 3 Std. in 70 % (v/v) Glycerin in Waschlösung und in Waschlösung allein inkubiert ("glyzerinisiert"), um die Zellmembranen durchlässig zu machen und das Zytoplasma auszuwaschen.

Die "glyzerinisierten" Muskelfaserbündel konnten während Monaten bei -20 °C in 70 % (v/v) Glycerin in Waschlösung aufbewahrt werden. Vor Gebrauch wurden sie auf 4 °C aufgewärmt und in Waschlösung gewaschen.

Frische, von Fett und Blutgefässen befreite Herzen wurden auf die gleiche Weise "glyzerinisiert" und aufbewahrt.

#### 1.2.17. Extraktion von Muskelfaserbündeln

Die Extraktionen wurden an "glyzerinisierten", noch an den Holzstäbchen befestigten ganzen Muskelfaserbündeln durchgeführt. Die Extraktionen in "Niedrigsalzpuffer" wurden während 24 Std., diejenigen in Lösungen von Antikörper-Fab-Fragmenten (0,1 mg Fab/ml Waschlösung) während 48 Std. bei 4 °C durchgeführt. Die extrahierten Faserbündel wurden in kalter (4 °C) Waschlösung gewaschen und, immer noch an die Holzstäbchen gebunden, während 5 Min. in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in Waschlösung vorfixiert. Mit einer Injektionsnadel wurden die Faserbündel nun wie bei der Präparation von Myofibrillen beschrieben (1.2.12.) in dünne Fäserchen zerzupft. Diese Muskelfäserchen wurden für die Inkubation mit Antikörpern (1.2.18.) verwendet oder direkt für die Elektronenmikroskopie (1.2.19.) weiterverarbeitet.

#### 1.2.18. Inkubation von Muskelfaserbündeln mit Antikörpern

An Holzstäbchen befestigte, "glyzerinisierte" Brustmuskelfaserbündel und "glyzerinisierte" Herzen (1.2.16.) wurden während 5 Min. in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in Waschlösung vorfixiert und danach mit einer Injektionsnadel in kleine Faserbündel zerzupft (siehe 1.2.12.). Mehrere Fäserchen wurden nun in ein kleines Glasgefäß gelegt und während 24 Std. bei 4 °C mit ca. 200 µl der jeweiligen Antikörperlösung (ca. 1 mg IgG oder Fab/ml Waschlösung) inkubiert. Danach wurden die Fäserchen während ca. 1 Std. bei 4 °C in Waschlösung gewaschen (mehrmaliges Wechseln der Waschlösung) und für die Elektronenmikroskopie (1.2.19.) weiterverarbeitet.

### 1.2.19. Elektronenmikroskopie

Die kleinen Muskelfaserbündel (1.2.17. und 1.2.18.) wurden bei 4 °C während 30 Min. in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in Waschlösung fixiert, in kalter Waschlösung gewaschen und während 5 Min. bei Zimmertemperatur in 1 % (w/v) Osmiumtetroxid in PBS nachfixiert. Die fixierten Fäserchen wurden nun bei Zimmertemperatur in Alkohol und Aceton entwässert; sie wurden dazu der Reihe nach wie folgt inkubiert: 5 Min. in 30 % Aethanol, 5 Min. in 50 % Aethanol, mindestens 10 Min. in 70 % Aethanol (kann aber auch über Nacht durchgeführt werden), 10 Min. in 90 % Aethanol, 10 Min. in 96 % Aethanol, 2 x 15 Min. in 100 % Aethanol (absoluten Alkohol über  $\text{CuSO}_4$  wasserfrei halten) und 3 x 15 Min. in Aceton (über  $\text{CuSO}_4$  wasserfrei halten). Danach wurden sie bei Zimmertemperatur zunächst während 1 Std. in einer Plastiklösung aus 1 Teil Plastik-Gebrauchslösung und 2 Teilen Aceton und dann während ca. 2 Std. in einer Lösung aus 2 Teilen Plastik-Gebrauchslösung und 1 Teil Aceton inkubiert. Schliesslich wurden die Fäserchen in einen Plastik-Präparathalter transferiert und in 100 % Plastik-Gebrauchslösung eingebettet. Die Präparate wurden während 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann zur Härtung während mindestens 12 Std. bei 60 °C in einem Wärmeschrank gehalten. Mit einer Rasierklinge wurden die Plastikblöckchen nun so zurechtgeschnitten, dass die Muskelfäserchen die Spitze einer Pyramide bildeten. Im Ultramikrotom wurden Schnitte von ca. 50 nm Dicke (silbergraue Schnitte) hergestellt und auf Trägernetzchen aufgenommen. Die Schnitte wurden während 45 Min. in 2 % (w/v) Uranylacetat in Wasser und, nach Waschen in destilliertem Wasser, während 15 Min. in einer Bleicitrat-Lösung (0,13 M  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 0,19 M Na-Citrat) nachkontra-

stiert. Die gewaschenen und luftgetrockneten Präparate wurden im Elektronenmikroskop bei 100 kV betrachtet und auf 6,5 x 9 cm Agfa (Scientia) Filmplatten fotografiert.

### 1.3. RESULTATE

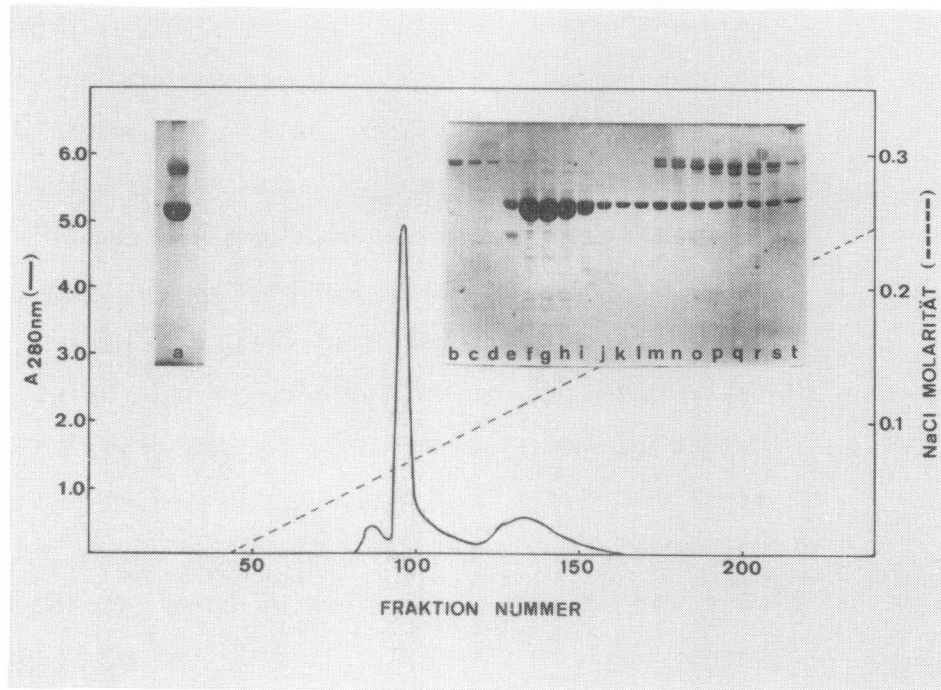
#### 1.3.1. Reinigung von Myomesin, Mitreinigung von "165K-7S-Protein" und Phosphorylase b

Die Isolierung und Reinigung von Myomesin aus Hühner-Brustmuskeln wurde im wesentlichen nach der Methode von Trinick & Lowey (133) durchgeführt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf eine Ausgangsmenge von ca. 350-g frischen Muskels. Alle Schritte wurden bei 0 - 4 °C durchgeführt. Frische Hühner-Brustmuskeln wurden auf Eis in kleine Stücke geschnitten, in ca. 700 ml Waschlösung gegeben, die zusätzlich 0,1 mM PMSF als Proteasehemmer enthielt, und in einem "Fleischwolf" (Moulinex) weiter zerkleinert. Die Suspension wurde während 10 Min. bei 8.000 x g zentrifugiert und der Rückstand in frischer Waschlösung (0,1 mM PMSF enthaltend) resuspendiert. Durch wiederholtes Zentrifugieren/Resuspendieren (ca. 7 - 9 x) wurden die Muskeln gewaschen, bis die Absorption des Waschüberstandes bei 280 nm konstant blieb. Die Muskelsuspension wurde nun in 1,2 Liter Hochsalz-Extraktionspuffer ("Hochsalzpuffer", der zusätzlich 0,1 mM PMSF enthielt) aufgeschlämmt und unter ständigem Rühren während 90 Min. extrahiert. Der Extrakt wurde durch Zentrifugieren (30 Min. bei 12.000 x g) vom Muskelrückstand abgetrennt und mit 2,5 n NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Durch langsames Zugeben einer 91 %igen Ammoniumsulfatlösung (91 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (475 g/l bei 4 °C), 1 mM EDTA, pH 7,2) bis zu einer Endkonzentration von 32 % wurden die hochmolekularen Proteine ausgefällt. Nach 20minütigem Rühren wurde das Präzipitat während 15 Min. bei 20.000 x g abzentrifugiert, in ca. 400 ml Puffer A gelöst und zuerst während 24 Std. gegen 2 x 10

Volumen Puffer A und dann während 12 Std. gegen 2 x 10 Volumen Puffer B dialysiert. Das ausgefällte Aktomyosin wurde durch Zentrifugieren (50 Min. bei 40.000 x g) entfernt; im Ueberstand wurde eine zweite Ammoniumsulfatfällung (40 %) durchgeführt (langsame Zugabe von 225 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pro Liter Ueberstand bei 0 °C). Nach 20minütigem Weiterrühren wurde das Präzipitat während 15 Min. bei 8.000 x g abzentrifugiert, in ca. 70 ml Puffer C gelöst und während mindestens 48 Std. gegen 2 Liter Puffer C dialysiert (mehrmaliges Wechseln des Puffers).

Die dialysierte Myomesin-Präparation wurde während 15 Min. bei 20.000 x g von unlöslichen Präzipitaten getrennt und auf eine 2,5 x 35 cm grosse DE-52-Zellulose-Säule aufgezogen. Die Säule wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 50 ml/Std. mit Puffer C gewaschen, bis die Absorption des Durchflusses auf 0 abgefallen war. Die interessierenden Proteine wurden mit einem Gradienten von 2 x 1 Liter 0,0 - 0,3 M NaCl in Puffer C eluiert. Das Elutionsprofil sowie Polyacrylamidgele der Proteine in den wichtigsten Fraktionen werden in **Figur 1** gezeigt.

Durch diese einmalige DE-52-Zellulose-Chromatographie kann hochgereinigtes "165K-7S-Protein" (Fraktionen 84 bis 91) sowie hochgereinigte Phosphorylase b (Fraktionen 95 - 120) in einem Schritt gewonnen werden. Myomesin erscheint zusammen mit Phosphorylase b in den Fraktionen 122 bis 150 bei einer Salzkonzentration von 0,1 bis 0,15 M. Zur Weiterreinigung von Myomesin wurde deshalb eine Affinitätschromatographie auf 5'-AMP-Sepharose 4B durchgeführt (Phosphorylase besitzt Bindungsstellen hoher Affinität für das Koenzym AMP). Ungefähr 25 mg Myomesin/Phosphorylase b in Puffer C (aus den zusammengegebenen Fraktionen 124 bis 150 der DE-52-Zellulose-Chromatographie) wurden auf eine in Puffer C equilibrierte 5'-AMP-



Figur 1: DE-52-Zellulose-Chromatographie der Myomesin-Präparation.

375 mg Protein, gelöst in 75 ml Puffer C, wurden auf eine in Puffer C equilibrierte, 2,5 x 35 cm grosse DE-52-Zellulose-Säule aufgezogen und mit einem linearen Salzgradienten von 2 x 1 Liter 0,0 - 0,3 M NaCl in Puffer C eluiert. Tropfgeschwindigkeit: 50 ml/Std.; Fraktionengrösse: 8,5 ml.

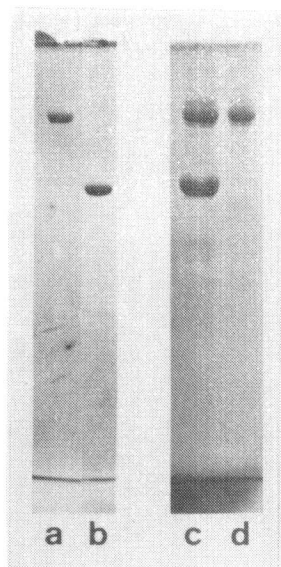
SDS-Polyacrylamidgele (8 %) der Proteine im Ausgangsmaterial (a) sowie in den Fraktionen 86 (b), 88 (c), 92 (d), 94 (e), 96 (f), 97 (g), 99 (h), 101 (i), 104 (j), 110 (k), 120 (l), 122 (m), 124 (n), 126 (o), 132 (p), 138 (q), 144 (r), 148 (s) und 152 (t) werden ebenfalls gezeigt.

Sepharose-4B-Säule (0,8 x 6 cm) aufgezogen. Die Proteine im Durchfluss wurden gesammelt; die Analyse auf SDS-Polyacrylamidgelen zeigte, dass es sich um hochgereinigtes Myomesin handelte.

In Figur 2 wird die Homogenität von "165K-7S-Protein", Phosphorylase b und von Myomesin auf 8 %-Polyacrylamidgelen in Gegenwart von 0,1 % SDS gezeigt.

In Tabelle I ist das Reinigungsprotokoll für Myomesin zusammengestellt.





Figur 2: 8 %-Polyacrylamidgele in Gegenwart von 0,1 % SDS von:

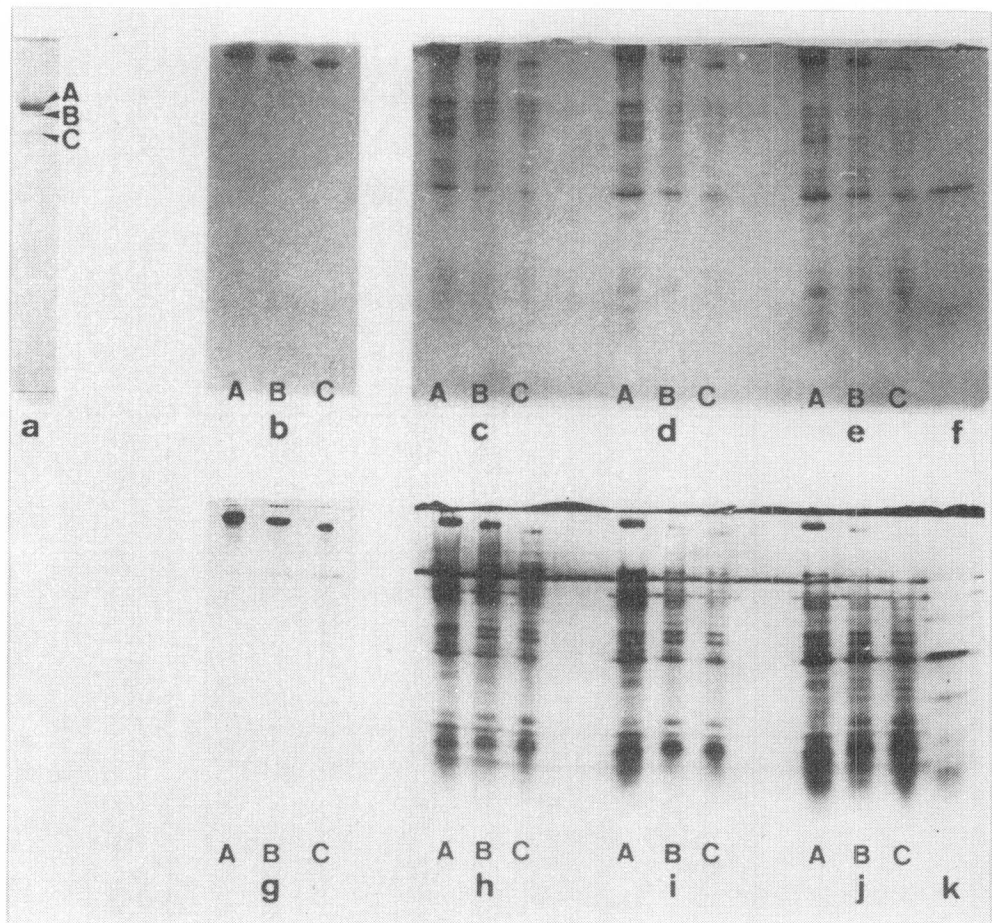
(a) "165K-7S-Protein" (2 µg), (b) Phosphorylase b (3 µg), (c) Myomesin/Phosphorylase b nach der DE-52-Zellulose-Chromatographie bzw. vor der Affinitätschromatographie auf 5'-AMP-Sepharose 4B (8 µg), (d) Myomesin nach der 5'-AMP-Sepharose-4B-Chromatographie (4 µg).

Tabelle I: Reinigungsprotokoll von Myomesin.

Ausgangsmenge: 350 g frische Hühner-Brustmuskeln

Schritt	Volumen ml	Protein mg/ml	Protein total mg	Ausbeute %
Hochsalzextrakt	ca. 1.000	ca. 14	ca. 14.000	100,0
nach Fällung in 32 % Ammoniumsulfat und Lösen in Puffer A	400	30	12.000	85,7
nach Fällung in 40 % Ammoniumsulfat und Lösen in Puffer C (Material, das auf DE-52-Zellulose-Säule aufgetragen wird)	75	5	375	2,7
nach DE-52-Zellulose-Chromatographie (zusammengegebene Fraktionen, die hauptsächlich Myomesin und Phosphorylase <u>b</u> enthalten)	230	0,4	92	0,7
nach 5'-AMP-Sepharose-4B-Chromatographie; gereinigtes Myomesin	176	0,25	44	0,3

Ausser der Hauptbande (Bande A) waren jedoch auf SDS-Polyacrylamidgelen von gereinigtem Myomesin oft 2 weitere, schneller wandernde Banden (B und C) deutlich sichtbar (Figur 3a). Der Anteil dieser Banden am gesamten aufgetragenen Myomesin war jedoch variabel. Um zu testen, ob es sich bei diesen Proteinen um Abbauprodukte



Figur 3: Peptidanalyse von Myomesin.

(a): SDS-Polyacrylamidgel (8 %) von Myomesin (4 µg). Neben der Hauptbande A sind zwei schwächere, schneller wandernde Banden B und C sichtbar.

(b) - (k): Peptidanalyse der Proteinbanden A, B und C nach partieller *Staphylococcus aureus* V8-Protease-Verdauung in 12,5 %-Polyacrylamidgelen in Gegenwart von 0,1 % SDS. (b) - (f): Coomassie-Färbung; (g) - (k): Silberfärbung der Gele (b) - (f). (b), (g): ohne *Staphylococcus aureus* V8-Protease; (c), (h): 0,01 µg V8-Protease; (d), (i): 0,05 µg V8-Protease; (e), (j): 0,1 µg V8-Protease; (f), (k): V8-Protease allein (2 µg).

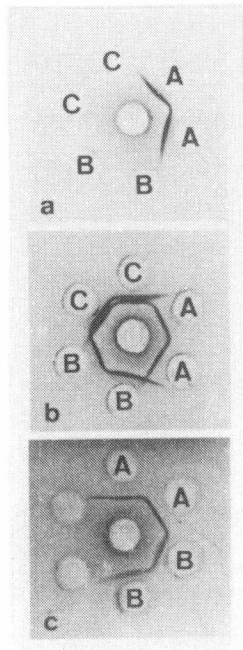
von Myomesin handelte, wurden die einzelnen Proteinbanden aus Gelen ausgeschnitten und wie im Methodenteil (1.2.5.) beschrieben durch partielle Proteaseverdauung und anschließende Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen auf ihre Peptidzusammensetzung untersucht. **Figur 3b - k** zeigt deutlich, dass die 3 Proteine (Banden A, B und C) sehr ähnliche Peptidmuster aufweisen und deshalb höchstwahrscheinlich von einer einzigen Proteinspezies abstammen.

### 1.3.2. Charakterisierung der Antikörper gegen Myomesin und gegen "165K-7S-Protein"

Das Antiserum gegen MM-CK wurde früher charakterisiert (102, 143).

In Doppelimmundiffusionstests gaben Antiseren gegen Myomesin und gegen "165K-7S-Protein" je eine einzige Präzipitationslinie gegen ihr jeweiliges homologes Antigen (**Figur 4**). Antiserum gegen Myomesin reagierte hingegen nicht mit "165K-7S-Protein" oder Phosphorylase b, den beiden wahrscheinlichsten Kontaminanten bei der Myomesinreinigung (**Figur 4a**).

Die Identität von "165K-7S-Protein" und "glycogen debranching enzyme" wurde schon früher nachgewiesen (48, 133). Eine weitere Bestätigung dafür wird in **Figur 4c** gezeigt: Wenn das Antiserum gegen "165K-7S-Protein" in einem Doppelimmundiffusionstest gleichzeitig gegen das homologe "165K-7S-Protein" und gegen "debranching enzyme", das nach einem anderen Verfahren gereinigt worden war (48), getestet wurde, so zeigte sich eine Identitätsreaktion.

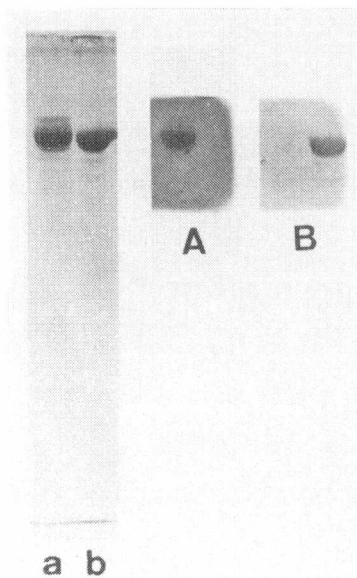


Figur 4: Ouchterlony-Doppelimmundiffusions-tests.

Mittlere Vertiefungen: (a) anti-Myomesin-Serum (30  $\mu$ l), (b) anti-Myomesin-Serum (15  $\mu$ l) + anti-"165K-7S-Protein"-Serum (15  $\mu$ l), (c) anti-"165K-7S-Protein"-Serum (30  $\mu$ l).

Äussere Vertiefungen: (a): A, Myomesin; B, "165K-7S-Protein"; C, Phosphorylase  $\bar{b}$  (je 30  $\mu$ l). (b): A, Myomesin (30  $\mu$ l); B, "165K-7S-Protein" (30  $\mu$ l); C, Myomesin (15  $\mu$ l) + "165K-7S-Protein" (15  $\mu$ l). (c): A, "165K-7S-Protein"; B, "glycogen debranching enzyme" (je 30  $\mu$ l). Die Konzentration der Antigene betrug jeweils 0,3 mg/ml.

Um Myomesin und "165K-7S-Protein" ("debranching enzyme"), die beide sehr ähnliche Molekulargewichte aufweisen, auf SDS-Polyacrylamidgelen voneinander unterscheiden zu können, erwies sich die Immunreplika-Technik als äusserst nützlich (Figur 5). Ein Immunreplika-Gel,



Figur 5: Identifizierung von Myomesin und von "165K-7S-Protein" durch die Immunreplika-Technik.

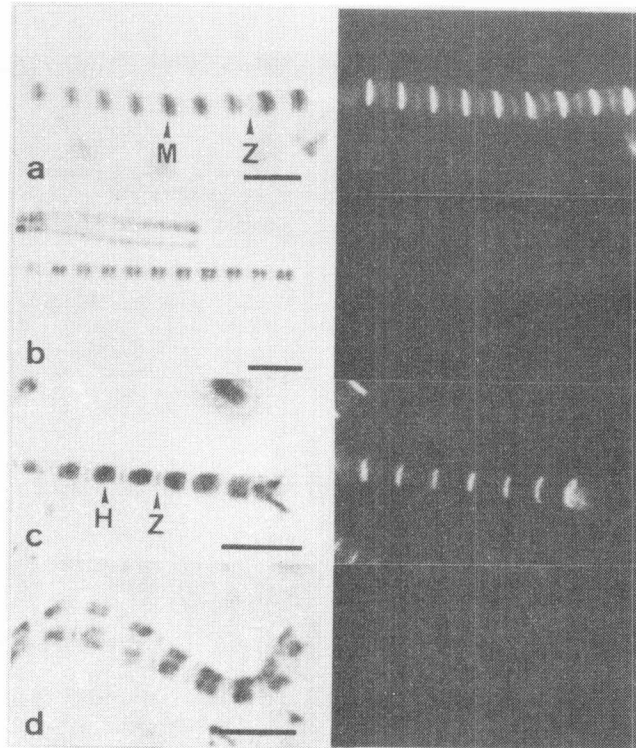
SDS-Polyacrylamidgel (8 %) von Myomesin (9  $\mu$ g) (a) und von "165K-7S-Protein" (5  $\mu$ g) (b) sowie Immunreplika-Gele, die über einen Teil des Polyacrylamidgeles gegossen worden waren und anti-Myomesin-Serum (A) oder anti-"165K-7S-Protein"-Serum (B) enthielten.

das Antiserum gegen Myomesin enthält, reagiert nur mit Myomesin-Banden, nicht aber mit "165K-7S-Protein"-Banden auf SDS-Polyacrylamidgelen (Figur 5, Immunreplika-Gel A). Entsprechend reagiert das Antiserum gegen "165K-7S-Protein" im Immunreplika-Test nur mit dem homologen Protein, nicht aber mit Myomesin (Figur 5, Immunreplika-Gel B).

### 1.3.3. Lokalisierung von Myomesin in Skelett- und Herzmuskelmyofibrillen aus dem Huhn

Mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik konnte gezeigt werden, dass Myomesin in der Mitte der A-Bande von isolierten Hühner-Brustmuskelmyofibrillen lokalisiert ist (Figur 6). Die Antikörperablagerung in der H-Zone war so stark, dass sie manchmal sogar in Phasenkontrastaufnahmen als schwarze Linie sichtbar wurde (Figur 6a).

Demgegenüber zeigten Myofibrillen, die mit Kontroll-IgG inkubiert worden waren, im Phasenkontrast eine helle H-Zone und unter Fluoreszenzanregung keine spezifische Reaktion (Figur 6b, d). Das interessanteste Resultat stellt aber zweifellos die Tatsache dar, dass auch Hühner-Herzmyofibrillen, denen eine sichtbare M-Linie fehlt (120, 141), nach der Inkubation mit den Antikörpern gegen Myomesin und den fluoreszierenden sekundären Antikörpern eine stark positive Reaktion in der H-Zone zeigten (Figur 6c).



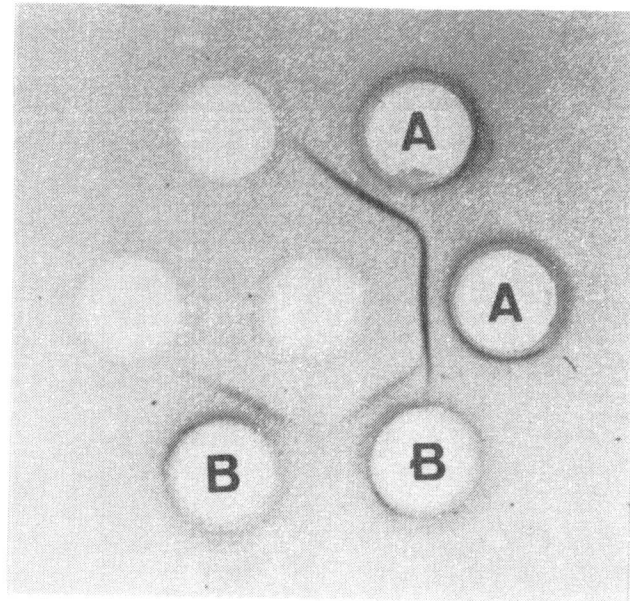
Figur 6: Lokalisierung von Myomesin in isolierten Myofibrillen.

a, b: Brustmuskelfibrillen; c, d: Herzmuskelfibrillen. a und c: Inkubation (1 Std.) mit anti-Myomesin-IgG (10 µg/ml); b und d: Inkubation (1 Std.) mit IgG aus Präimmunsereum (20 µg/ml). Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahmen. M: M-Linie; Z: Z-Linie; H: H-Zone. Vergrößerungsbalken: 5 µm.

Durch weitere Experimente konnte belegt werden, dass Herzmuskelfibrillen Myomesin enthalten:

1. In Immundiffusionstests reagierten Antikörper gegen Skelettmuskelfibrillen mit Hochsalzextrakten von Brustmuskelfibrillen und Herzmuskelfibrillen in je einer einzigen Präzipitationslinie (Figur 7), wobei die beiden Präzipitationslinien miteinander verschmolzen. Die kreuzreagierende Proteinspezies aus dem Herzmuskel ist aber nicht vollkommen identisch mit derjenigen aus dem Brustmuskel, da in der Reaktion des Antikörpers mit dem homologen Brustmuskelfibrillen-

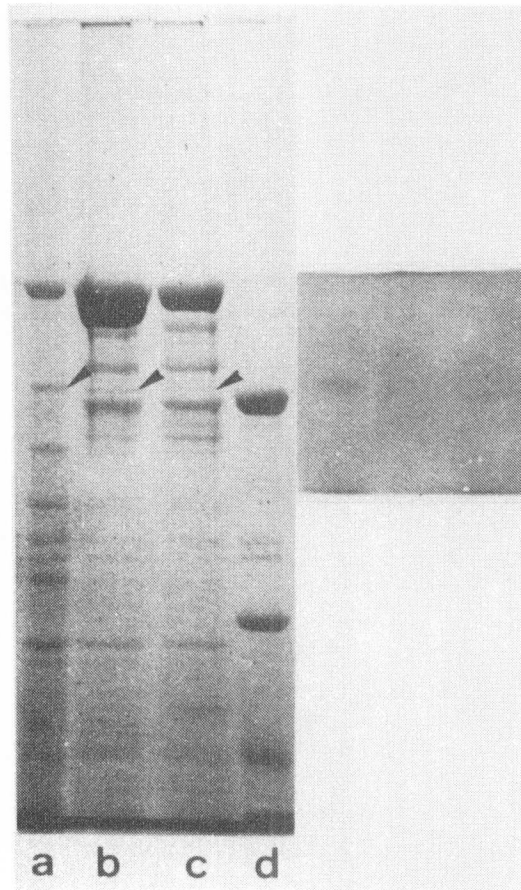
sin ein zusätzlicher Sporn auftritt (Figur 7). Dies lässt darauf schliessen, dass sich das Brust- und das Herzmuskelprotein in mindestens einer antigenischen Determinante unterscheiden.



Figur 7: Doppelimmundiffusionstest von:

Anti-Myomesin-IgG (1 mg/ml, mittlere Vertiefung) gegen Hochsalzextrakt (ca. 10 mg Protein/ml) aus Hühner-Brustmuskelfibrillen (A) und aus Hühner-Herzmuskelfibrillen (B).

2. Wenn die Proteine aus Niedrig- und Hochsalzextrakten von Herzmuskelfibrillen nach der Auftrennung auf SDS-Polyacrylamidgelen mittels der Immunreplikatechnik auf die Anwesenheit einer mit Brustmuskelfibrillen kreuzreagierenden Spezies untersucht wurden, fand sich eine Reaktion mit einem Protein, das ein Molekulargewicht von ca. 165.000 aufwies (Figur 8).



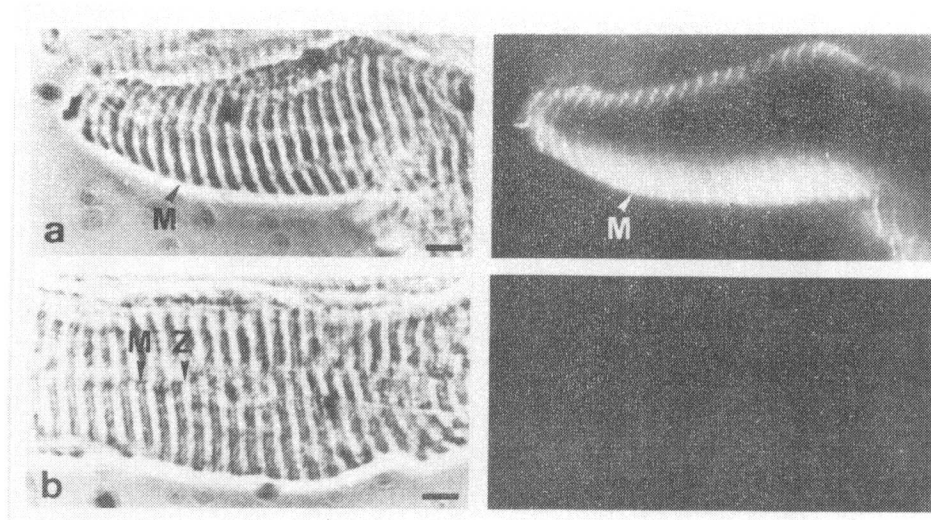
Figur 8: SDS-Polyacrylamidgele (5 %) der Proteine in Niedrig- und Hochsalzextrakten von Hühner-Herzmuskelmyofibrillen; Identifizierung von Herzmuskelmyomesin durch die Immunreplika-Technik.

a: Niedrigsalzextrakt (72 Std., 3  $\mu$ g); b: Hochsalzextrakt (24 Std., 5  $\mu$ g); c: Hochsalzextrakt (72 Std., 3  $\mu$ g); d:  $M_r$ -Markerproteine (ungefähre Molekulargewichtswerte von oben nach unten: Hühner-"165K-7S-Protein": 165.000; Kaninchenmuskel-Phosphorylase b: 94.000; Rinder-Serumalbumin: 68.000; Kaninchenmuskel-Pyruvatkinase: 57.000). Das Immunreplika-Gel rechts enthielt Antiserum gegen Hühner-Brustmuskelmyomesin und wurde über einen Teil der Bahnen a - c des Polyacrylamidgeles gegossen. Die Präzipitationslinien im Immunreplika-Gel bildeten sich über den mit den Pfeilen bezeichneten Proteinbanden.

Aus Figur 9 geht hervor, dass Myomesin auch auf Gefrierschnitten durch intakte Hühner-Brustmuskeln in der H-Zone der Myofibrillen lokalisiert werden konnte. Ver-



gleichem mit der spezifischen H-Zonen-Fluoreszenz war die Hintergrundfluoreszenz sehr gering.

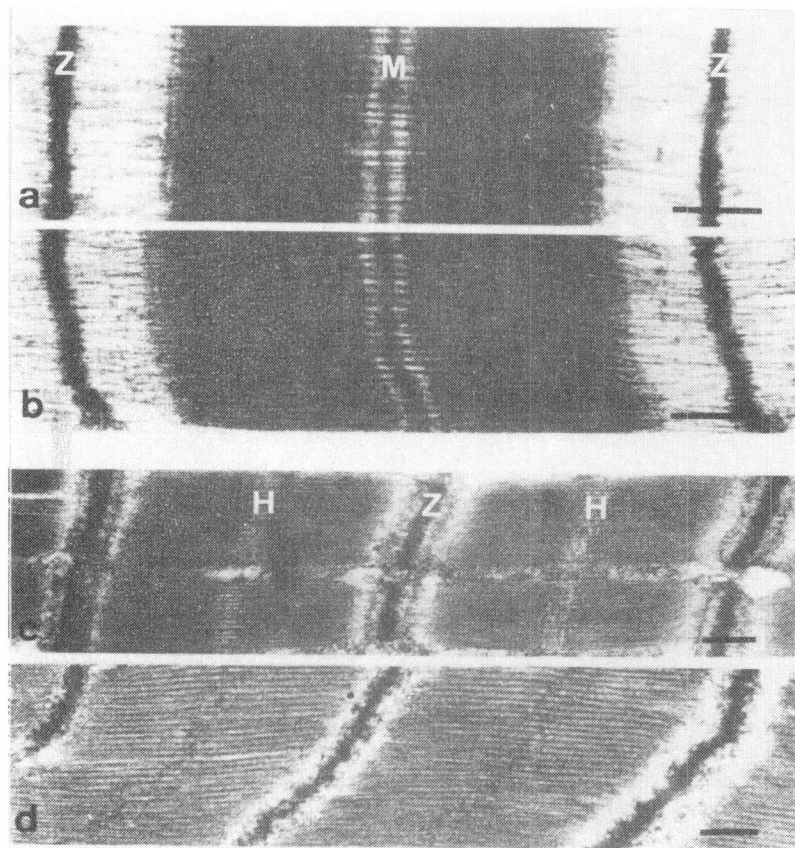


Figur 9: Lokalisierung von Myomesin in Gefrierschnitten durch Hühner-Brustmuskeln.

a: Inkubation mit anti-Myomesin-IgG; b: Inkubation mit IgG aus Präimmunserum. Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahmen. Schnittdicke: 6  $\mu\text{m}$ . M: M-Linienregion; Z: Z-Linie. Vergrößerungsbalcken: 5  $\mu\text{m}$ .

Die ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in Myofibrillen wurde im Elektronenmikroskop genauer untersucht. Nach der Inkubation mit Antikörpern gegen Myomesin zeigten Skelettmuskelmyofibrillen eine regelmässige, stark elektronendichte Markierung, die sich über einen grossen Teil der H-Zone erstreckte (Figur 10b) und eindeutig breiter war als die M-Linie von Myofibrillen, die mit Präimmun-IgG inkubiert worden waren (Figur 10a). Die durchschnittliche Breite der Markierung mit Antikörpern gegen Myomesin betrug 63 nm; demgegenüber war die M-Linie der Kontroll-Myofibrillen nur 41 nm breit. Dieser Unterschied kann nicht nur durch das Binden von An-

tikkörpermolekülen an den äussersten Rand der eigentlichen M-Linie erklärt werden, da z.B. die Markierung von Myofibrillen mit Antikörpern gegen MM-CK keine wesentliche Verbreiterung der M-Linie zur Folge hatte. **Figur 10c** zeigt eine Hühner-Herzmyofibrille, die mit Kontroll-IgG inkubiert wurde; das Fehlen einer elektronendichten M-Linie ist klar zu erkennen. Nach der Inkubation mit Antikörpern gegen Myomesin wiesen Hühner-Herzmyofibrillen jedoch eine deutliche Markierung auf (**Figur 10d**), vergleichbar mit derjenigen in Skelettmuskelmyofibrillen.



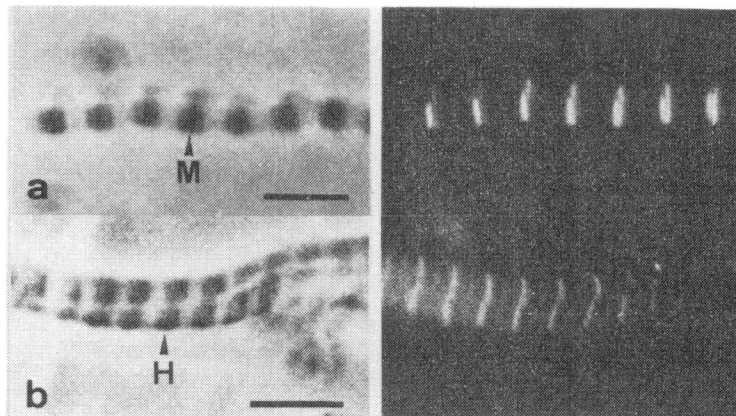
**Figur 10:** Ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin auf Ultradünnschnitten durch Hühner- Skelett- und Herzmuskeln.

a, b: Brustmuskelmyofibrillen; c, d: Herzmuskelmyofibrillen. a und c: Inkubation mit IgG aus Präimmunserum; b und d: Inkubation mit anti-Myomesin-IgG. M: M-Linie; Z: Z-Linie; H: H-Zone. Vergrößerungsbalken: 0,3  $\mu\text{m}$ .

#### 1.3.4. Extrahierbarkeit von Myomesin aus Skelett- und Herzmuskelmyofibrillen in Puffern verschiedener Ionenstärke

Aus manchen früheren Publikationen ist bekannt, dass Puffer niedriger Ionenstärke das myofibrilläre M-Linienmaterial recht spezifisch extrahieren können (12, 69, 123). Durch einstündige Inkubation in einem Niedrigsalzpuffer (5 mM Tris-HCl, pH 7,7) konnte z.B. die MM-CK-Aktivität praktisch vollständig aus Brustmuskelmyofibrillen herausgelöst werden (143). Entsprechend fand sich in solchen Myofibrillen auch keine spezifische M-Linien-Immunfluoreszenz für MM-CK mehr (143).

Im Gegensatz dazu war die quantitative Extraktion von Myomesin aus Brust- oder Herzmuskelmyofibrillen in "Niedrigsalzpuffer" nicht möglich; auch nach 3tägiger Inkubationsdauer konnte dieses Protein mittels der Immunfluoreszenz-Technik noch immer eindeutig in der M-Linienregion der Myofibrillen nachgewiesen werden (Figur 11).

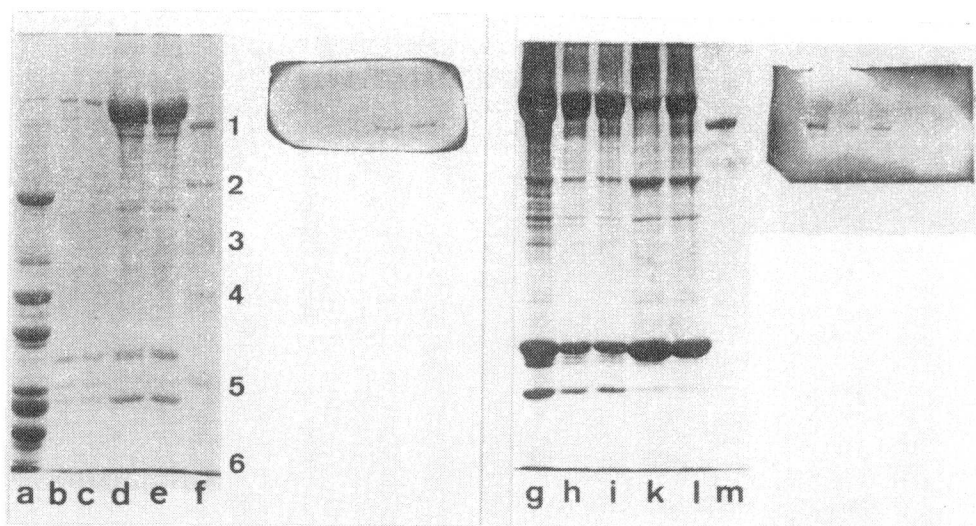


Figur 11: Lokalisierung von Myomesin in extrahierten Myofibrillen.

a: Brustmuskel-, b: Herzmuskelmyofibrillen. Die Myofibrillen wurden während 72 Std. in "Niedrigsalzpuffer" extrahiert und dann mit Antiserum gegen Myomesin (1 : 100 in Waschlösung verdünnt) inkubiert. Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahmen. M: M-Linienregion; H: H-Zone. Vergrößerungsbalken: 5  $\mu$ m.

Die Fluoreszenz war zwar oft etwas diffuser, was auf eine gewisse "Auflockerung" der myofibrillären Struktur zurückzuführen sein könnte; im allgemeinen waren jedoch keine grossen morphologischen Veränderungen dieser in "Niedrigsalzpuffer" extrahierten Myofibrillen zu beobachten. Extraktionen in "Hochsalzpuffer" hatten hingegen schon nach kurzer Zeit (weniger als 1 Std.) eine totale Zerstörung der myofibrillären Strukturen zur Folge. Hochsalz-Extraktionen lösen das gesamte A-Bandenmaterial aus den Myofibrillen heraus (59) und haben deshalb auch die quantitative Extraktion von Myomesin zur Folge. Die unterschiedliche Extrahierbarkeit von Myomesin in Puffern niedriger oder hoher Ionenstärke wird in **Figur 12** veranschaulicht. Die Ueberstände von Extraktionen in Puffern niedriger und hoher Ionenstärke sowie die extrahierten Myofibrillen wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen mittels der Immunreplika-Technik auf das Vorhandensein von Myomesin untersucht.

Waschlösung vermochte keine nennenswerten Mengen von Myomesin aus Myofibrillen herauszulösen (**Figur 12a**). Niedrigsalzextrakte enthielten nachweisbare Mengen von Myomesin (**Figur 12b, c**), der grösste Teil des Myomesins blieb jedoch in den extrahierten Myofibrillen zurück (**Figur 12h, i**). In "Hochsalzpuffer" extrahierte Myofibrillen hingegen enthielten praktisch kein Myomesin mehr (**Figur 12k, l**); das gesamte Myomesin war in den entsprechenden Extrakten nachzuweisen (**Figur 12d, e**).

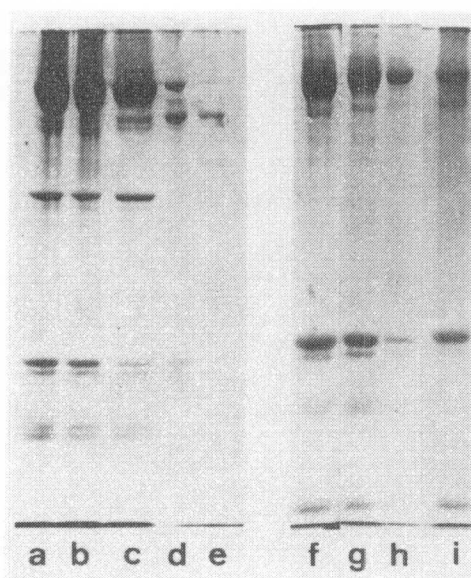


Figur 12: SDS-Polyacrylamidgels (8 %) der Proteine in den Ueberständen und in den zurückbleibenden Myofibrillen nach Extraktionen von Hühner-Brustmuskelfibrillen in verschiedenen Puffern; Nachweis von Myomesin durch die Immunreplikatechnik.

a - e: Ueberstände nach der Inkubation von Myofibrillen in Waschlösung (5 Min.) (a); "Niedrigsalzpuffer" (1 Std.) (b); "Niedrigsalzpuffer" (72 Std.) (c); "Hochsalzpuffer" (1 Std.) (d); "Hochsalzpuffer" (72 Std.) (e). f:  $M_r$ -Markerproteine (ungefähre Molekulargewichtswerte: 1: Hühner-"165K-7S-Protein": 165.000; 2. Kaninchenmuskel-Phosphorylase b: 94.000; 3: Rinder-Serumalbumin: 68.000; 4. Kaninchenmuskel-Pyruvatkinase: 57.000; 5: Hühner-M-CK: 40.000; 6: Rinder-Chymotrypsinogen A: 25.000). g - l: Zurückbleibende Myofibrillen nach den entsprechenden, unter a - e erwähnten Inkubationen in verschiedenen Puffern. m:  $M_r$ -Markerprotein: Hühner-"165K-7S-Protein" ( $M_r$  165.000). Die Pfeilspitzen geben die Positionen von Myosin-"heavy chain", Myomesin und Aktin an (von oben nach unten). Die Immunreplika-Gele enthielten Antiserum gegen Myomesin und wurden über einen Teil der Bahnen a - e bzw. g - l der Polyacrylamidgels gegossen.

Die starke Bindung von Myomesin an die Myosinfilamente konnte durch ein weiteres Experiment belegt werden, in welchem versucht wurde, Myomesin aus Hochsalzextrakten von Brust- und Herzmuskeln in einem einzigen Schritt über eine anti-Myomesin-Affinitätssäule zu reinigen. Dazu wurden Sepharose-4B-Säulen, an die anti-Myomesin-IgG kovalent gekoppelt worden waren, mit dem jeweiligen Extrakt beschickt. Die Säulen wurden mit PBS, 1 mM EDTA,

1 M NaCl gewaschen und dann mit 3 M KJ, 0,1 M Tris-HCl, pH 8 eluiert. Die Eluate wurden gegen 0,05 M Tris-HCl, 5 mM DTT, 10 % Glyzerin, 0,1 mM PMSF, pH 8 dialysiert und Aliquots auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Auch durch intensives Waschen der Säulen (bis kein Protein mehr im Durchfluss erschien) konnte nicht alles Myosin herausgelöst werden; vielmehr erschien Myosin zusammen mit Myomesin bei der spezifischen Elution in 3 M KJ, 0,1 M Tris-HCl, pH 8 (Figur 13). Ausser Myosin konnten die meisten übrigen in den Extrakten vorhandenen Proteine durch Waschen aus den Säulen herausgelöst werden.



Figur 13: SDS-Polyacrylamidgele (8 %) der Proteine in Brustmuskel- und Herzmuskel-Hochsalzextrakten vor und nach der Auftrennung durch anti-Myomesin-Affinitätschromatographie.

a - d: Proteine in Brustmuskelextrakten; f - i: Proteine in Herzmuskelextrakten. a, f: Hochsalzextrakt vor dem Auftragen auf eine anti-Myomesin-Affinitätssäule; b, g: Proteine im Durchfluss der anti-Myomesin-Affinitätssäule während des Auftragens von Hochsalzextrakt; c, h: Proteine, die mit PBS, 1 mM EDTA, 1 M NaCl aus der anti-Myomesin-Affinitätssäule herausgewaschen wurden; d, i: Proteine, die mit 3 M KJ, 0,1 M Tris-HCl, pH 8 von der anti-Myomesin-Affinitätssäule eluiert wurden; e:  $M_r$ -Markerprotein: Hühner-"165K-7S-Protein" ( $M_r$  165.000).

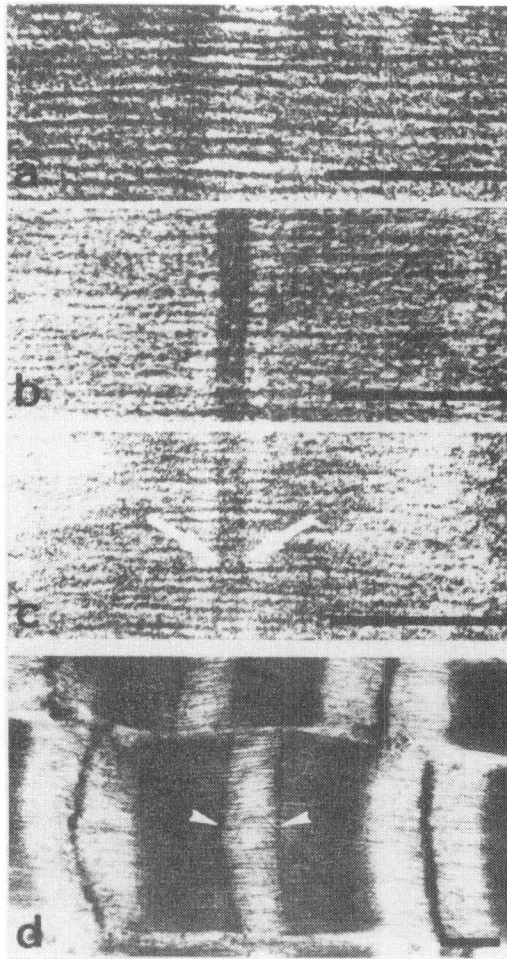
Vergleicht man die Anteile an spezifisch eluiertem Myosin und Myomesin aufgrund der Bandenstärke auf SDS-Polyacrylamidgelen miteinander, so scheint bei Brustmuskelnextrakten ein stöchiometrisches Verhältnis von ca. 1 : 1 zu bestehen (Figur 13d), während bei Herzmuskelnextrakten der Anteil an Myosin eindeutig grösser ist als derjenige an Myomesin (Figur 13i). In letzterem Fall wird allerdings auch eine beträchtliche Menge von Aktin und (wahrscheinlich) Troponin miteluiert, was auf das Binden von einigen ganzen Aktomyosinfilamenten an die anti-Myomesin-Säule zurückzuführen sein könnte.

**1.3.5. Ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in Brustmuskelfibrillen, die in einem Puffer niedriger Ionenstärke extrahiert worden sind**

Eine 24stündige Niedrigsalz-Extraktion von Brustmuskelfaserbündeln führte zum vollständigen Verschwinden der sichtbaren M-Linie (Figur 14a). Wenn solche Faserbündel nun mit Antikörpern gegen Myomesin inkubiert wurden, erhielt man ein charakteristisches Markierungsmuster in der M-Linienregion (Figur 14b - d).

Die Antikörperablagerung zog sich nicht mehr regelmässig durch die ganze M-Linienregion, sondern war stärker ausgeprägt in den beiden Randzonen, so dass in der Mitte ein hellerer, weniger elektronendichter Streifen blieb (Figur 14b). Dieses Doppellinienmuster war noch ausgeprägter, wenn anstelle der ganzen Antikörpermoleküle die viel kleineren Fab-Fragmente der anti-Myomesin-IgG verwendet wurden (Figur 14c). Die mittlere, nicht markierte Zone, in der sich normalerweise die M-Linie befindet, hatte eine ähnlich geringe optische Dichte wie

der Rest der H-Zone ausserhalb der M-Linienregion. In Präparationen von Niedrigsalz-extrahierten Muskelfasern fanden sich oft Myofibrillen mit "zerrissener" M-Linienregion. In solchen Myofibrillen war die Dekoration mit Antikörpern gegen Myomesin in zwei unabhängigen Linien auf beiden Seiten der ehemaligen H-Zone besonders gut sichtbar (Figur 14d).



Figur 14: Ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in Niedrigsalz-extrahierten Brustmuskelfibrillen.

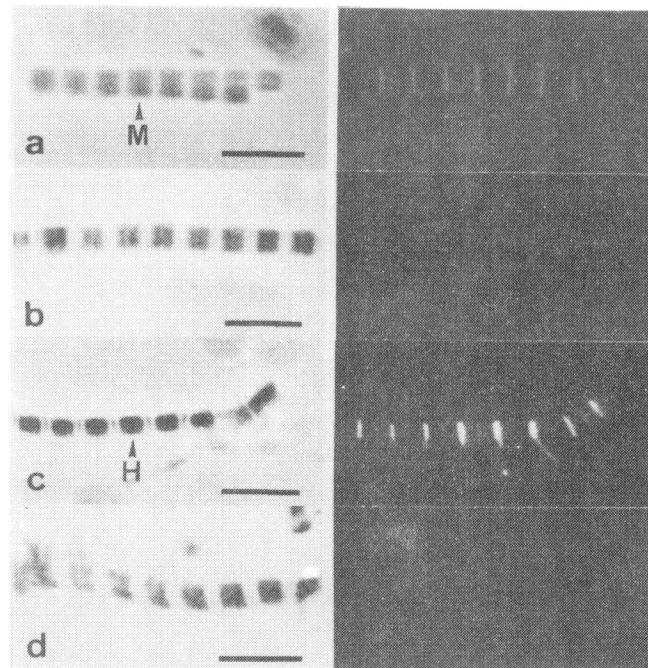
a: Inkubation mit IgG aus Präimmenserum; b und d: Inkubation mit anti-Myomesin-IgG; c: Inkubation mit Fab-Fragmenten von anti-Myomesin-IgG. Pfeile: Antikörperablagerung in zwei getrennten Streifen in der M-Linienregion. Pfeilspitzen: Antikörperablagerungen in zwei unabhängigen Streifen am Rand der H-Zone in Myofibrillen mit "zerrissener" M-Linienregion. Vergrößerungsbalken: 0,3  $\mu$ m.



1.3.6. Inkubation von Skelett- und Herzmuskelmyofibrillen mit monovalenten Antikörpern gegen Myomesin

Hühner-Brustmuskelmyofibrillen wurden ursprünglich mit monovalenten Antikörpern gegen MM-CK inkubiert, um bei der ultrastrukturellen Lokalisierung von MM-CK in der M-Linienregion eine bessere Auflösung zu erhalten. Ueberraschenderweise lösten diese monovalenten Antikörper jedoch die MM-CK spezifisch und quantitativ aus den Myofibrillen heraus, was mit dem Verschwinden der sichtbaren, elektronendichten M-Linie einherging (142).

Im Gegensatz dazu konnte Myomesin in Hühner- Brust- und Herzmuskelmyofibrillen, die zuerst mit monovalenten An-



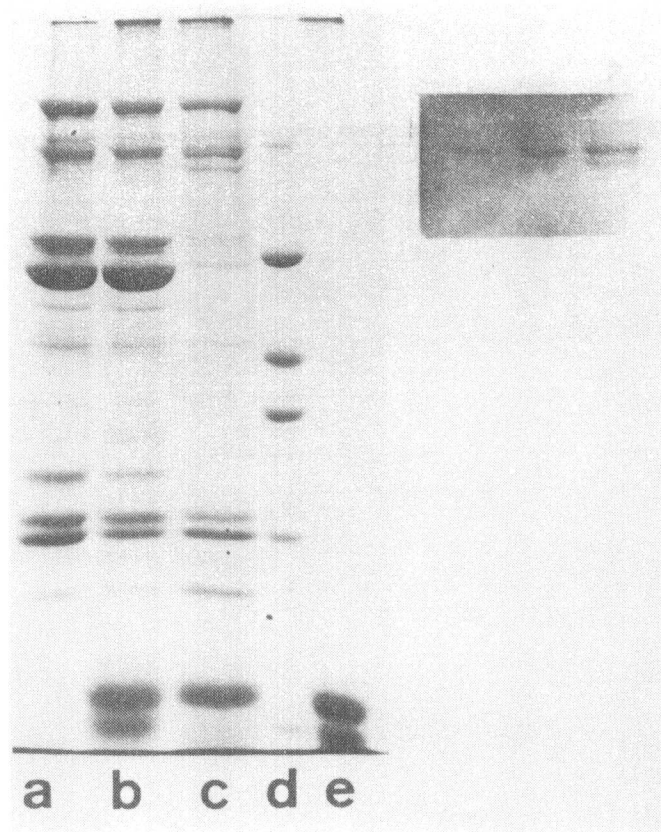
Figur 15: Immunfluoreszenzlokalisierung von Myomesin in Hühner-Brust- und Herzmuskelmyofibrillen mittels monovalenter Antikörper.

a, b: Brustmuskelmyofibrillen; c, d: Herzmuskelmyofibrillen. a und c: Inkubation (1 Std.) mit Fab-Fragmenten von anti-Myomesin-IgG (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); b und d: Inkubation (1 Std.) mit Fab-Fragmenten von IgG aus Präimmunserum (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahmen. M: M-Linienregion; H: H-Zone. Vergrößerungsbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

tikörpern gegen Myomesin und dann mit fluoreszierenden sekundären Antikörpern inkubiert worden waren, noch immer durch die positive Immunfluoreszenzreaktion in der M-Linienregion lokalisiert werden (**Figur 15**). Die Fluoreszenzintensität war im allgemeinen etwas schwächer als nach der Immunfluoreszenzlokalisierung von Myomesin mit ganzen anti-Myomesin-IgG-Molekülen (**Figur 6**). Dies könnte jedoch auf die kleinere Anzahl Bindungsstellen der anti-Myomesin-Fab-Fragmente für die fluoreszierenden sekundären Antikörper zurückzuführen sein.

Auch langdauernde Inkubation (3 Tage) von Myofibrillen mit monovalenten Antikörpern gegen Myomesin vermochte dieses Protein nicht spezifisch und quantitativ aus der M-Linienregion herauszulösen; die Immunfluoreszenzreaktion für Myomesin blieb - wenn auch schwächer - immer noch positiv. Langdauernde Inkubation in Waschlösung führt sicherlich zu einer gewissen Zerstörung von Myofibrillen und damit zur Herauslösung von Proteinen. Trotzdem kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die anti-Myomesin-Fab-Fragmente eine bestimmte Menge von Myomesin spezifisch aus den Myofibrillen herauszulösen vermögen. Dies wird aus **Figur 16** ersichtlich: Nach 3tägiger Inkubation von Brustmuskelfibrillen in einer Lösung von anti-Myomesin-Fab-Fragmenten kann mehr Myomesin im Ueberstand nachgewiesen werden als nach gleich langer Inkubation in Waschlösung oder in einer Lösung von Präimmun-Fab-Fragmenten.

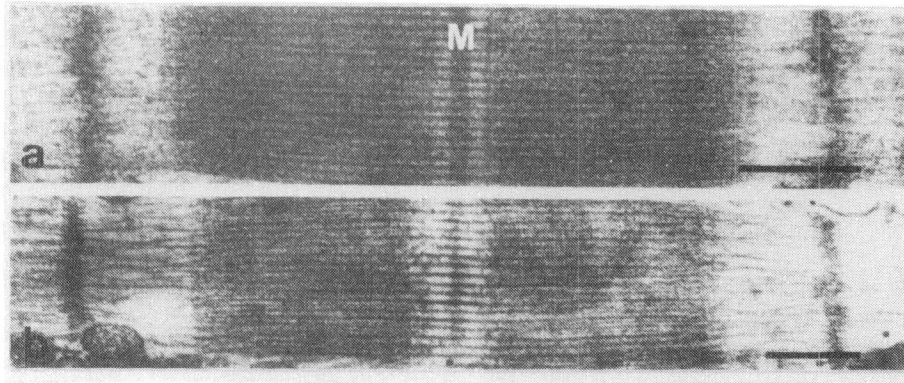
Obwohl aus den oben beschriebenen Experimenten hervorgeht, dass monovalente Antikörper gegen Myomesin an die M-Linienregion von Myofibrillen binden können, brachte die Verwendung von anti-Myomesin-Fab-Fragmenten keine Verbesserung der Auflösung bei der ultrastrukturellen



**Figur 16:** SDS-Polyacrylamidgele (8 %) der Proteine in verschiedenen Inkubationsüberständen von Hühner-Brustmuskelmyofibrillen; Nachweis von Myomesin mit der Immunreplika-Technik.

a - c: Ueberstände nach 72stündiger Inkubation von Myofibrillen mit Waschlösung (a); Fab-Fragmenten von IgG aus Präimmenserum (0,1 mg/ml) (b); Fab-Fragmenten von anti-Myomesin-IgG (0,1 mg/ml) (c). d:  $M_r$ -Markerproteine (ungefähre Molekulargewichtswerte: siehe Legende zu Figur 12f). e: Fab-Fragmente von anti-Myomesin-IgG (10  $\mu$ g). Das Immunreplika-Gel rechts enthielt Antiserum gegen Myomesin; es wurde über einen Teil der Bahnen a - c des Polyacrylamidgeles gegossen. Das Auftreten von mehreren Präzipitationslinien in derselben Bahn ist auf proteolytische Degradation von Myomesin zurückzuführen.

Lokalisierung von Myomesin in Brust- und Herzmuskelmyofibrillen (Figur 17). Die elektronendichte Antikörpermarkierung war vergleichbar mit derjenigen nach der Inkubation von Myofibrillen mit den ungespaltenen anti-Myomesin-Antikörpermolekülen (Figur 10).

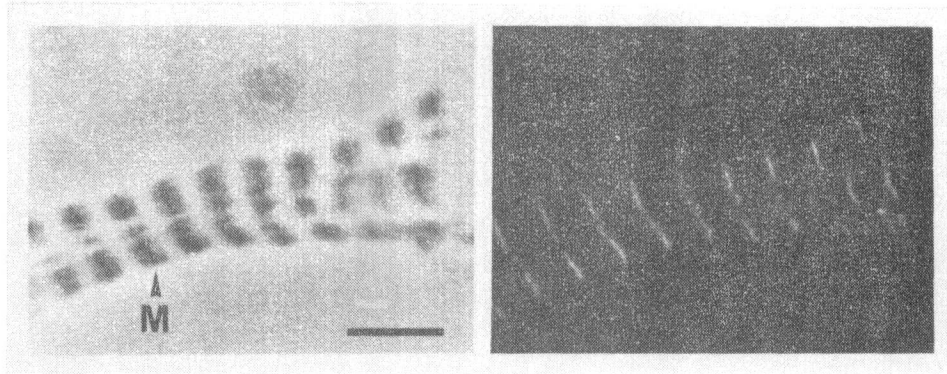


Figur 17: Ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in Hühner-Brustmuskelmyofibrillen mittels monovalenter Antikörper.

a: Inkubation mit Fab-Fragmenten von anti-Myomesin-IgG; b: Inkubation mit Fab-Fragmenten von IgG aus Präimmenserum. M: M-Linienregion. Vergrößerungsbalken: 0,3  $\mu$ m.

1.3.7. Bindung von Antikörpern gegen Myomesin an Brustmuskelmyofibrillen, deren MM-CK extrahiert worden ist

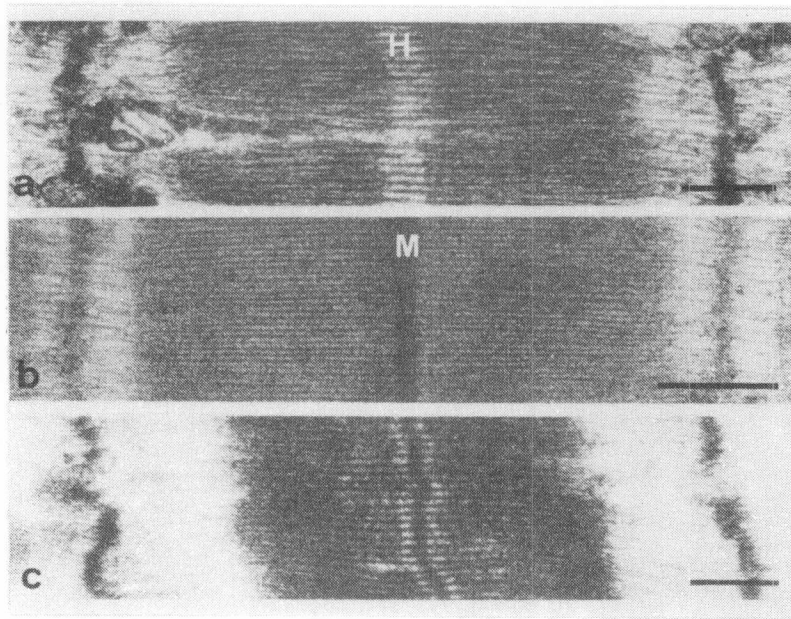
Die Tatsache, dass ein einzelnes M-Linienprotein (MM-CK) selektiv aus Brustmuskelmyofibrillen entfernt werden kann, erleichtert das Studium der Lokalisierung der übrigen M-Linienproteine in der verbleibenden M-Linienregion. Brustmuskelmyofibrillen wurden daher zuerst mit Fab-Fragmenten von anti-MM-CK-IgG inkubiert, um die MM-CK spezifisch herauszulösen, und dann mit anti-Myomesin-IgG und fluoreszierenden sekundären Antikörpern versetzt. Aus Figur 18 wird ersichtlich, dass Myomesin noch immer stark in der M-Linienregion gebunden war; das Fluoreszenzmuster ist nicht von demjenigen von "normalen", für Myomesin angefärbten Myofibrillen (Figur 6) zu unterscheiden.



**Figur 18:** Immunfluoreszenzlokalisierung von Myomesin in Hühner-Brustmuskelfibrillen, deren strukturgebundene MM-CK spezifisch extrahiert worden ist.

Die Myofibrillen wurden zuerst während 24 Std. in einer Lösung von monovalenten Antikörpern gegen MM-CK (0,1 mg/ml) extrahiert und dann während 1 Std. mit anti-Myomesin-IgG (5 µg/ml) inkubiert. Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahme. M: M-Linienregion. Vergrößerungsbalken: 5 µm.

Bei elektronenmikroskopischer Auflösung war das Fehlen einer sichtbaren M-Linie in Brustmuskelfibrillen, deren MM-CK extrahiert worden war, sehr deutlich zu erkennen (**Figur 19a**). Durch die Inkubation solcher Myofibrillen mit anti-Myomesin-IgG wurde die M-Linienregion wieder stark markiert (**Figur 19b**). Die Antikörperablagerung war nicht von derjenigen in nicht extrahierten Myofibrillen (**Figur 10**) zu unterscheiden, d.h. sie erstreckte sich regelmässig über die gesamte M-Linienregion und zeigte kein Doppellinienmuster wie in Niedrigsalz-extrahierten Myofibrillen (**Figur 14b - d**). Auch die Inkubation mit den kleineren Fab-Fragmenten der anti-Myomesin-IgG führte zu keiner wesentlichen Veränderung des Markierungsmusters in der M-Linienregion (vergleiche **Figur 19a** mit **Figur 17a**).



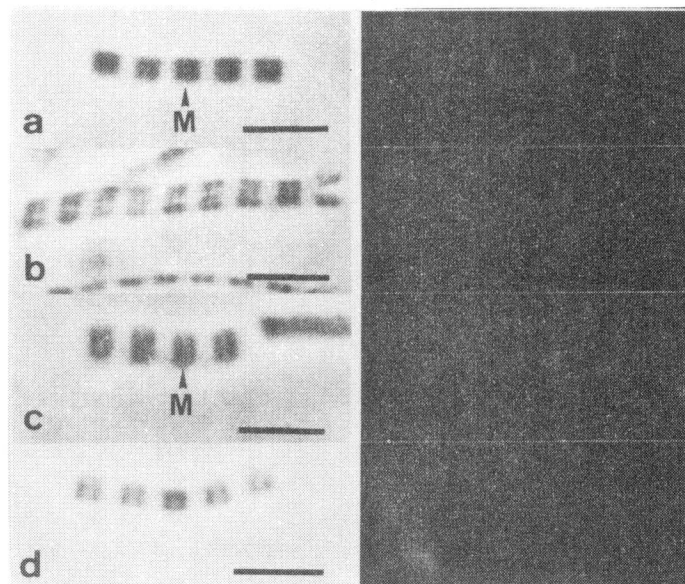
Figur 19: Ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in Hühner-Brustmuskelfibrillen, deren MM-CK spezifisch extrahiert worden ist.

Die Brustmuskelfaserbündel wurden mit monovalenten Antikörpern gegen MM-CK vorinkubiert, um die strukturegebundene MM-CK zu extrahieren. a: Extrahierte Myofibrille; b: Extrahierte Myofibrille nach Inkubation mit anti-Myomesin-IgG; c: Extrahierte Myofibrille nach Inkubation mit Fab-Fragmenten von anti-Myomesin-IgG. H: H-Zone; M: M-Linie. Vergrößerungsbalken: 0,3  $\mu\text{m}$ .

#### 1.3.8. Sequentielle Inkubation von Brustmuskelfibrillen mit monovalenten Antikörpern gegen MM-CK und gegen Myomesin

Die Tatsache, dass Myomesin durch monovalente Antikörper gegen Myomesin nicht spezifisch aus der M-Linienregion herausgelöst werden kann, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Myomesin in unbehandelten Myofibrillen für die Antikörper weniger gut zugänglich ist als MM-CK, die durch die Fab-Fragmente der anti-MM-CK-IgG quantitativ extrahiert werden kann. Deshalb wurde untersucht, ob die Entfernung von MM-CK - die in unbehandelten Myofibrillen eine "Maskierung" der Myomesinmoleküle in der

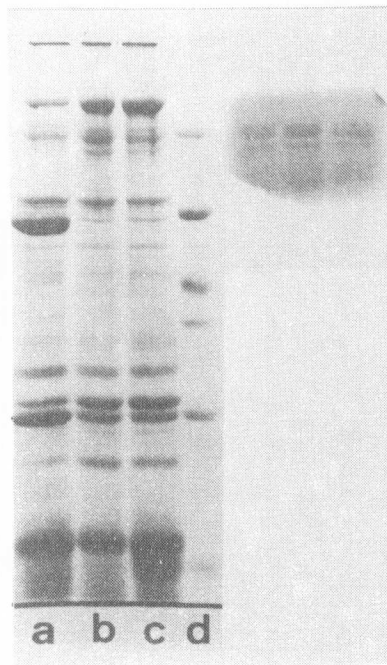
M-Linienregion bewirken könnte - zu einer verbesserten spezifischen Extrahierbarkeit von Myomesin führen würde. Brustmuskelfibrillen wurden dazu zuerst während 24 Std. mit einer Lösung von monovalenten Antikörpern gegen MM-CK extrahiert, um das strukturgebundene Enzym zu entfernen, und dann während 24 - 72 Std. in einer Lösung von monovalenten Antikörpern gegen Myomesin inkubiert. Darauf wurden die Myofibrillen mit fluoreszierenden sekundären Antikörpern angefärbt. **Figur 20a** zeigt, dass Myomesin auch unter diesen Bedingungen immer noch in der M-Linienregion lokalisiert und somit nicht quantitativ extrahiert werden konnte. Selbst Niedersalzs-Extrak-



**Figur 20:** Immunfluoreszenzfärbung von extrahierten Hühner-Brustmuskelfibrillen mit monovalenten Antikörpern gegen Myomesin.

Die Myofibrillen wurden zuerst während 24 Std. mit monovalenten Antikörpern gegen MM-CK (0,1 mg/ml) (a, b) oder mit "Niedrigsalzpuffer" (c, d) extrahiert und dann während 72 Std. mit Fab-Fragmenten von anti-Myomesin-IgG (0,1 mg/ml) (a, c) oder mit Fab-Fragmenten von IgG aus Präimmunserum (0,1 mg/ml) (b, d) inkubiert. Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahmen. M: M-Linienregion. Vergrößerungsbalken: 5  $\mu$ m.

tion, die neben MM-CK noch weitere Proteine aus Myofibrillen herauslöst (12, 69, 123), führte nicht zu einer quantitativen Extrahierbarkeit von Myomesin durch monovalente Antikörper gegen Myomesin (Figur 20c). Die Intensität der Immunfluoreszenz war jedoch nach solchen Inkubationen meist recht schwach und liess darauf schliessen, dass immerhin ein beträchtlicher Anteil an Myomesin aus den Myofibrillen herausgelöst wurde. Dies wird in Figur 21 veranschaulicht.



Figur 21: SDS-Polyacrylamidgele (8 %) der Proteine in verschiedenen Inkubationsüberständen von Hühner-Brustmuskelfibrillen; Nachweis von Myomesin mit der Immunreplika-Technik.

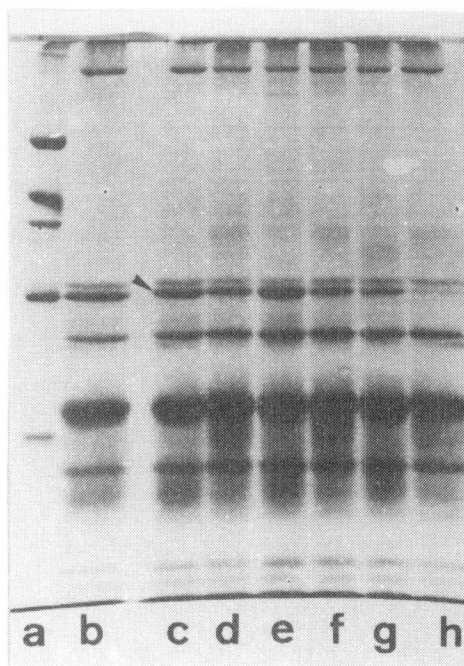
a: Ueberstand nach Inkubation von Myofibrillen mit Fab-Fragmenten von anti-MM-CK-IgG (0,1 mg/ml; 24 Std.); b: Ueberstand nach Inkubation von Myofibrillen, die zuerst wie in (a) behandelt worden waren, mit Fab-Fragmenten von anti-Myomesin-IgG (0,1 mg/ml; 72 Std.); c: Ueberstand nach Inkubation von Myofibrillen, die zuerst wie in (a) behandelt worden waren, mit Fab-Fragmenten von IgG aus Præimmunsereum (0,1 mg/ml; 72 Std.); d:  $M_r$ -Markerproteine (ungefähre Molekulargewichtswerte: siehe Legende zu Figur 12f). Das Immunreplika-Gel rechts enthielt Antiserum gegen Myomesin und wurde über einen Teil der Bahnen a - c des Polyacrylamidgeles gegossen.



Im Ueberstand von Myofibrillen, die - nach der spezifischen Extraktion von MM-CK - mit monovalenten Antikörpern gegen Myomesin inkubiert worden waren, liess sich mehr Myomesin nachweisen, als im Ueberstand von Myofibrillen, die - nach gleicher Vorbehandlung - mit Fab-Fragmenten von IgG aus Präimmenserum inkubiert worden waren.

Die beträchtliche Menge an Myomesin in diesen Ueberständen stammt aber sicher zu einem gewissen Teil auch von der allgemeinen Zerstörung und "Auflösung" von Myofibrillen bei Langzeitinkubationen (siehe auch 1.3.6.).

Wenn die Sequenz der Antikörperinkubationen umgekehrt wurde, d.h. wenn Brustmuskelfibrillen zuerst mit anti-Myomesin-IgG oder mit Fab-Fragmenten von anti-Myomesin-IgG und erst dann mit Fab-Fragmenten von anti-MM-CK-IgG inkubiert wurden, so erfolgte immer noch eine quantitative Extraktion von MM-CK (Figur 22c, e). Obwohl die Bindung der grossen anti-Myomesin-IgG-Moleküle an die M-Linienregion die Zugänglichkeit der MM-CK für die monovalenten Antikörper gegen MM-CK reduzierte, war die Menge an extrahierter MM-CK unter diesen Bedingungen immer noch beträchtlich grösser (Figur 22c) als im entsprechenden Kontrollexperiment (Figur 22d). Im Gegensatz dazu führte die Bindung von anti-MM-CK-IgG an die M-Linienstruktur zu einer eindeutigen Verminderung der spezifischen Extrahierbarkeit von MM-CK durch die Fab-Fragmente von anti-MM-CK-IgG (Figur 22g).



Figur 22: SDS-Polyacrylamidgele (10 %).

a:  $M_r$ -Markerproteine (ungefähre Molekulargewichtswerte von oben nach unten: Kaninchenmuskel-Phosphorylase b: 94.000; Rinder-Serumalbumin: 68.000; Kaninchenmuskel-Pyruvatkinase: 57.000; Hühner-M-CK: 40.000; Rinder-Chymotrypsinogen A: 25.000); b: Ueberstand nach Inkubation (24 Std.) von Hühner-Brustmuskelfibrillen mit monovalenten Antikörpern gegen MM-CK (0,1 mg/ml). c - h: Proteine, die durch Inkubation (24 Std.) mit Fab-Fragmenten von anti-MM-CK-IgG (0,1 mg/ml) (c, e, g) bzw. Fab-Fragmenten der IgG von Präimmenserum (0,1 mg/ml) (d, f, h) aus vorbehandelten Hühner-Brustmuskelfibrillen herausgelöst wurden; die Vorinkubation erfolgte während 1 Std. mit anti-Myomesin-IgG (0,04 mg/ml) (c, d); Fab-Fragmenten von anti-Myomesin-IgG (0,1 mg/ml) (e, f) und anti-MM-CK-IgG (0,1 mg/ml) (g, h). Der Pfeil bezeichnet die Position von M-CK.

#### 1.4. DISKUSSION

##### 1.4.1. Myomesin ist ein Strukturprotein der M-Linienregion von quergestreiften Muskeln

Die Isolierung und Reinigung von M-Linienproteinen aus Muskelgewebe wurde schon von mehreren Autoren beschrieben (21, 31, 32, 78, 83-85, 89, 97, 133). Nachdem man beobachtet hatte, dass Extraktion von Muskelhomogenaten mit Puffern niedriger Ionenstärke schon nach weniger als 1 Std. zum quantitativen Verschwinden der sichtbaren M-Linie führte, während der Rest der Myofibrillenstruktur praktisch unverändert blieb (11, 12, 69, 104, 110, 123), versuchte man meistens, M-Linienproteine aus solchen Niedrigsalzextrakten zu reinigen. Der Vorteil bei der Verwendung von Niedrigsalzextrakten für die Proteinreinigung - das Vorhandensein von "angereicherten" M-Linienproteinen und das fast vollständige Fehlen von Myosin - wird allerdings teilweise aufgehoben durch die Tatsache, dass möglicherweise gewisse Proteine der M-Linienstruktur unter den gegebenen Bedingungen gar nicht herausgelöst werden und sich so einer nachfolgenden Reinigung entziehen. Aus diesem Grund wurden auch Hochsalzextrakte als Ausgangsmaterial für die Isolierung von M-Linienproteinen verwendet (85, 133). Unter Hochsalzbedingungen wird die gesamte A-Bande von Myofibrillen "aufgelöst" (59), wodurch die Reinigung von M-Linienproteinen aus solchen Extrakten stark erschwert wird, da die M-Linienproteine zusammen nur ca. 2 - 3 % der Masse der Myosinfilamente ausmachen. Der grösste Teil solcher Extrakte besteht somit aus Myosin und Aktin.

Wie aus dieser Arbeit hervorgeht, erwies es sich trotzdem als richtig, die Isolierung von Hühner-Brustmuskel-

myomesin aus einem Hochsalzextrakt zu versuchen. Die Extraktionsstudien mit Puffern niedriger und hoher Ionenstärke zeigen deutlich, dass Myomesin nur durch Hochsalz-Extraktion quantitativ aus den Myofibrillen herausgelöst werden kann. Die Tatsache, dass Myomesin (jedenfalls Brustmuskelyomesin) auch in Puffern niedriger Ionenstärke löslich ist, kann insofern ausgenutzt werden, als es möglich ist, in einem einzigen Schritt den grössten Teil der übrigen im Extrakt vorhandenen Proteine - vor allem Aktomyosin - durch Dialyse gegen einen Niedrigsalzpuffer von Myomesin abzutrennen.

Es kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, dass ein gewisser Anteil an Myomesin mit dem Aktomyosin ausgefällt wird; so scheiterte beispielsweise der Versuch, Myomesin aus Hühner-Herzmuskeln nach dem für die Reinigung aus Brustmuskeln verwendeten Vorgehen zu reinigen daran, dass das Herzmuskelyomesin bei der Dialyse gegen Puffer B zusammen mit dem Aktomyosin ausgefällt wurde.

Nach der Abtrennung von Aktomyosin und nach der 40 %igen Ammoniumsulfatfällung enthält die Myomesin-Präparation als hauptsächlichste Kontaminanten nur noch Proteine mit Molekulargewichten von ca. 100.000 und 165.000. Das Protein mit dem Molekulargewicht von rund 100.000 wurde früher ebenfalls als mögliches M-Linienprotein in Betracht gezogen (21, 46, 84). Es wurde später als Phosphorylase b identifiziert (47, 133) und kann heute aufgrund genauerer Lokalisierungsstudien kaum mehr als "echtes" M-Linienprotein bezeichnet werden (47, 130, 131, 133). Das zweite Protein mit einem Molekulargewicht von 165.000, das "165K-7S-Protein" ist identisch mit "glycogen debranching enzyme" (48, 133). Dies wurde auch in dieser Arbeit bestätigt, indem gezeigt werden konnte, dass Antikörper gegen "165K-7S-Protein" in einer Identi-

tätsreaktion mit nach einer anderen Methode (48) gereinigtem "debranching enzyme" kreuzreagieren.

Antikörper gegen "debranching enzyme" binden, genauso wie Antikörper gegen Phosphorylase b, hauptsächlich an die I-Bandenregion von Myofibrillen (47, 48, 133). Es ist interessant, dass diese beiden Enzyme des Glykogenabbaus zusammen mit Myomesin extrahiert und bis zu einem fortgeschrittenen Stadium mitgereinigt werden können. Ein räumlicher Zusammenhang zwischen Enzymen, die letztlich der Gewinnung von chemischer Energie dienen und der Myofibrillenstruktur, deren wichtigste Aufgabe die Umsetzung chemischer in mechanische Energie ist, wäre nicht unlogisch. Es wurde schon festgestellt, dass Phosphorylase und "debranching enzyme" zusammen mit ihrem Substrat, Glykogen, einen Komplex bilden können (88, 127) und so als strukturelle und funktionelle Einheit an gewisse Regionen der Myofibrillen binden könnten (47, 48).

Nach der Abtrennung von "debranching enzyme" und von Phosphorylase b bleibt auf SDS-Gelen von Myomesin manchmal eine schwache Bande im Molekulargewichtsbereich um 100.000 zurück. Bei diesem Protein handelt es sich nicht um eine zurückgebliebene Phosphorylase-b-Kontamination, da sie auch durch wiederholte Affinitätschromatographie auf AMP-Sepharose nicht zum Verschwinden gebracht werden konnte. In einer kürzlich erschienenen Arbeit über die Reinigung des  $M_r$  165.000 M-Proteins aus Froschmuskeln wird die Anwesenheit eines kontaminierenden Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 105.000 erwähnt, bei dem es sich mit ziemlich grosser Sicherheit um  $\alpha$ -Aktinin handelt (18). Die Anwesenheit von Spuren von  $\alpha$ -Aktinin in Myomesin-Präparationen könnte als Erklärung dafür

dienen, dass in der Immunfluoreszenzlokalisierung mit Antikörpern gegen solche Präparationen manchmal eine gewisse Markierung der Z-Linie beobachtet werden kann. Andererseits führt die Verdauung von Myomesin mit Trypsin oder Chymotrypsin zu stabilen Abbauprodukten mit Molekulargewichten von 109.000 (84) bzw. 100.000 (80). Deshalb wäre es auch möglich, dass die beobachtete Kontaminante der Myomesin-Präparation einem proteolytischen Abbauprodukt entspricht. Auch wenn nämlich die Reinigung von Myomesin so schnell und sorgfältig wie möglich durchgeführt wird, treten auf SDS-Gelen von Myomesin mehrere schneller wandernde Banden in unterschiedlicher Häufigkeit auf. Zumindest von den zwei prominentesten dieser Banden kann aufgrund der Peptidanalyse mit ziemlicher Sicherheit gesagt werden, dass sie proteolytische Abbauprodukte von Myomesin darstellen.

Neben Myomesin - und natürlich Myosin, insbesondere LMM - ist MM-CK das einzige Protein, von dem angenommen werden darf, dass es sich um ein "echtes" Protein der M-Linienstruktur handelt (48, 89, 137, 142, 143). Nur etwa 3 - 5 % der totalen MM-CK in den Muskelzellen ist allerdings fest an die Myofibrillenstruktur gebunden; der grösste Teil der CK liegt in löslicher Form im Zytoplasma vor (143). Demgegenüber liegt Myomesin, das nur ca. 0,3 % der Masse der myofibrillären Proteine ausmacht, ausschliesslich strukturgebunden in den Myofibrillen vor (siehe auch 2.4.1.).

Die Herzmuskelmyofibrillen aus dem Huhn zeigen - als Ausnahme unter den Vertebraten - keine elektronendichte M-Linie (120, 141). Interessanterweise findet man auch keine MM-CK in diesen Muskeln. Anstelle von MM-CK enthalten die Hühner-Herzmuskeln BB-CK, die jedoch mittels

der Immunfluoreszenz-Technik vorwiegend in der I-Bandenregion und weniger in der H-Zone der Myofibrillen lokalisiert werden kann (141). Myomesin hingegen, bzw. ein mit Antikörpern gegen Brustmuskelyomesin kreuzreagierendes Antigen, kommt auch im Hühner-Herzmuskel vor. Mittels der Immunfluoreszenz-Technik sowie durch Immun-Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass dieses "Herzmyomesin" in der Mitte der H-Zone lokalisiert ist, also genau in derjenigen Region, in der sich in den Skelettmuskeln die sichtbare M-Linie befindet. Das Herzmuskelyomesin ist aber wahrscheinlich nicht identisch mit dem Brustmuskelyomesin, wie aufgrund von Doppelimmundiffusionstests gezeigt werden konnte. Das Molekulargewicht ist jedoch für die Proteine aus der Skelett- und der Herzmuskulatur sehr ähnlich, so dass es sich möglicherweise um zwei Isoproteine handelt. Damit stellt sich sofort die Frage, ob es allenfalls noch weitere "Isomyomesine" in anderen Gewebetypen gibt (siehe dazu Abschnitt 2.4.1.).

Herzmuskelyomesin scheint noch stärker in der Myofibrillenstruktur gebunden zu sein als Brustmuskelyomesin; dies zeigt sich vor allem dann, wenn man versucht, das Herzmuskelyomesin nach der für die Reinigung von Brustmuskelyomesin verwendeten Methode zu präparieren. Myomesin wird praktisch quantitativ zusammen mit Aktomyosin ausgefällt, wenn der Herzmuskel-Hochsalzextrakt gegen Puffer B dialysiert wird, während Brustmuskelyomesin beim selben Schritt im Ueberstand zurückbleibt und so vom Aktomyosin abgetrennt werden kann.

Die Anwesenheit von Myomesin in einem Muskeltyp, der keine stark elektronendichte M-Linie zeigt, deutet darauf hin, dass das Vorkommen von Myomesin und das Auftreten einer sichtbaren M-Linie nicht direkt miteinander

korrelieren. Der Hauptanteil der Elektronendichte der M-Linie ist viel eher der MM-CK zuzuschreiben. Dies geht unter anderem daraus hervor, dass die sichtbare M-Linie aus Brustmuskelmyofibrillen verschwindet, wenn MM-CK spezifisch mit Fab-Fragmenten von anti-MM-CK-IgG extrahiert wird (142). Auch die Extraktion in "Niedrigsalzpuffer" führt zum Verschwinden der sichtbaren M-Linie unter gleichzeitigem Herauslösen von MM-CK (sowie von anderen Proteinen). Nach beiden Extraktionsmethoden kann Myomesin hingegen weiterhin in der H-Zone dieser "M-linienfreien" extrahierten Myofibrillen lokalisiert werden. Eine weitere Bestätigung für die feste Bindung von Myomesin in der H-Zone von Brust- und Herzmuskelmyofibrillen geht aus der Tatsache hervor, dass Fab-Fragmente von anti-Myomesin-IgG - im Gegensatz zu den monovalenten Antikörpern gegen MM-CK - ihr homologes Antigen nicht aus der Myofibrillenstruktur herauszulösen vermögen. Monovalente Antikörper gegen Myomesin vermögen Myomesin nicht einmal dann quantitativ aus der M-Linienregion herauszulösen, wenn Myomesin vorher besser "zugänglich" gemacht worden ist, d.h. wenn die MM-CK vorher spezifisch mit Fab-Fragmenten von anti-MM-CK-IgG oder mit "Niedrigsalzpuffer" extrahiert worden ist.

Offenbar besitzen Myomesin und MM-CK voneinander verschiedene Bindungsstellen in der M-Linienregion; die Extrahierbarkeit von MM-CK aus Brustmuskelmyofibrillen durch Fab-Fragmente von anti-MM-CK-IgG wird z.B. durch Vorinkubation der Myofibrillen mit Antikörpern gegen Myomesin (ganze IgG-Moleküle oder Fab-Fragmente) nicht wesentlich eingeschränkt. Demgegenüber kann die spezifische Extrahierbarkeit von MM-CK fast vollständig inhibiert werden, wenn die MM-CK-Moleküle vorher durch Komplexierung mit den homologen anti-MM-CK-IgG-Molekülen blockiert werden.



Auch wenn eine direkte Interaktion zwischen Myomesin und MM-CK sehr wohl möglich ist (ihr Vorkommen wurde schon von einer Arbeitsgruppe beschrieben (78)), so scheint die Interaktion von Myomesin mit der übrigen Struktur der M-Linienregion, vermutlich vor allem mit den Myosinfilamenten selbst, noch bedeutend stärker zu sein. Das Vorkommen einer starken Interaktion von Myomesin und isoliertem Myosin in vitro wurde ebenfalls schon beschrieben (79, 80, 84).

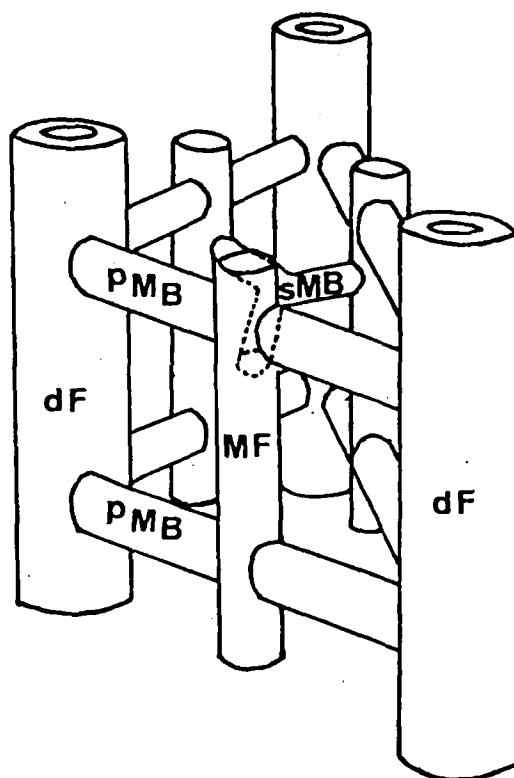
Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate bestätigen die Vermutung, dass Myomesin eine starke Affinität zu den Myosinfilamenten besitzt und zeigen eindeutig, dass Myomesin ein "echtes" Strukturprotein der myofibrillären M-Linienregion darstellt.

#### 1.4.2. Die M-Linienregion von Hühner-Skelettmuskelmyofibrillen

Aus den beiden bisher bekannt gewordenen Modellen für den ultrastrukturellen Aufbau der M-Linie von Skelettmuskelmyofibrillen (67, 76) geht hervor, dass ausser den Myosinfilamenten noch mindestens drei weitere strukturelle Komponenten postuliert werden müssen. Bei diesen handelt es sich um sogenannte primäre und sekundäre M-Brücken sowie um M-Filamente. Höchstwahrscheinlich werden diese verschiedenen Strukturen durch verschiedene Proteine gebildet. Damit wird klar, dass in Skelettmuskeln neben Myosin mindestens drei weitere M-Linienproteine zu erwarten sind. Bis jetzt kann aber erst von zwei Proteinen, nämlich von MM-CK und von Myomesin, mit einiger Sicherheit angenommen werden, dass es sich um wirkliche Strukturproteine der M-Linienregion handelt. Die Suche nach weiteren M-Linienproteinen ist deshalb

noch keineswegs abgeschlossen. Trotzdem kann man aufgrund der bis jetzt bekannten biochemischen und ultrastrukturellen Daten über die M-Linie versuchen, gewisse (hypothetische!) Zuordnungen von bestimmten Proteinen zu bestimmten Strukturen der M-Linie vorzunehmen.

Auf dünnen Querschnitten durch die M-Linie von Skelettmuskelmyofibrillen erkennt man häufig Strukturen, die offenbar jedes Myosinfilament mit seinen sechs Nachbar-myosinfilamenten verbinden und die ursprünglich als "M-Brücken" bezeichnet wurden (38, 96, 121). Da diese M-Brücken im Register angeordnet sind, können sie auch auf hochauflösenden elektronenmikroskopischen Bildern von Längsschnitten durch die Myofibrillen als 3 - 5 senkrecht zu den Myosinfilamenten verlaufende Streifen gesehen werden (67, 116, 117). Genauere Analysen von Quer- und Längsschnitten zeigten, dass die M-Brücken-Verbindung zwischen zwei benachbarten Myosinfilamenten in der Mitte durch eine weitere Struktur, ein sogenanntes M-Filament, unterbrochen wird (67, 128). Die M-Filamente liegen parallel zu den Myosinfilamenten und erstrecken sich nicht nur über die Breite der M-Linie, sondern möglicherweise über die ganze H-Zone (67). Zwei benachbarte Myosinfilamente werden also eigentlich durch zwei M-Brücken miteinander verbunden, die ihrerseits in der Mitte zwischen den Myosinfilamenten mit einem M-Filament interagieren. Später wurde dann noch eine dritte Komponente beschrieben, die als Y-förmige Struktur jeweils drei M-Filamente miteinander verbindet und die als "sekundäre" M-Brücke bezeichnet wurde (76), weil sie wie die oben beschriebenen "primären" M-Brücken senkrecht zu den Myosinfilamenten steht. Zur Veranschaulichung dieses Modells wird in Figur 23 das von Luther und Squire (76) vorgeschlagene Schema des ultrastrukturellen Aufbaus der M-Linie wiedergegeben.



Figur 23: Schematische Darstellung des ultrastrukturellen Aufbaus der M-Linie nach Luther und Squire (76).

dF: "dickes" (Myosin-) Filament; pMB: "primäre" M-Brücke; sMB: "sekundäre" M-Brücke; MF: M-Filament.

Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von ultradünnen Gefrier-Längsschnitten durch Skelettmuskelfibrillen konnte eine ganze Anzahl von senkrecht zu den Myosinfilamenten verlaufenden Linien in der H-Zone festgestellt werden (116, 117). Die prominentesten dieser Linien (es sind meist 3 - 5) befinden sich in der eigentlichen M-Linie und sind - wie oben erwähnt - auf die primären M-Brücken zurückzuführen. Diese Linien, d.h. also die primären M-Brücken, sind für den grössten Teil der Elektronendichte der M-Linie verantwortlich. Da mit der spezifischen Extraktion der MM-CK durch monovalente Antikörper gegen MM-CK die sichtbare M-Linie aus Brustmuskelfibrillen verschwindet (142), ist die Zuordnung

von MM-CK zu den primären M-Brücken sehr naheliegend. Messungen von Sjöström und Squire (116) an Aufnahmen von Schnitten durch menschlichen Skelettmuskel (m. tibialis anterior) zeigen, dass die den primären M-Brücken zugeschriebenen Linien (Linien 1 und 4 in (116) etwa 22 nm auseinanderliegen. Eine M-Linie, die wie diejenige von Hühner-Brustmuskelfibrillen ca. 40 nm breit ist, würde demnach 3 Reihen von primären M-Brücken aufweisen. Dies würde auch mit der Tatsache übereinstimmen, dass (schnell zuckende) Typ II-Muskelfasern gewöhnlich drei starke M-Brücken-Linien zeigen (116). Durch die Inkubation von Hühner-Brustmuskelfibrillen mit Antikörpern gegen MM-CK wird die M-Linie stark markiert (141, 142); die Markierung erstreckt sich aber nicht wesentlich über die Breite (ca. 40 nm) der eigentlichen M-Linie hinaus, womit ein weiteres Argument für eine Zuordnung von MM-CK zu den primären M-Brücken gegeben ist. Ein dritter Hinweis auf die mögliche Beteiligung von MM-CK am Aufbau der primären M-Brücken stammt von biophysikalischen Studien, aus denen hervorgeht, dass eine Interaktion von MM-CK und Myosin in vitro möglich ist (5, 54). Damit erfüllt MM-CK eine weitere an ein primäres M-Brücken-Protein zu stellende Anforderung. Der endgültige Beweis für die Zuordnung von MM-CK zu den primären M-Brücken kann aber nur erbracht werden, wenn es z.B. gelingt zu zeigen, dass nach der spezifischen Entfernung von MM-CK auf dünnen Serieschnitten durch die M-Linienregion keine primären M-Brücken mehr vorhanden sind bzw. auf Längsschnitten die den primären M-Brücken zugeschriebenen Hauptlinien (M1 und M4 in (116)) fehlen.

Die Inkubation von Brustmuskelfibrillen mit Antikörpern gegen Myomesin führt zu einer dichten, regelmässigen, auf beiden Seiten klar begrenzten Markierung in

der Mitte der H-Zone, wobei die Antikörperablagerung signifikant breiter ist als diejenige mit Antikörpern gegen MM-CK. Mit ihren durchschnittlich 60 nm Breite erstreckt sie sich um je ca. 10 nm über die Breite der eigentlichen M-Linie (ca. 40 nm) hinaus.

Kürzlich wurde beschrieben, dass eine Interaktion zwischen Myomesin und Myosin in vitro möglich ist, wobei Myomesin offenbar mit dem S2-Fragment von Myosin einen starken 1 : 1-Komplex bildet (79). Wegen der antiparallelen Anordnung der Myosinmoleküle in der Mitte der H-Zone (56) kommen die S2-Portionen dieser Moleküle ausserhalb der eigentlichen M-Linie an den Rand der myosinköpfchenfreien Zone zu liegen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass eine Ablagerung von Antikörpern gegen Myomesin auch ausserhalb der M-Linie bis an den Rand der H-Zone vorkommt. Es stellt sich aber sofort die Frage, weshalb sich die Markierung mit Antikörpern gegen Myomesin einerseits auch über die ganze Breite der eigentlichen M-Linie erstreckt, obwohl dort nur die LMM-, aber keine S2-Portionen von Myosin zu erwarten sind, sich aber andererseits nicht über die H-Zone hinaus in die A-Bande hinein fortsetzt, obwohl die Myosinfilamente auch dort die S2-Portionen von Myosin aufweisen.

Myomesinmoleküle können offenbar unter bestimmten Bedingungen (z.B. in Puffern niedriger Ionenstärke und in Abwesenheit von DTT) miteinander aggregieren (78, 84, 133). Somit besteht die Möglichkeit, dass mehrere Myomesinmoleküle, zu einem länglichen Filament aggregiert, die ganze M-Linienregion durchziehen, was dann für die beobachtete durchgehende Antikörperablagerung mit anti-Myomesin-IgG verantwortlich sein könnte. Mani und Kay (78) berechneten aufgrund von Zirkulardichroismussmessungen einen relativ hohen Anteil (ca. 35 %) an  $\beta$ -Struktur

für das Myomesinmolekül, was als Indiz für eine filamentöse Tertiärstruktur dieses Proteins dienen könnte. Damit würden möglicherweise sehr wenige Myomesinmoleküle genügen, um die ganze Breite der M-Linienregion zu durchziehen.

Für die Tatsache, dass Myomesin in der A-Bande ausserhalb der H-Zone nicht nachgewiesen werden kann, können mehrere Gründe angeführt werden. Der von der Anordnung in der H-Zone verschiedene Aufbau der Myosinfilamente in der übrigen A-Bande, z.B. die periodisch hervorstehenden Myosinköpfchen, sowie die Anwesenheit von Aktinfilamenten könnten die Bindung von Myomesin an die Myosinmoleküle verunmöglichen. Andererseits ist es denkbar, dass Myomesin zwar auch in der Ueberlappungszone von Aktin- und Myosinfilamenten vorhanden ist, dass es aber dort für Antikörper (sowohl für IgG-Moleküle als auch für die entsprechenden Fab-Fragmente) unzugänglich ist. Aufschluss über diese Frage kann man sich vielleicht von Studien erhoffen, bei denen man Myomesin, das vorher z.B. mit einem Fluoreszenzstoff markiert worden ist, in lebende Muskelzellen injiziert und dann seinen Einbau in die Myofibrillenstruktur verfolgt.

Aufgrund der oben geschilderten Tatsachen könnte man sich Myomesin gut als dasjenige Protein vorstellen, welches die M-Filamente bildet. Die M-Filamente erstrecken sich gemäss Knappeis und Carlsen (67) möglicherweise über die Breite der eigentlichen M-Linie hinaus, was gut mit der beobachteten Antikörperlokalisierung von Myomesin übereinstimmen würde. Andererseits beschreibt keines der bisher bekannten M-Linien-Modelle (67, 76) eine direkte Interaktion der M-Filamente mit den Myosinfilamenten, was aber offenbar zutreffen müsste, wenn die M-Filamente Myomesin enthalten würden. Es ist aller-

dings möglich, dass die M-Filamente auf der Höhe der eigentlichen M-Linie (deren Ultrastruktur die Modelle von Knappeis und Carlsen (67) und Luther und Squire (76) ja beschreiben) parallel zu den Myosinfilamenten verlaufen (welche dort nur LMM-Teile von Myosin enthalten) und erst ausserhalb der M-Linie auf der Höhe der S2-Portionen der Myosinmoleküle mit diesen interagieren.

Myomesin kann offenbar in vitro auch mit MM-CK interagieren (78). Damit erfüllt dieses Protein eine weitere Bedingung, die gemäss den beschriebenen Modellen (67, 76) an ein M-Filament-Protein gestellt werden muss, nämlich die Fähigkeit, direkt mit den primären M-Brücken (die in unserem Modell ja vorwiegend aus MM-CK bestehen sollen) zu interagieren.

Eine Zuordnung von Myomesin zu den sekundären M-Brücken ist jedenfalls bedeutend weniger wahrscheinlich, da diese Strukturen gemäss Luther und Squire (76) die M-Filamente nur innerhalb der eigentlichen M-Linie und dort nur an ganz bestimmten Orten (M3, eventuell auch M1 in (76)) miteinander verbinden. Weiterhin sieht das Modell von Luther und Squire (76) keine direkte Interaktion der sekundären M-Brücken mit den Myosinfilamenten vor.

Die Inkubation von Myofibrillen in "Niedrigsalzpuffer" könnte neben der Extraktion von MM-CK auch das Herauslösen von einem (oder mehreren) weiteren M-Linienprotein zur Folge haben. Dadurch könnten die M-Filamente, z.B. nach dem Verlust der sekundären M-Brücken, ihren Zusammenhalt in der Mitte der H-Zone verlieren, "zerreißen" und danach nur noch auf beiden Seiten der M-Linienregion an den Myosinfilamenten "hängenbleiben", was dann (unter der Annahme, dass Myomesin wirklich ein Protein der M-Filamente darstellt) zum beobachteten Lokalisierungsmuster von Myomesin in zwei unabhängigen Streifen führen

würde. Die Tatsache, dass unter Niedrigsalzbedingungen auch ein Teil des Myomesins aus Myofibrillen extrahiert werden kann, müsste im obigen Modell damit erklärt werden, dass jedes M-Filament mehrere Myomesinmoleküle enthält, wobei dann beim geschilderten "Zerreißen" die mittleren Moleküle herausgelöst würden und nur die "randständigen" an die Myosinfilamente bindenden Moleküle zurückbleiben würden.

Bei der Extraktion von Myofibrillen mit monovalenten Antikörpern gegen MM-CK wird spezifisch nur die MM-CK entfernt, die gemäss der eingangs aufgestellten Hypothese am Aufbau der primären M-Brücken beteiligt ist. Nimmt man an, dass die M-Filamente und die sekundären M-Brücken durch diese Extraktion nicht wesentlich beeinflusst werden, so kann man sich vorstellen, dass die M-Filamente weiterhin in der Mitte der M-Linie durch die sekundären M-Brücken zusammengehalten werden und so die ganze M-Linienregion durchziehen. Antikörper gegen das oben postulierte "M-Filament-Protein" Myomesin müssten dann die M-Filamente - wie in unbehandelten Myofibrillen - auf ihrer ganzen Länge markieren. Ein solches Markierungsmuster wird auch tatsächlich beobachtet.

Die Studie von Sjöström und Squire (116) an ultradünnen Gefrier-Längsschnitten durch Skelettmuskeln verschiedenen Typs und aus verschiedenen Vertebraten-Spezies zeigt, dass die Anzahl der auf die primären M-Brücken zurückzuführenden Hauptlinien variieren kann und für die Spezies, den Muskel- und den Fasertyp charakteristisch ist. Zum heutigen Zeitpunkt kann nicht gesagt werden, ob alle Skelettmuskeltypen von Vertebraten den gleichen "Satz" von ultrastrukturellen Komponenten in der M-Linienregion ihrer Myofibrillen aufweisen. Die oben vorgenommene Zuordnung von bestimmten Proteinen



(MM-CK, Myomesin) zu einzelnen strukturellen Elementen (primäre M-Brücken, M-Filamente) muss deshalb mit größter Vorsicht aufgenommen werden.

#### 1.4.3. Die M-Linienregion von Hühner-Herzmuskelmyofibrillen

Ueber den strukturellen Aufbau der H-Zone von Herzmuskelmyofibrillen ist bedeutend weniger bekannt als über denjenigen von Skelettmuskelmyofibrillen. Auch für Herzmuskelmyofibrillen gilt jedoch die Annahme, dass ihre Myosinfilamente die Myosinmoleküle in der charakteristischen, in der Mitte bipolaren Anordnung enthalten, so dass in der Mitte der H-Zone nur die LMM-Teile der Myosinmoleküle zu erwarten sind. Obwohl eine sichtbare, elektronendichte M-Linie in den quergestreiften Muskeln (d.h. in den Skelett- und in den Herzmuskeln) der meisten höheren Vertebraten gefunden wird, bildet gerade das Huhn hierin eine Ausnahme. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Schnitten durch Hühner-Herzmyofibrillen fehlt nämlich eine deutliche M-Linie (120, 141). Auch wenn man diese Beobachtung darauf zurückführt, dass die elektronendichte M-Linie bei der Präparation der Muskeln für die Elektronenmikroskopie zerstört worden sein könnte, so müssten sich auch in diesem Falle die Hühner-Herzmyofibrillen von denjenigen anderer Vertebraten unterscheiden, da bei letzteren die M-Linie bei gleicher Präparationstechnik nicht verschwindet.

Interessanterweise bildet in adulten Hühner-Herzmuskeln - anders als in den Hühner-Skelettmuskeln (27, 28) und in den Skelett- und Herzmuskeln der meisten Säugetiere (29) - die BB- und nicht die MM-Form das vorwiegende Kreatinkinase-Isoenzym (15). Mittels der indirekten Im-

munfluoreszenz-Technik wurde BB-CK jedoch vorwiegend in der I-Bandenregion und weniger in der H-Zone der Hühner-Herzmyofibrillen lokalisiert (141). Das Fehlen einer elektronendichten M-Linie in diesen Myofibrillen sowie das Fehlen von MM-CK in Hühner-Herzmuskeln (27, 30, 141) gibt einen weiteren (indirekten) Hinweis auf die unter 1.4.2. gemachte Feststellung, dass MM-CK für den grössten Teil des elektronendichten Materials der M-Linie verantwortlich ist. Weiterhin impliziert diese Tatsache, dass in der H-Zone von Hühner-Herzmyofibrillen keine primären M-Brücken vorkommen. Dass die Zuordnung von MM-CK zur elektronendichten M-Linie auch in Herzmuskelmyofibrillen ihre Gültigkeit hat, wurde z.B. kürzlich in einer Studie an Herzmuskeln aus Rindern gezeigt (49, 50). Um zu beweisen, dass den Hühner-Herzmuskelmyofibrillen primäre M-Brücken fehlen bzw. dass die Herzmuskelmyofibrillen aus anderen Spezies wirklich solche Strukturen aufweisen, sind sicherlich detaillierte ultrastrukturelle Analysen von Quer- und Längsschnitten durch die entsprechenden Myofibrillen erforderlich. Bisher gibt es leider keine genügend guten Studien dieser Art, was zum Teil auf die Schwierigkeiten bei der Präparation von geeigneten, genügend relaxierten Herzmuskel Fasern zurückzuführen sein dürfte.

Ueber das Vorkommen von weiteren strukturellen M-Linien-Elementen (wie z.B. den in Skelettmuskelmyofibrillen identifizierten M-Filamenten und den sekundären M-Brücken) in Herzmuskelmyofibrillen können aus den oben genannten Gründen keine Angaben gemacht werden. Die Tatsache, dass Hühner-Herzmyofibrillen Myomesin enthalten, ist jedoch von grossem Interesse. Myomesin stellt neben Myosin das einzige bisher bekannte Protein der M-Linienregion von Hühner-Herzmuskelmyofibrillen dar. Die Mar-

kierung mit Antikörpern gegen Myomesin erstreckt sich in den Herzmyofibrillen über einen grossen Teil der H-Zone und bildet so eine regelmässige, breite, elektrodichte Ablagerung, die derjenigen in gleich inkubierten Skelettmuskelmyofibrillen sehr ähnlich ist. Daraus kann man den Schluss ziehen, dass die ultrastrukturelle Anordnung von Myomesin in der M-Linienregion von Skelett- und Herzmuskelmyofibrillen möglicherweise sehr ähnlich ist. Andererseits ist darauf hinzuweisen, dass sich sowohl Myosin als auch Myomesin aus dem Herzmuskel von den entsprechenden Proteinen aus dem Skelettmuskel in einigen Eigenschaften (z.B. in einigen antigenischen Determinanten) unterscheiden. Dies könnte Konsequenzen haben für die jeweilige Konformation dieser Proteine und damit auch für ihre räumliche Anordnung in einer komplexen Struktur wie derjenigen der M-Linienregion. So ist es z.B. bemerkenswert, dass die Interaktion von Herzmyomesin mit Herzmyosin noch bedeutend stärker zu sein scheint als diejenige der beiden Skelettmuskelproteine. Wie bei einem Vergleich der beiden CK-Isoenzyme MM-CK und BB-CK zeigt sich auch hier, dass (vermutlich) relativ kleine Unterschiede in den molekularen Eigenschaften zweier Isoproteine zu recht drastischen Unterschieden in Eigenschaften wie z.B. der intrazellulären Lokalisierung oder eventuell auch der Funktion führen können. In diesem Zusammenhang muss ein weiteres, sehr aufschlussreiches Experiment erwähnt werden, in welchem Hühner-Herzmuskelmyofibrillen mit exogener, "gewebefremder" MM-CK aus Hühner-Skelettmuskeln inkubiert wurden (143). Als Resultat ergab sich die Bildung einer "künstlichen" M-Linie, d.h. eine Markierung in der Mitte der H-Zone, in einer Region also, in der man MM-CK in Hühner-Skelettmuskelmyofibrillen, aber auch in Herzmuskelmyofibrillen aus anderen Spezies erwartet. Offenbar be-

sitzen auch die Herzmyofibrillen aus dem Huhn in der Mitte ihrer H-Zone Bindungsstellen, die spezifisch sind für MM-CK (nicht aber für BB-CK). MM-CK unterscheidet sich von BB-CK offensichtlich dadurch, dass sie mit gewissen Strukturen der myofibrillären H-Zone, z.B. mit den Myosinfilamenten (89), aber auch mit isolierten Proteinen der M-Linienregion wie z.B. Myosin (5, 54) und Myomesin (78) interagieren kann.

Auf die mögliche Bedeutung des Vorkommens bzw. Fehlens gewisser M-Linienproteine (wie der MM-CK) für den Aufbau und die Funktion der M-Linienregion von verschiedenen Myofibrillentypen wird im nächsten Abschnitt (1.4.4.) eingegangen. Sicher ist, dass erst mit einem besseren Verständnis des Aufbaus der M-Linienregion von Hühner-Herzmuskelmyofibrillen die Voraussetzung geschaffen werden kann, um die Lokalisierung von möglichen M-Linienregion-Proteinen sowie deren Zuordnung zu einzelnen ultrastrukturellen Elementen in diesem Muskeltyp genauer kennenzulernen.

#### 1.4.4. Funktion der M-Linie

Aufgrund der ultrastrukturellen Daten über den Aufbau der M-Linie wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Struktur - wie diejenige der Z-Linie (66) - dazu beitragen könnte, die korrekte Ordnung der Myofilamente in den Myofibrillen aufrechtzuerhalten (67, 99). Um die richtige Anordnung der Myosinfilamente sowohl in der Längs- als auch in der Querrichtung gewährleisten zu können, muss die M-Linienstruktur aber gewisse Anforderungen erfüllen, die sich aus den beobachteten räumlichen Veränderungen innerhalb eines Sarkomers während des Kontraktions-/Relaxationszyklus ergeben. So bleibt

das Volumen eines Sarkomers unabhängig vom Kontraktionsgrad offenbar konstant (23-25), was bedeutet, dass die Distanz zwischen den Myosinfilamenten bei einer Verkürzung des Sarkomers zunehmen muss. So nimmt beispielsweise der Abstand zwischen zwei benachbarten Myosinfilamenten (von Mitte zu Mitte gemessen), der bei einer Sarkomerlänge von  $2,8 \mu\text{m}$   $42 \text{ nm}$  beträgt, bei einer Verkürzung des Sarkomers auf  $2,0 \mu\text{m}$  um ca.  $8 \text{ nm}$  zu (57)! Damit müssten die primären M-Brücken, welche die Myosinfilamente miteinander verbinden (38, 67, 76, 96, 121) zu einer reversiblen Ausdehnung fähig sein. Dies könnte dadurch zustandekommen, dass die einzelnen M-Brücken-Moleküle (gemäss unserer Hypothese MM-CK!) abhängig vom jeweiligen Kontraktionszustand reversible Konformationsänderungen durchmachen können oder aber dadurch, dass mehrere (eventuell verschiedene!) Moleküle eine einzige primäre M-Brücke aufbauen, in welcher sie dann in einer Art "Gleitmechanismus" die notwendigen Längenveränderungen durchführen können (21, 69).

Das Erscheinungsbild der M-Brücken auf Querschnitten durch die M-Linie ist offenbar tatsächlich für einen gewissen Bereich von Sarkomerlängen ähnlich (67, 100). Auf Querschnitten durch stark kontrahierte oder stark gedehnte Sarkomere sind die M-Brücken jedoch nur schwer nachzuweisen oder fehlen sogar ganz (67). Knappes und Carlsen (67) bemerken allerdings dazu, dass die Anordnung der Myosinfilamente in überdehnten Sarkomeren nicht mehr gleich regelmässig ist wie in Sarkomeren "normaler" Länge. Dieselben Autoren (67) führen als Bestätigung des Zusammenhangs zwischen sichtbarer M-Linie und Ordnung der Myosinfilamente das Beispiel von "langsamen" Muskelfasern an, denen eine deutliche M-Linie fehle und deren Myosinfilamente entsprechend weniger regelmässig angeordnet seien.

Auf Unterschiede in der M-Linienstruktur in Abhängigkeit von der Sarkomerlänge wurde auch aus biochemischen Experimenten geschlossen. So beschrieben Kundrat und Pepe (69), dass ihr Niedrigsalzpuffer die sichtbare M-Linie schon nach 15 Min. vollständig aus Sarkomeren zu entfernen vermochte, die länger als  $2,1 \mu\text{m}$  waren. Inkubation von Myofibrillen mit Sarkomerlängen von weniger als  $1,9 \mu\text{m}$  im selben Puffer führte aber auch nach deutlich längerer Extraktionszeit (bis zu 3 Std.) nicht zu einem Verschwinden der sichtbaren M-Linie. Als Erklärung für diese Resultate wurden Unterschiede im Löslichkeitsverhalten verschieden langer M-Brücken vorgeschlagen (21).

Die Hypothese, nach welcher den primären M-Brücken eine entscheidende Bedeutung für die richtige Anordnung der Myosinfilamente in der A-Bande sowohl in der Ruhephase als auch während des Kontraktions-/Relaxationszyklus der Myofibrillen zukommt, muss heute aufgrund neuerer Resultate wieder in Frage gestellt werden. So zeigen die Hühner-Herzmyofibrillen keine sichtbare M-Linie; dennoch liegen die Myosinfilamente in der A-Bande ihrer Sarkomere in der charakteristischen, sehr regelmässigen Anordnung vor. Aus der Abwesenheit einer sichtbaren M-Linie wurde schon unter 1.4.3. auf das mögliche Fehlen von primären M-Brücken in den Myofibrillen dieses Muskeltyps geschlossen. In Uebereinstimmung mit der Zuordnung von MM-CK zu den primären M-Brücken fehlt dieses Isoenzym in den Hühner-Herzmuskeln.

Zudem ist der Tatsache Beachtung zu schenken, dass sich die Anzahl der auf die primären M-Brücken zurückzuführenden Linien (d.h. die Anzahl der Reihen von primären M-Brücken) von Spezies zu Spezies, von Muskel zu Muskel und von Fasertyp zu Fasertyp unterscheidet (116, 117). Die Anwesenheit und die Anzahl der Reihen von primären

M-Brücken (d.h. also die Anwesenheit sowie die Breite einer sichtbaren M-Linie) ist daher möglicherweise keine strukturelle Notwendigkeit für die "richtige" Anordnung der Myosinfilamente in der A-Bande, sondern stellt eher eine funktionelle Anpassung an dynamische Eigenschaften des jeweiligen Muskeltyps dar. Der vermutete Zusammenhang zwischen MM-CK einerseits und elektronendichter M-Linie bzw. primären M-Brücken andererseits lässt sich gut mit einer solchen Funktion vereinbaren. MM-CK ist für die Regeneration von ATP aus ADP und Kreatinphosphat verantwortlich. ATP seinerseits dient bei der Kontraktion als chemischer Energielieferant. Das Vorkommen von MM-CK in strukturegebundener Form in der M-Linie könnte einen effizienten Nachschub von ATP für die Muskelkontraktion garantieren. Unter der Annahme, dass die CK-Moleküle nicht frei in den intramyofibrillären Raum eindringen können, ist die Anwesenheit einer bestimmten Menge strukturegebundener MM-CK sogar von noch grösserer Wichtigkeit für eine schnelle und in der räumlichen Nähe des Verbrauchs stattfindende Regeneration von ATP (30, 140, 143). Die Menge der M-Linien-CK könnte damit eine spezifische Adaptation jeder einzelnen Muskelfaser an die jeweiligen physiologischen Anforderungen darstellen. Sie würde deshalb je nach Spezies, Muskel- und Fasertyp variieren und von Eigenschaften wie Kontraktionsgeschwindigkeit, Kraftentwicklung sowie von biochemischen Parametern für die Energiegewinnung wie Glykogenverfügbarkeit, Anzahl von Mitochondrien etc. abhängen. In diesem Zusammenhang wäre es von grossem Interesse zu untersuchen, ob kontinuierliche elektrische Stimulation von bestimmten Muskelfasern in einer definierten Art zu einem in Uebereinstimmung mit dem neuen Kontraktionstyp stehenden veränderten M-Linienmuster führen würde. Neben dieser physiologisch-adaptiven Rolle kann aber aufgrund

der heute zur Verfügung stehenden Daten auch eine strukturelle Funktion der primären M-Brücken nicht ausgeschlossen werden; auch die erforderliche "Ordnung" in der H-Zone der Myofibrillen könnte je nach Fasertyp variieren.

Dass die wichtigste Funktion der M-Linienstruktur (vielleicht eben mit Ausnahme der MM-CK) darin bestehen könnte, die Aufrechterhaltung der korrekten Anordnung der Myofilamente im Sarkomer sowohl in der Längs- als auch in der Querrichtung zu gewährleisten, ist nach wie vor eine attraktive Hypothese. Nur muss man aufgrund der heute zur Verfügung stehenden Daten ganz klar unterscheiden zwischen sichtbarer, elektronendichter M-Linie (die vorwiegend aus MM-CK zu bestehen scheint) und der auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Längsschnitten im Normalfall "unsichtbaren" eigentlichen "M-Linienstruktur" in der Mitte der H-Zone von quergestreiften Myofibrillen.

Das Netzwerk der M-Linienstruktur (beispielsweise die M-Filamente und die sekundären M-Brücken) bildet eine Art "Käfig", der möglicherweise verhindert, dass sich die Myosinfilamente ungeordnet gegeneinander verschieben können. Das Verhindern einer "Unordnung" ist vor allem bei dem mit einer Kontraktion einhergehenden Auseinanderrücken dieser Filamente von grosser Bedeutung. Das "Gitter" der M-Linienstruktur könnte auch als eine Art "Führung" für die dünnen (Aktin-) Filamente dienen, wenn diese bei einer Kontraktion in die M-Linienregion eindringen und deshalb nicht mehr von Myosin-Querbrücken in einer festen Position gehalten werden können (67).

Inwieweit die obengenannte Funktion der M-Linienstruktur für die Myofibrillen aller quergestreiften Muskeln verallgemeinert werden darf, hängt weitgehend davon ab,



ob der Aufbau der M-Linienregion in allen diesen Muskeltypen auf dem gleichen grundlegenden Prinzip beruht. Dazu sind aber noch manche vergleichende ultrastrukturelle Studien notwendig, die die verschiedensten Muskeltypen einschliessen müssen (insbesondere auch solche, denen eine elektronendichte M-Linie fehlt).

2. TEIL:  
"MYOMESIN": EIN HOCHSPEZIFISCHER "MARKER" FÜR  
DIE ENTWICKLUNG QUERGESTREIFTER MUSKULATUR

---

2.1. MATERIAL

2.1.1. Chemikalien

Antibiotisch-antimykotische Mischung	Gibco
I- $\beta$ -D-Arabinofuranosyl-Cytosin	Sigma
Bacto-Trypsin 1 : 200	Difco
5-Bromo-2'-Deoxyuridin	Calbiochem
Fluorescein-gekoppeltes Kaninchen-anti-Meerschweinchen-Immunglobulin G	Miles-Yeda
Glutamin 200 mM	Seromed
Kaninchen-anti-Meerschweinchen-Serum	Miles-Yeda
Meerschweinchenserum	Miles-Yeda
Methioninfreies Minimal Essential Medium (Earle)	Seromed
Minimal Essential Medium (Eagle)	Gibco
Permablend III	Packard
Pankreatische Deoxyribonuklease I	Sigma
Pankreatische Ribonuklease	Sigma
<sup>35</sup> S-Methionin (500 Ci/mMol)	New England Nuclear
Soluene 350	Packard
Triton X-100	Serva
Uebrige Chemikalien: siehe 1.1.1.	

**2.1.2. Apparate und Materialien**

Eier-Inkubator	Ehret
Elektronenmikroskop	Siemens Elmiskop.102
Fotomaterial	Agfa, Ilford
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Standard Model B
Gefriermikrotom	American Optical
Glasmesserbrecher	LKB Knifemaker
Kulturschalen	Falcon
Szintillationsspektrometer	Packard Tri-Carb 2650
Trägernetzchen für Ultradünnschnitte	Balzers
Ultramikrotom	LKB Ultratome 4801 A
Zellkulturen-Inkubator	Brouwer

**2.1.3. Tiere**

Befruchtete Hühnereier	Geflügel Wolff, Volketswil/ZH
Hühner	Kneuss, Mägen- wil/AG

## 2.2.       METHODEN

### 2.2.1.     Herstellung von Gewebe-Extrakten

Gewebe wurden bei 0 - 4 °C aus Hühnerembryonen und frisch getöteten adulten Hühnern herausgeschnitten und zerkleinert. Die Gewebestücke wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Ungefähr 0,5 g der Gewebestücke wurden in 1 - 2 ml "Hochsalzpuffer" in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert und dann bei 4 °C während 6 - 12 Std. extrahiert. Das Homogenat wurde während 5 Min. in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Ueberstand (Gewebe-Extrakt) für Doppelimmundiffusionstests weiterverwendet.

### 2.2.2.     Zellkulturen

Herzmuskelzellen aus 8 - 10 Tage alten Hühnerembryonen wurden wie beschrieben (4) präpariert. Skelettmuskelzellen wurden aus den Brustmuskeln und glatte Muskelzellen aus dem Muskelmagen von 10 - 12 Tage alten Hühnerembryonen gewonnen (136). Pro 60-mm Kulturschale wurden  $10^6$  Zellen in 4 ml "Normalmedium" (85 Teile MEM, 10 Teile Pferdeserum, 5 Teile Hühner-Embryoextrakt, ergänzt mit Glutamin und antibiotisch-antimykotischer Mischung (136) ausplattiert. In jede Kulturschale wurden vor dem Aus säen der Zellen 4 - 6 sterilisierte, gelatinisierte Deckgläschen gelegt.

In Suspension wachsende Brustmuskelzellen wurden nach einer früher beschriebenen Methode (106, 107) kultiviert. Fibroblasten erhielt man durch Subkultivierung

der nicht myogenen Zellen aus 72 Std. alten primären Brustmuskel-Zellkulturen, indem die Zellen trypsiniert, durch 10  $\mu\text{m}$  Nylonfilter filtriert (Myotuben werden auf dem Filter zurückgehalten) und wieder in "Normalmedium" ausplattiert wurden (136).

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 - 38 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 %  $\text{CO}_2$  (136).

Um das Ueberwachsen primärer Brustmuskel-Zellkulturen durch Fibroblasten zu verhindern, wurde diesen Kulturen nach einer Inkubationszeit von 48 Std. Ara-C (ein Inhibitor der DNS-Synthese) in einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  zugegeben (35).

In Experimenten, in denen die Fusion, aber nicht die Differenzierung myogener Zellen blockiert werden sollte, wurde dem Kulturmedium EGTA in einer Endkonzentration von 1,73 mM zugegeben (98).

Durch die Zugabe des Thymidin-Analogs BrdUrd in einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Medium konnte die Differenzierung myogener Skelettmuskelzellen unterdrückt werden (94).

### 2.2.3. Indirekte Immunfluoreszenz-Technik an Zellkulturen

Alle Schritte wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt. Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden aus den Kulturschalen genommen und kurz (ca. 5 Min.) in PBS gewaschen. Die Zellen wurden während 30 Min. in 3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  fixiert, während ca. 5 Min. in PBS gewaschen, während 30 Min. in 0,1 M Glycin in PBS inkubiert ("Quenching" der freien Aldehydgruppen) und schliesslich nach Ash et al. (3) während 3 - 5 Min. in 0,2 % (v/v) Triton X-100 in

PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen in PBS (10 - 15 Min.) wurden die Zellen während 15 - 30 Min. auf einem Tropfen (ca. 80  $\mu$ l) Antikörperlösung (anti-Myomesin-IgG: 20  $\mu$ g/ml PBS, IgG aus Kontrollserum: 40  $\mu$ g/ml PBS) inkubiert und dann gründlich in PBS gewaschen (ca. 15 Min., mehrmaliges Wechseln der PBS-Waschlösung). Die Zellen wurden nun während 15 - 30 Min. auf einem Tropfen einer 1 : 50-Verdünnung von sekundären Antikörpern (FITC-gekoppelte Ziegen-anti-Kaninchen-IgG) in PBS inkubiert und schliesslich intensiv in PBS gewaschen (30 - 60 Min.). Die Deckgläschen mit den inkubierten Zellen wurden auf je einen mit einem Tropfen Glycerin versehenen Objektträger gelegt (inkubierte Zellen auf der Unterseite!). Die Zellen konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert werden.

#### 2.2.4. Elektronenmikroskopie an Zellkulturen

Zellen für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden in rechteckigen Plastikschaalen mit gelatinisierten, runden Vertiefungen von ca. 1,5 cm Durchmesser und ca. 1 cm Höhe kultiviert. Pro Vertiefung wurden ca.  $0,2 \times 10^6$  Zellen in 1 ml "Normalmedium" ausgesät.

Nach verschiedenen langen Kultivierungszeiten wurde das Medium abdekantiert und die am Schalenboden haftenden Zellen während 30 Min. in 3 % Paraformaldehyd in PBS, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  vorfixiert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen (10 Min.), während 30 Min. mit 0,2 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (w/v) BSA in PBS permeabilisiert und dann während 60 Min. in einer Antikörperlösung (40  $\mu$ g anti-Myomesin-IgG oder 100  $\mu$ g IgG aus Kontrollserum pro ml 0,2 % Triton X-100, 0,5 % (w/v) BSA in PBS) inkubiert. Nach Waschen (10 Min.) in PBS wurden die Zel-

len während 15 Min. in 3 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS fixiert, erneut in PBS gewaschen (10 Min.) und während 30 Min. in 1,5 % (w/v) Osmiumtetroxid in PBS nachfixiert. Nach intensivem Waschen in PBS (15 Min.) erfolgte die Entwässerung der Zellen in einer "Alkoholreihe" (30 % Aethanol: 5 Min., 50 % Aethanol: 5 Min., 70 % Aethanol: mindestens 10 Min., 90 % Aethanol: 15 Min., 96 % Aethanol: 15 Min., 100 % Aethanol: 3 x 15 Min.) und danach die Inkubation in zunehmend konzentrierten Plastiklösungen (1 Std. in 1 Teil Plastik-Gebrauchslösung/2 Teilen 100 % Aethanol; dann ca. 2 Std. in 2 Teilen Plastik-Gebrauchslösung/1 Teil Aethanol). Die letzte Plastiklösung wurde nun abgegossen und Gelatinekapseln mit 100 % Plastik-Gebrauchslösung gefüllt und über die Zellen am Kulturschalenboden gestülpt. Nach ca. 2 Std. bei Zimmertemperatur wurde die Härtung des Plastiks während mindestens 12 Std. bei 60 °C in einem Wärmeschrank fortgesetzt. Die Gelatinekapseln wurden noch warm vom Plattenboden abgesprengt und mit einer Rasierklinge unter einer Lupe so zurechtgeschnitten, dass am unteren Ende (wo sich die Zellen befanden) eine trapezförmige Fläche (Kantenlängen ca. 1 mm) entstand. Die Herstellung und Nachkontrastierung von Ultradünnschnitten erfolgte wie bereits in 1.2.19. beschrieben. Die Präparate wurden im Elektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV betrachtet und fotografiert.

#### 2.2.5. Bestimmung der Syntheserate von Myomesin in kultivierten Zellen

Primäre Brustmuskel-Zellkulturen ( $2 \times 10^6$  Zellen pro 100-mm gelatinisierte Kulturschale) wurden nach verschiedenen langen Inkubationszeiten während 2 Std. mit

250  $\mu\text{Ci}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin in 2,5 ml Kulturmedium (86,5 % methioninfreies MEM, 10 % Pferdeserum, 3,5 % Hühner-Embryoextrakt) markiert. Nach der Markierung wurde das Medium abgegossen, und die Kulturen wurden 3 x mit PBS gewaschen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Mit einem Gummispatel wurden die Zellen in 0,5 ml PBS, 0,1 % SDS, 0,5 % Triton X-100 vom Kulturschalenboden abgeschabt und auf Eis während 3 x 15 Sek. bei maximaler Leistung sonifiziert. Ein Aliquot des Zellhomogenates wurde für die DNS-Bestimmung nach Brunk et al. (6) verwendet; der Rest wurde während 15 Min. bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit 1/12 Volumen einer DNase/RNase-Lösung (10 mg pankreatische Deoxyribonuklease I und 5 mg pankreatische Ribonuklease in 10 ml 0,5 M Tris-HCl, 0,05 M  $\text{MgCl}_2$ , pH 7) verdaut. Die totale säurepräzipitierbare Radioaktivität wurde nach einem beschriebenen Vorgehen (7, 8) bestimmt. Myomesin aus dem radioaktiven Zellextrakt wurde mittels Immunpräzipitation wie für MM-CK beschrieben (7, 8, 103) isoliert. 1 - 2  $\mu\text{g}$  gereinigtes, unmarkiertes ("kaltes") Myomesin wurde als "carrier" zu radioaktivem Zellextrakt gegeben, der  $2 \times 10^6$  Säure-unlösliche dpm ("desintegrations per minute") enthielt. Die spezifische Immunpräzipitation wurde mit 10  $\mu\text{l}$  Antiserum gegen Myomesin durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden auf 8 %-Polyacrylamidgelen in Gegenwart von 0,1 % SDS aufgetrennt. Die Myomesinbanden wurden aus dem mit CBB angefärbten Gel ausgeschnitten, in Szintillationsröhrchen gegeben und ihre Radioaktivität wie beschrieben (7, 8) im Szintillationsspektrometer bestimmt.

#### 2.2.6. Uebrige Methoden

Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Siehe 1.2.4.



**Antikörper:**

Die Präparation und Reinigung von Antikörpern gegen Myomesin sowie die Präparation von IgG aus Präimmuserum wurde unter 1.2.6. und 1.2.7. beschrieben.

Antigen-affinitätschromatographisch gereinigte Kaninchen-IgG aus Seren gegen Hühner-MM-CK (102) wurden von Dr. M. Caravatti zur Verfügung gestellt.

Meerschweinchen-Antikörper gegen Hühner-Muskelmagen- $\alpha$ -Aktinin stammten aus dem Labor von Dr. S.J. Singer (Department of Biology, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093, USA) und wurden von Dr. H.M. Eppenberger zur Verfügung gestellt.

**Doppelimmundiffusion:**

Siehe 1.2.9.

**Herstellung von Gefrierschnitten:**

Siehe 1.2.11.

**Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten:**

Siehe 1.2.15.

2.3. RESULTATE

2.3.1. Gewebe-Spezifität von Myomesin

Im ersten Teil dieser Arbeit (1.3.) wurde gezeigt, dass Myomesin in Hühner- Brust- und Herzmuskelmyofibrillen nachgewiesen werden kann. Um herauszufinden, ob Myomesin (bzw. ein Protein, das mit Antikörpern gegen Brustmuskelmyomesin kreuzreagiert) auch in anderen Hühnergeweben vorkommt, wurden Hochsalzextrakte von verschiedenen Geweben aus embryonalen und adulten Hühnern in Doppelimundiffusionstests gegen anti-Myomesin-IgG getestet. Die Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II: Nachweis von Myomesin in Hochsalzextrakten von verschiedenen Hühnergeweben.

(+): sehr schwache Reaktion; n: nicht getestet

Gewebe	11tägige Embryonen	19tägige Embryonen	adulte Hühner
Brustmuskeln	(+)	+	+
Beinmuskeln	n	+	+
Herzmuskeln	(+)	+	Atrium: + Ventrikel: +
Muskelmagen	-	-	-
Kropf	-	-	-
Darm	n	-	-
Lunge	n	n	-
Leber	-	-	-
Niere	n	n	-
Milz	n	n	-
Thymus	n	n	+
Ovidukt	n	n	-

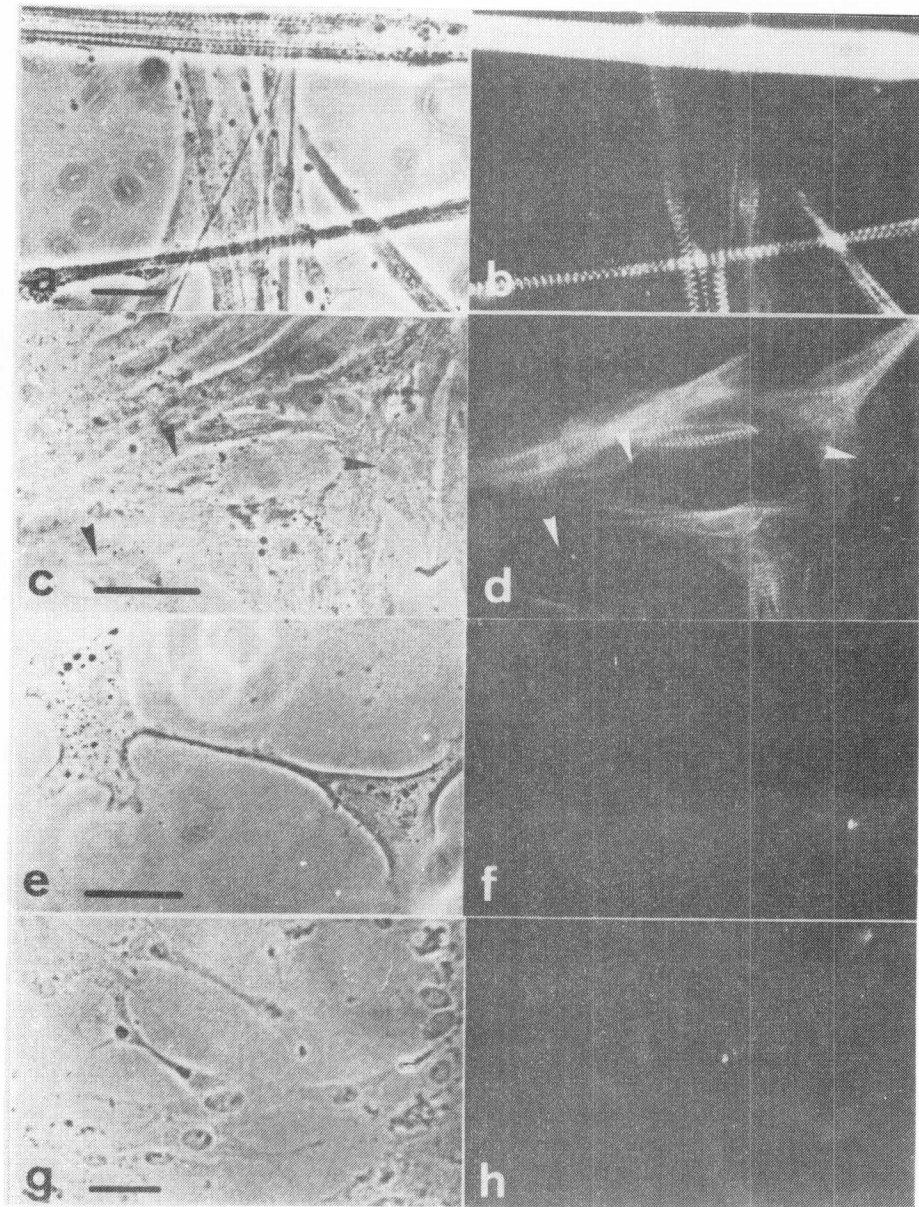
Gewebe	11tägige Embryonen	19tägige Embryonen	adulte Hühner
Ovar	n	n	-
Pankreas	n	n	-
Hirn	-	-	-

Myomesin konnte nur in Skelett- und Herzmuskeln sowie im Thymus nachgewiesen werden, nicht aber in glatter Muskulatur und in einer Reihe anderer Gewebe. Die Reaktion von Brust- und Herzmuskeln aus 11tägigen Embryonen mit dem Antikörper war noch sehr schwach, was auf das Vorhandensein von erst wenigen ausdifferenzierten Muskelzellen zurückzuführen ist (siehe dazu auch 2.3.2.). Die positive Reaktion von Thymusextrakten mit anti-Myomesin-IgG kann durch die Tatsache erklärt werden, dass eine bestimmte Population von Thymus-Retikulumzellen zu voll entwickelten, quergestreiften Muskelzellen ausdifferenzieren kann (64, 144 sowie persönliche Mitteilung von Dr. J.-C. Perriard).

Mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik konnte Myomesin auch in kultivierten embryonalen Brust- und Herzmuskelzellen nachgewiesen werden (**Figur 24a - d**). Zellen aus embryonalem Muskelmagen (vorwiegend glatte Muskelzellen) und Fibroblasten enthielten hingegen keine nachweisbaren Mengen von Myomesin (**Figur 24e - h**).

Die Antikörper gegen Brustmuskelmyomesin reagieren somit nur mit dem homologen Antigen aus Skelettmuskeln sowie mit Herzmuskelmyomesin. In allen übrigen Gewebe- bzw. Zelltypen kommt entweder kein oder höchstens ein von Brustmuskelmyomesin völlig verschiedenes "Myomesin" vor. Besonders interessant ist die Abwesenheit von (Skelett-

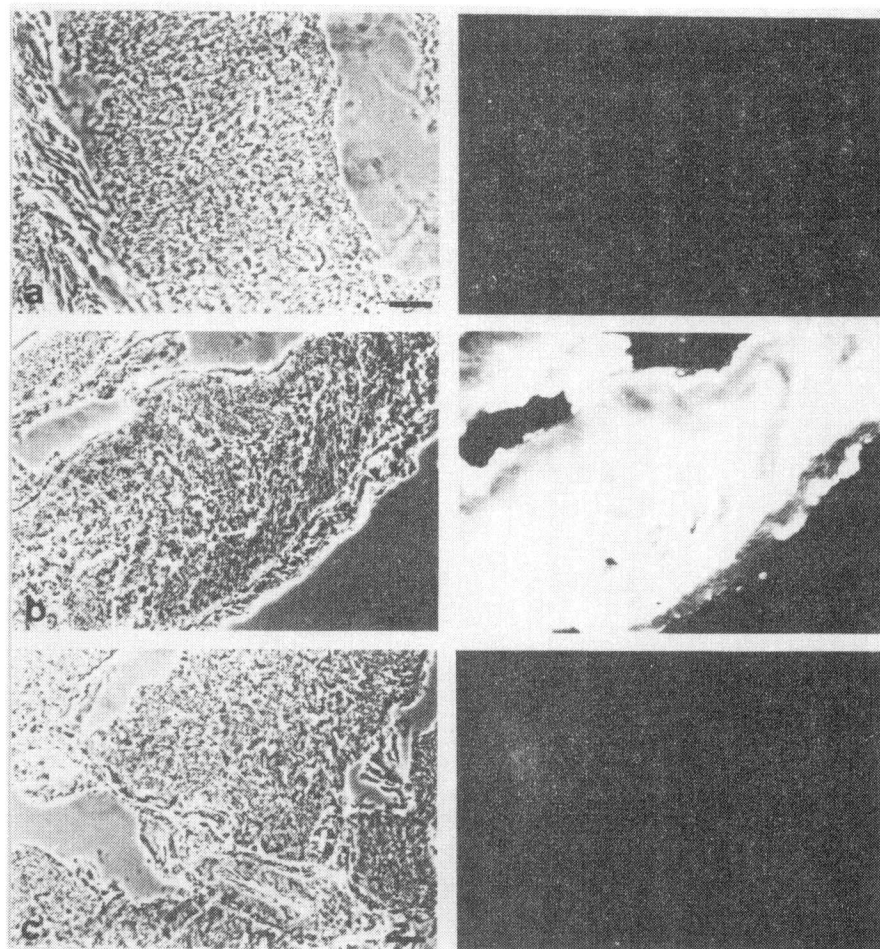
muskeltyp-) Myomesin in glatten Muskeln. Um dieses Resultat noch weiter zu prüfen, wurden Gefrierschnitte



Figur 24: Immunfluoreszenzlokalisierung von Myomesin in embryonalen Hühnerzellen nach 96 Std. in Kultur.

a, b: Brustmuskelnzellen; c, d: Herzmuskelnzellen; e, f: Zellen aus glatter Muskulatur (Muskelmagen); g, h: Fibroblasten. Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahmen. Vergrößerungsbalken: 40  $\mu$ m. Die Pfeile in c und d bezeichnen einige Fibroblasten, die als Kontamination in Herzmuskelnzellkulturen wachsen (c), jedoch keine spezifische Immunfluoreszenz für Myomesin zeigen (d).

durch frischen Hühner-Muskelmagen (der vorwiegend glatte Muskulatur enthält) mit anti-Myomesin-IgG oder, als positive Kontrolle, mit anti-Hühner-Muskelmagen- $\alpha$ -Aktinin-IgG inkubiert und dann für die indirekte Immunfluoreszenzlokalisierung angefärbt. Wie aus **Figur 25a** hervorgeht, konnte auch auf diesen Gefrierschnitten durch frischen Muskelmagen kein Myomesin nachgewiesen werden; die Fluoreszenz war vergleichbar mit der unspezifischen



**Figur 25:** Immunfluoreszenzfärbung für Myomesin und  $\alpha$ -Aktinin an Gefrierschnitten durch Hühner-Muskelmagen.

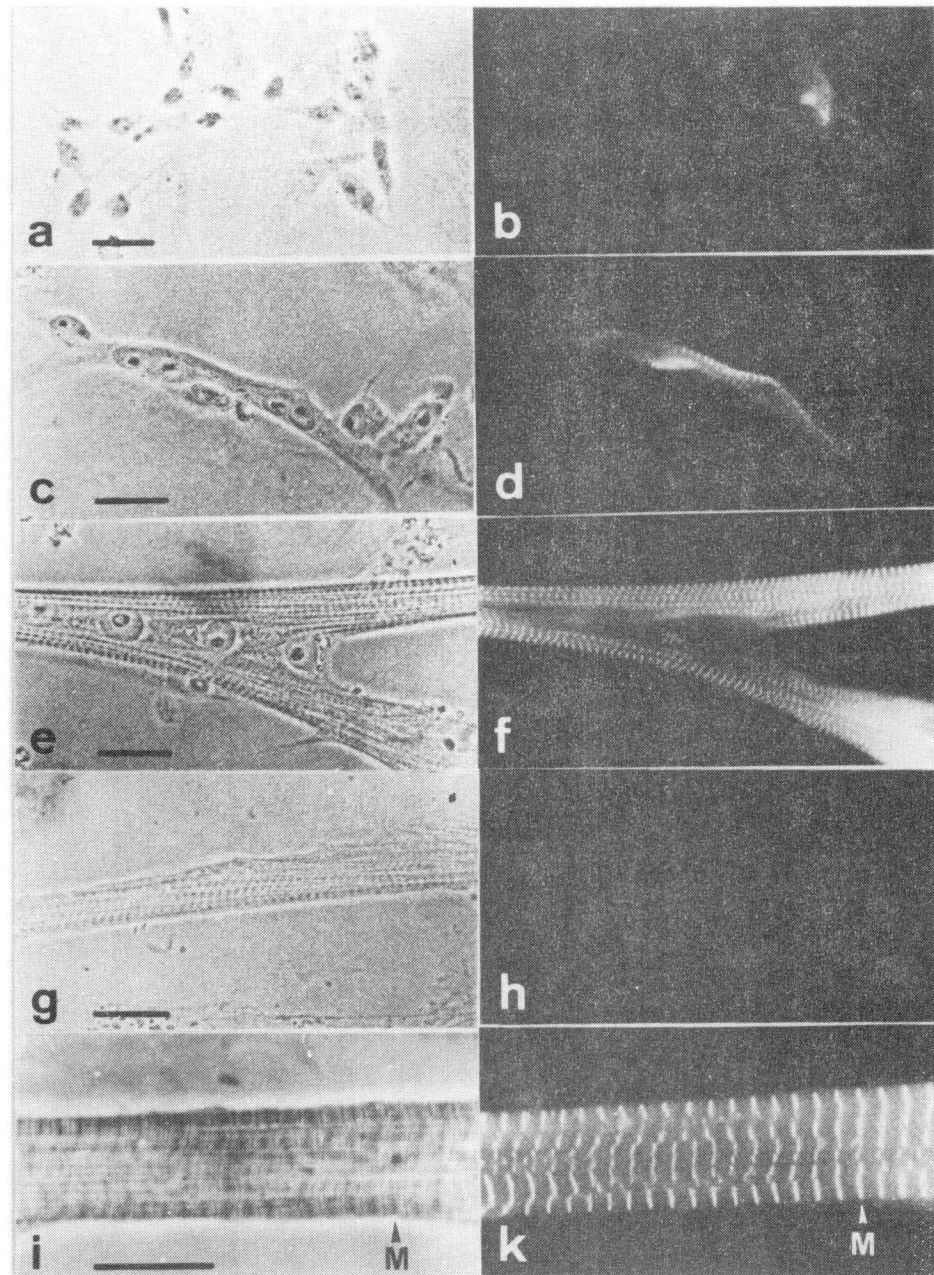
a: Inkubation mit anti-Hühner-Brustmuskel-Myomesin-IgG; b: Inkubation mit anti-Hühner-Muskelmagen- $\alpha$ -Aktinin-IgG; c: Inkubation mit IgG aus Präimmunserum. Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahmen. Vergrößerungsbalken: 20  $\mu$ m.

Fluoreszenz von Schnitten, die mit IgG aus Präimmenserum inkubiert worden waren (Figur 25c). Schnitte, die mit Antikörpern gegen Hühner-Muskelmagen- $\alpha$ -Aktinin inkubiert worden waren, zeigten hingegen die erwartete, stark positive Reaktion (Figur 25b).

### 2.3.2. Auftreten von Myomesin während der Terminaldifferenzierung myogener Zellen in vitro

Antikörper gegen Brustmuskelmymesin können, wie in 2.3.1. gezeigt wurde, quergestreifte Muskulatur von allen anderen Gewebetypen unterscheiden. Es war somit auch von Interesse festzustellen, wann Myomesin während der Terminaldifferenzierung von embryonalen myogenen Zellen zum ersten Mal nachweisbar war. Zellen aus der Brustmuskulaturregion von 11tägigen Hühnerembryonen wurden deshalb nach verschiedenen langen Kultivierungszeiten fixiert und für die Immunfluoreszenzlokalisierung von Myomesin präpariert. In einkernigen, meist rundlichen Zellen, die erst während ca. 6 Std. in Kultur gehalten worden waren und mehrheitlich noch teilungsfähige "präsumptive Myoblasten" darstellen dürften, konnte kein Myomesin nachgewiesen werden (Figur 26a, b). Nach ca. 24 Std. in Kultur fanden sich jedoch bereits Zellen, die - als langgestreckte, bipolare, noch einkernige Myoblasten oder bereits als Synzytium von einigen wenigen fusionierten Einzelzellen - eindeutig nachweisbare Mengen von Myomesin enthielten (Figur 26c, d). Schon in diesen frühesten Stadien lag die Fluoreszenz für Myomesin in einem charakteristischen, quergestreiften Muster vor. Diese Querstreifung wurde noch deutlicher in den dickeren, vielkernigen und schon kontraktionsfähigen Myotuben von älteren Kulturen (Figur 26e, f, i, k). Die Myotuben in

älteren Kulturen waren oft geradezu "ausgestopft" mit Myofibrillen; die Fluoreszenz für Myomesin konnte ein-



Figur 26: Immunfluoreszenzlokalisierung von Myomesin in kultivierten embryonalen Hühner-Brustmuskelzellen.

a, b: 6 Std. in Kultur; c, d: 24 Std. in Kultur; e - h: 6 Tage in Kultur; i, k: 15 Tage in Kultur. a - f, i, k: Inkubation mit anti-Myomesin-IgG; g, h: Inkubation mit IgG aus Präimmenserum. Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahmen. M: M-Linienregion. Vergrößerungsbalken: 20  $\mu$ m.

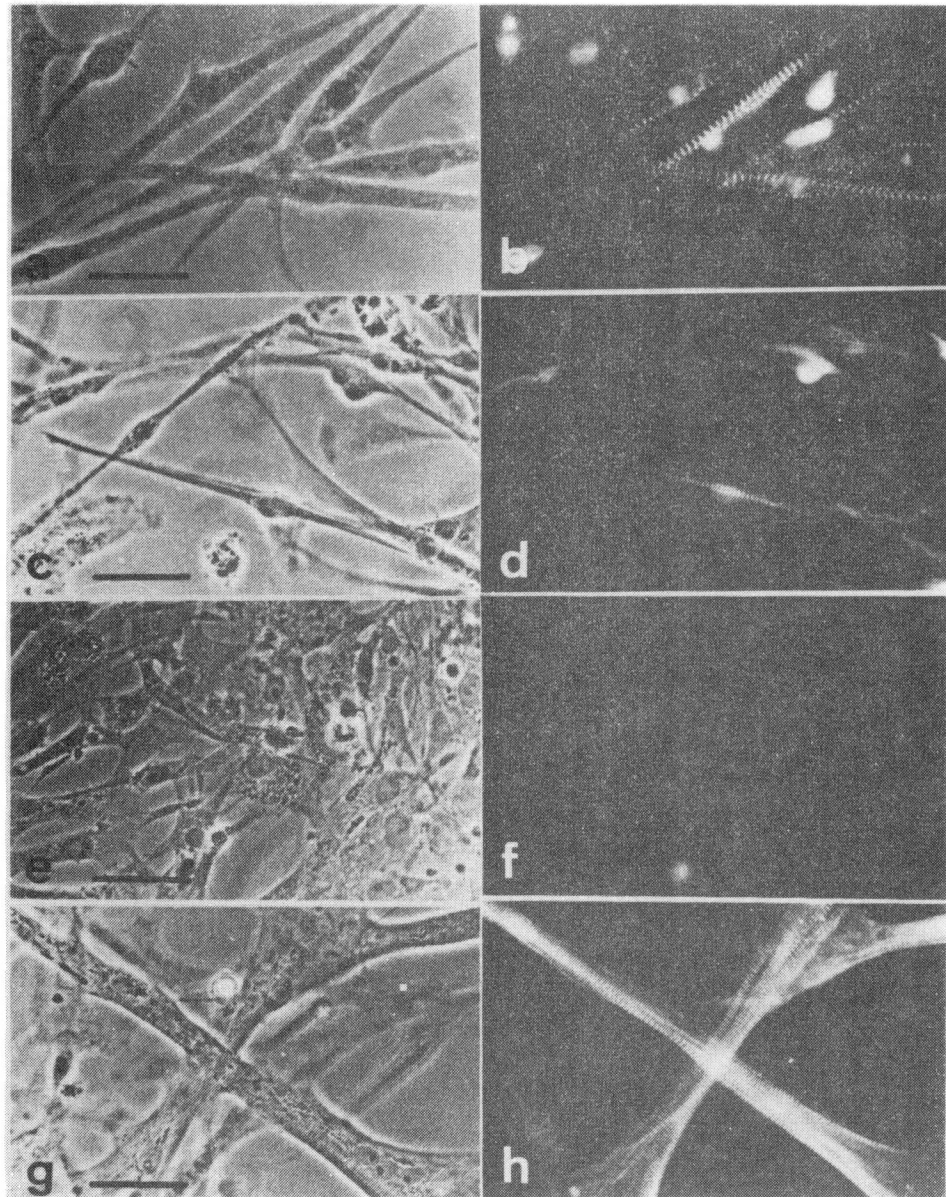
deutig in der M-Linienregion dieser Myofibrillen lokalisiert werden (Figur 26i, k). Kontrollen mit IgG aus Prä-immunserum zeigten dagegen nur Hintergrundfluoreszenz (Figur 26g, h).

Um zu testen, ob das Auftreten von Myomesin in embryonalen Zellen als "Marker" für die muskelspezifische Terminaldifferenzierung dieser Zellen angesehen werden kann, wurden myogene Brustmuskelzellen durch Veränderung des Kultivierungsmediums auf verschiedenen Ebenen in ihrer "normalen", auf einem festen Substrat stattfindenden in vitro Terminaldifferenzierung gestört und dann auf die Anwesenheit von Myomesin geprüft. Es wurde schon früher festgestellt, dass myogene Zellen, die - durch Kultivierung in einem Medium, welches das Haften der Zellen am Kulturschalenboden verhindert - in Suspension wachsen müssen, trotzdem zur Terminaldifferenzierung und damit zur Bildung von Myofibrillen befähigt sind (107). Die Myofibrillen in diesen suspendierten Zellen sind meist um den Zellkern gewunden (107); sie enthalten schon nachweisbare Mengen von Myomesin. Werden solche Zellen in "Normalmedium" subkultiviert, setzen sie sich am Kulturschalenboden ab und nehmen bald die typische, langgestreckte Spindelform von Myoblasten an; auch die Myofibrillen "rollen" sich aus und durchziehen die Zellen in ihrer ganzen Länge, was sich im regelmässigen, quergestreiften Fluoreszenzmuster für Myomesin sehr deutlich ausdrückt (Figur 27a, b).

Werden myogene Zellen durch Zugabe des  $\text{Ca}^{++}$ -Chelators EGTA an der Fusion, nicht aber an der Differenzierung gehindert (134, 135), so zeigt sich das auch hier am Auftreten von Myomesin (Figur 27c, d). Offenbar kann das Auftreten von Myomesin unabhängig von der Fusion schon in einkernigen, postmitotischen myogenen Zellen



erfolgen, eine Tatsache, wie sie schon früher für die



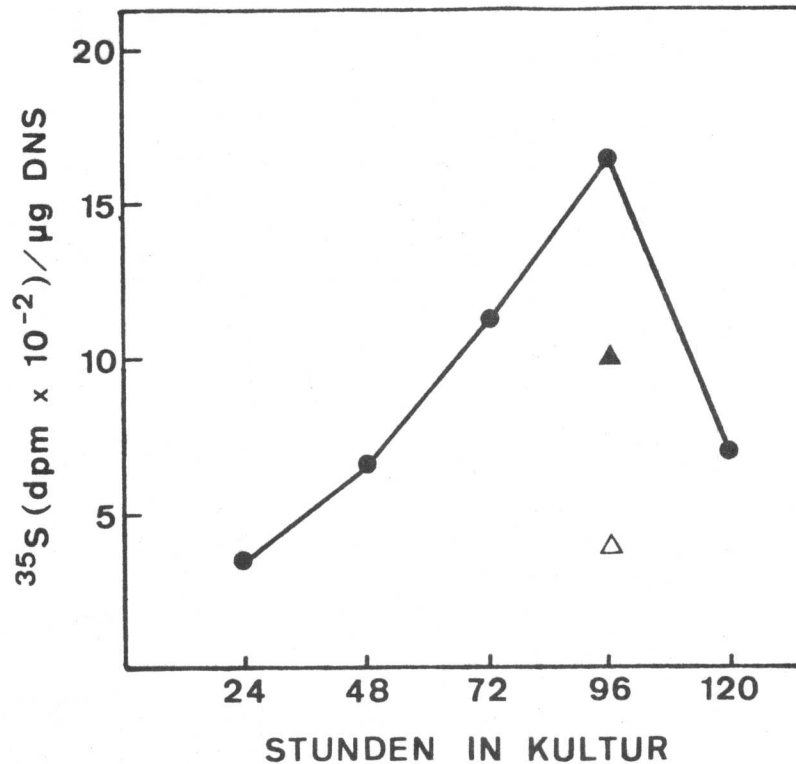
**Figur 27: Immunfluoreszenzlokalisierung von Myomesin in verschiedenen kultivierten embryonalen Hühner-Brustmuskelnzellen.**

a, b: Zellen, die zuerst während 48 Std. in Suspension und dann während 24 Std. in "Normalmedium" kultiviert worden waren; c, d: Zellen, die während 72 Std. in EGTA-haltigem Medium kultiviert worden waren; e, f: Zellen, die während 96 Std. in BrdUrd-haltigem Medium kultiviert worden waren; g, h: Zellen, die zuerst während 48 Std. in BrdUrd-haltigem Medium und dann während 48 Std. in "Normalmedium" kultiviert worden waren. Links: Phasenkontrast-, rechts: Fluoreszenzaufnahmen. Vergrößerungsbalken: 40  $\mu$ m.

Akkumulation einer ganzen Anzahl von muskelspezifischen Isoproteinen beschrieben wurde (9, 26, 86, 98, 134, 138).

Durch die Zugabe des Thymidin-Analogs BrdUrd zum Kulturmedium wird nicht nur der Uebergang von präsumptiven, teilungsfähigen Myoblasten zu postmitotischen Myoblasten verhindert, sondern auch die Akkumulation muskelspezifischer Isoproteine in diesen Zellen unterdrückt (8, 94, 101, 134-136). Dasselbe wurde auch für das Auftreten von Myomesin gefunden: In myogenen Zellen, die in BrdUrd enthaltendem Medium kultiviert worden waren, konnte kein Myomesin nachgewiesen werden (Figur 27e, f). Die Blockierung der Terminaldifferenzierung myogener Zellen durch BrdUrd ist jedoch reversibel; wurden nämlich Zellen, die zuerst in BrdUrd enthaltendem Medium kultiviert worden waren, in "Normalmedium" subkultiviert, so vermochten sie nach einiger Zeit zu Myotuben zu fusionieren, die Myofibrillen enthielten und damit auch Myomesin im charakteristischen, quergestreiften Lokalisierungsmuster aufwiesen (Figur 27g, h).

Um die Resultate aus den Immunfluoreszenzstudien weiter zu unterstützen, wurde die Syntheserate von Myomesin in myogenen, embryonalen Hühnerzellen nach verschiedenen langen Kultivierungszeiten gemessen. Dazu wurden die Zellen zuerst während 2 Std. mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert. Myomesin konnte dann durch Immunpräzipitation aus den Zellextrakten isoliert und die eingebaute Radioaktivität im Szintillationsspektrometer bestimmt werden. Wie aus Figur 28 hervorgeht, beginnt der Anstieg der Myomesin-Syntheserate schon etwa 24 - 48 Std. nach Aussaat der Zellen und hat seinen steilsten Abschnitt 48 - 96 Std. nach Beginn der Kultivierungsperiode. Die Tatsache, dass die Myomesin-Syntheserate schon beim frühesten unter-



Figur 28: Synthese von Myomesin während der Myogenese von embryonalen Hühner-Brustmuskelzellen in vitro.

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten während 2 Std. mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und dann fixiert. Myomesin wurde durch Immunpräzipitation aus den Zellextrakten isoliert und die eingebaute Radioaktivität im Szintillationsspektrometer bestimmt. Jeder angegebene Wert stellt den Durchschnitt zweier Messungen dar.

$\triangle$  Myomesin-Synthesewert in konfluenten Zellen, die in einem BrdÜrd-haltigen Medium kultiviert worden waren.  $\blacktriangle$  Myomesin-Synthesewert in Zellen, die zuerst während 48 Std. in einem BrdÜrd-haltigen Medium und dann während 48 Std. in "Normalmedium" kultiviert worden waren.

suchten Zeitpunkt einen von Null verschiedenen Grundwert aufweist, ist höchstwahrscheinlich auf die Anwesenheit einiger schon weiter differenzierter Myoblasten und Myotuben zurückzuführen (es handelt sich bei den untersuchten Primärzellkulturen um asynchrone Kulturen). Der klare Abfall der Syntheserate am 5. Kultivierungstag könnte einen Kulturartefakt (z.B. Zellverlust) zur Ursache haben; er könnte aber auch - wie schon für Myosin-

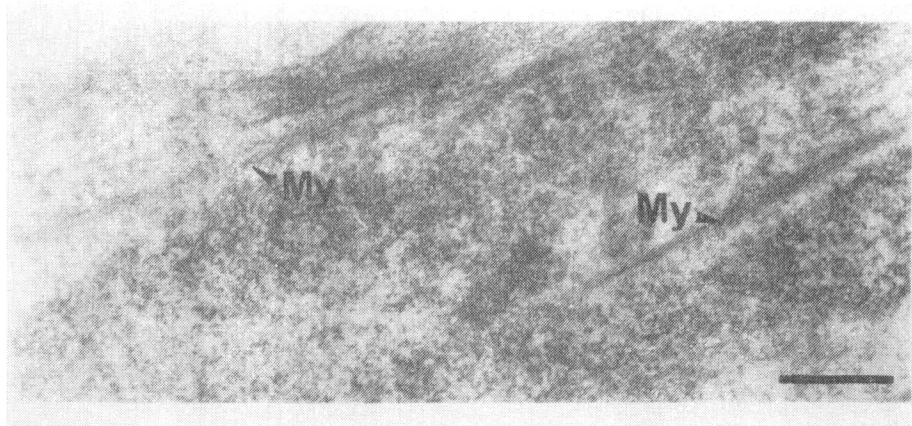
"heavy chain" nachgewiesen wurde (19) - eine effektive Abnahme der Syntheserate widerspiegeln.

In konfluenten Zellen, die in einem BrdUrd-haltigen Medium kultiviert worden waren, überstieg die Myomesin-Syntheserate den Basiswert nicht; wie schon aus den Immunfluoreszenzversuchen geschlossen werden konnte (Figur 27g, h), nahm die Syntheserate von Myomesin jedoch drastisch zu, sobald solche Zellen in "Normalmedium" subkultiviert wurden (Figur 28).

### 2.3.3. Ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in terminaldifferenzierenden myogenen Zellen

Verglichen mit der Z-Linie tritt eine sichtbare M-Linie bei der Bildung von Myofibrillen in sich entwickelnden Muskeln erst relativ spät auf (31, 37, 65). Andererseits zeigen die unter 2.3.2. beschriebenen Resultate, dass Myomesin schon in den frühesten Stadien der Myofibrillogenese in einem charakteristischen Querstreifungsmuster in differenzierenden Brustmuskelzellen nachgewiesen werden kann. Aus diesem Grund wurde die ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in kultivierten embryonalen Brustmuskelzellen während der Myogenese studiert. Dazu wurden die Zellen nach verschiedenen langen Kultivierungszeiten mit IgG aus Präimmenserum oder mit Antikörpern gegen Myomesin inkubiert und dann unter dem Elektronenmikroskop auf eine elektronendichte Ablagerung in den entstehenden Myofibrillen untersucht.

20 Std. nach der Aussaat zeigten die meisten Zellen noch keine oder erst wenige Myofilamente, die sich einzeln oder in einer wenig organisierten Anordnung von Bündeln im Zytoplasma befanden (Figur 29).

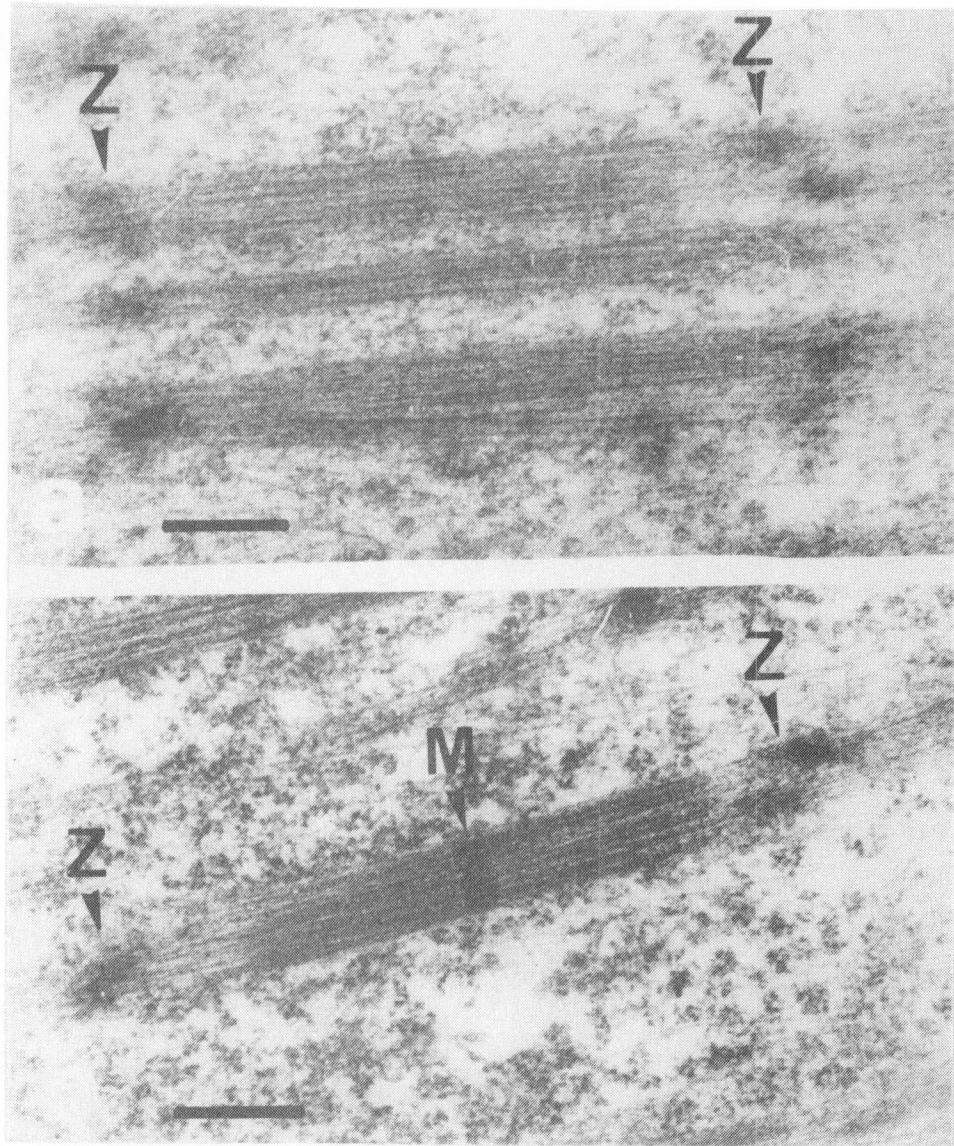


**Figur 29:** Ausschnitt aus einer embryonalen Hühner-Brustmuskelzelle nach 20 Std. in Kultur.

Inkubation mit anti-Myomesin-IgG. Es sind erst wenige Bündel von Myofilamenten (My) sichtbar; eine organisierte Sarkomerstruktur ist noch nicht vorhanden. Eine eindeutige Ablagerung von Antikörpern gegen Myomesin ist nicht nachweisbar. Vergrößerungsbalken: 1  $\mu$ m.

Antikörper gegen Myomesin vermochten in diesen Zellen keine bestimmten Strukturen zu markieren. Dieses Resultat stimmt gut mit der unter 2.3.2. beschriebenen Messung der Syntheserate von Myomesin überein, die zeigte, dass in solch wenig differenzierten Zellen noch kaum Myomesin synthetisiert wird. In Zellen, die ca. 48 Std. in Kultur gehalten worden waren, zeigte sich jedoch schon ein ganz anderes Bild: Vielfach fanden sich bereits kleine Myotuben mit in der Längsrichtung verlaufenden Myofibrillen. Diese Myofibrillen bestanden erst aus relativ wenigen Myofilamenten, die aber bereits in der "richtigen" parallelen Anordnung vorlagen und auch schon durch Z-Linienmaterial in einzelne Sarkomere unterteilt wurden. In Übereinstimmung mit der Literatur (31, 37, 65) war jedoch in den Myofibrillen von solchen Zellen kein oder erst wenig elektronendichtes Material in der M-Linienregion vorhanden (Figur 30a).

Durch die Behandlung mit Antikörpern gegen Myomesin wur-

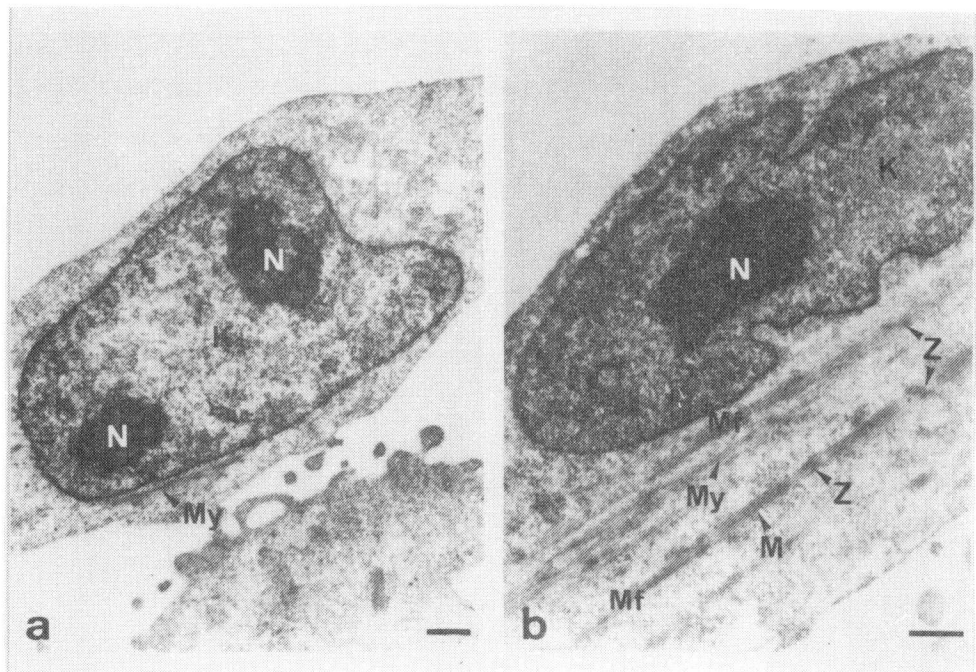


Figur 30: Ultrastrukturelle Lokalisierung von Myomesin in entstehenden Myofibrillen von kleinen Myotuben nach 48 Std. in Kultur.

a: Inkubation mit IgG aus Präimmenserum; b: Inkubation mit anti-Myomesin-IgG. Die "jungen" Myofibrillen zeigen schon eine gut ausgeprägte Sarkomerstruktur mit Z-Linien (Z) aber noch keine deutliche M-Linie (a); durch die Inkubation mit Antikörpern gegen Myomesin wird jedoch die M-Linienregion (M) stark markiert (b). Vergrößerungsbalken: 0,4  $\mu\text{m}$ .

de die M-Linienregion dieser jungen Myofibrillen hingegen stark markiert (Figur 30b), womit ganz deutlich gezeigt werden konnte, dass Myomesin - unabhängig von der

Anwesenheit einer sichtbaren, elektronendichten M-Linie – schon in den frühesten Stadien der Myofibrillogenese in der M-Linienregion der entstehenden Myofibrillen lokalisiert ist. In ein und derselben 48 Std. alten Kultur fanden sich oft Zellen recht unterschiedlichen Entwicklungszustandes. So gab es z.B. sehr "junge", kleine Zellen, deren einziger Zellkern noch zwei Nukleoli enthielt und den grössten Teil des Zellvolumens ausfüllte. In solchen Zellen waren erst Ansätze zur Bildung von Myofilamentbündeln zu erkennen; eindeutige Sarkomerstrukturen waren noch nicht vorhanden (Figur 31a).



Figur 31: Embryonale Hühner-Brustmuskelzellen nach 48 Std. in Kultur.

Inkubation der Zellen mit IgG aus Präimmenserum. a: Zelle in einem frühen Entwicklungszustand. Der Zellkern (K) enthält 2 Nukleoli (N) und füllt den grössten Teil der Zelle aus; es ist erst ein einziges, wenig organisiertes Bündel von Myofilamenten (My) zu erkennen. b: Zelle (Myotube) in einem späteren Entwicklungsstadium. Der Zellkern (K) liegt peripher und enthält nur einen Nukleolus (N); neben wenig organisierten Bündeln von Myofilamenten (My) finden sich sowohl Myofibrillen (Mf), die zwar Z-Linienmaterial (Z), aber noch keine M-Linie aufweisen, als auch gut ausgeprägte Myofibrillen mit klar erkennbaren Z- und M-Linien (M). Vergrösserungsbalken: 1  $\mu$ m.

Andererseits fand man auch schon Myotuben mit einer recht grossen Anzahl von Kernen, welche nur noch je einen Nukleolus enthielten und sich an der Peripherie der Myotube befanden. In solchen Myotuben lagen oft gut ausgebildete Myofibrillen, die sowohl Z- als auch M-Linien aufwiesen, neben in der Entstehung begriffenen Myofibrillen, die erst Z-Linienmaterial, aber noch keine sichtbare M-Linie zu erkennen gaben (Figur 31b).

Nach vier oder mehr Tagen bestanden die Kulturen vorwiegend aus vielkernigen Myotuben (siehe Figur 26e, g, i), die mit dicken Myofibrillen angefüllt waren. Diese Myofibrillen glichen weitgehend den Myofibrillen aus adultem Muskelgewebe (siehe Figur 10a); entsprechend zeigten sie auch eine elektronendichte M-Linie. Durch die Inkubation mit Antikörpern gegen Myomesin wurde, wie schon in den Experimenten mit Myofibrillen aus adulten Muskeln gezeigt (Figur 10b), die ganze M-Linienregion regelmässig markiert.



## 2.4. DISKUSSION

### 2.4.1. Spezies-, Gewebe- und Organellen-Spezifität der M-Linienproteine

Das Vorkommen einer Isoenzymtransition der Kreatinkinase (von der BB- zur MM-Form) in terminaldifferenzierenden Muskelzellen in vivo und in vitro ist ein gut dokumentiertes Phänomen (7, 8, 28, 101-103, 136). MM-CK stellt danach die für die ausdifferenzierte Vertebraten-Skelettmuskulatur spezifische Form der Kreatinkinase dar. Während MM-CK zumindest bei Säugern auch im adulten Herzmuskelgewebe vorkommt (29), wird im Hühner-Herzmuskel BB-CK während der Ontogenese nicht durch MM-CK ersetzt und bleibt daher während des ganzen Lebens das vorherrschende CK-Isoenzym (15, 141). In Übereinstimmung mit der beobachteten Korrelation zwischen MM-CK und elektronendichter M-Linie fehlt den adulten Hühner-Herzmuskeln eine sichtbare M-Linie (120, 141).

MM-CK wird ausser in der quergestreiften Muskulatur nur noch im Thymus in grösseren Mengen gefunden (persönliche Mitteilung von Dr. J.-C. Perriard); es ist jedoch bekannt, dass eine gewisse Population von Thymus-Retikulumzellen zu quergestreiften, dem Skelettmuskeltyp ähnlichen Muskelzellen ausdifferenzieren kann (64, 144). In den übrigen adulten Geweben (auch in der glatten Muskulatur!) bildet nicht die M-, sondern die B-CK die vorherrschende CK-Untereinheit. Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass das Auftreten von MM-CK (bzw. das Ersetzen von BB-CK durch MM-CK) einen hinreichenden, aber - wie das Beispiel der Hühner-Herzmuskulatur zeigt - nicht unbedingt notwendigen "Marker" für die Terminaldifferen-

zierung von quergestreifter Muskulatur darstellt.

Kreatinkinase scheinen auf Vertebraten beschränkt zu sein; die entsprechende enzymatische Funktion wird z.B. bei Arthropoden durch die Argininkinase erfüllt (72, 73). Argininkinase liegt jedoch als Monomer vor ( $M_r = 40.000$ ); im Unterschied zur Kreatinkinase finden sich auch keine verschiedenen Isoenzymformen (73).

Ueber die Lokalisierung der Argininkinase in den verschiedenen Muskeltypen der Arthropoden existieren erst wenige Angaben. Neuere Studien an *Drosophila* zeigen, dass ein Teil der Argininkinase in der Z-Linienregion der Myofibrillen von larvalen Muskelfasern sowie von adulten fibrillären Flugmuskeln gebunden ist, während in einem (adulten) Muskel des tubulären Typs neben einer weniger ausgeprägten Lokalisierung in der Z-Linienregion auch eine gewisse Bindung von Argininkinase an die A-Bande der Myofibrillen beobachtet wird (72, 73). Sowohl die Myofibrillen der tubulären Muskeln (die den quergestreiften Vertebratenmuskeln am meisten ähneln) als auch diejenigen der fibrillären Flugmuskeln von *Drosophila* zeigen eine deutliche, elektronendichte M-Linie (72); ob Argininkinase und (MM-) Kreatinkinase auch bezüglich einer möglichen Beteiligung am strukturellen Aufbau der Myofibrillen eine Homologie zeigen, muss deshalb in Frage gestellt werden. Die Tatsache, dass Kreatinkinase als Dimer vorliegt (und damit ganz andere räumliche Dimensionen besitzt als die monomere Argininkinase), ist gewiss von entscheidender Bedeutung für eine allfällige Beteiligung am Aufbau der Sarkomerstruktur.

Der grösste Teil der Hühner-MM-CK liegt in löslicher Form im Zytoplasma der Muskelzellen vor. Nur ein kleiner Teil (ca. 5 % der totalen MM-CK) ist fest an die Myofi-

brillen gebunden, so dass man MM-CK nicht als organel-  
lenspezifisches Enzym bezeichnen darf. Alle bis jetzt  
bekannten Daten sprechen nämlich dafür, dass die M-Li-  
nien-CK und die sarkoplasmatische MM-CK in ihren physi-  
kalischem-chemischen und immunologischen Eigenschaften  
übereinstimmen (14, 137, 143). Es kann allerdings nicht  
ausgeschlossen werden, dass die Myofibrillen die einzi-  
gen intrazellulären Strukturen sind, an die MM-CK über-  
haupt binden kann. Daneben gibt es aber auch in Muskel-  
zellen noch weitere Organelle, die strukturgebundene  
Kreatinkinase enthalten. Zumindest von der mitochondria-  
len CK kann jedoch mit einiger Sicherheit gesagt werden,  
dass es sich um ein von MM-CK (und auch von BB-CK) gänz-  
lich verschiedenes Protein handelt (33, 41, 61, 62).

Das zweite Protein der M-Linienstruktur, Myomesin (bzw.  
das 165K-"M-Protein") wurde bisher erst aus Skelettmus-  
keln von Vertretern der Amphibien (Frosch) (18), der  
Vögel (Huhn) (84, 133 und die vorliegende Arbeit), und  
der Säuger (Kaninchen, Schwein) (78, 97), nicht aber  
aus Muskeln von Fischen, Reptilien oder von Invertebra-  
ten isoliert. Unter dem Gesichtspunkt der eventuell  
wichtigen Funktion von Myomesin für den Aufbau der Myo-  
fibrillen (siehe auch 2.4.3.) wäre es nicht erstaunlich,  
wenn zumindest in allen Vertebraten ein "Myomesin" ge-  
funden würde. Antikörper, die (vermutlich) vor allem  
gegen Schweine-Skelettmuskelmyomesin gerichtet sind,  
binden stark an die M-Linienregion von Skelettmuskelmyo-  
fibrillen aus verschiedenen anderen Säugern (Maus, Ka-  
ninchen, Mensch), hingegen bedeutend schwächer (aber  
immer noch nachweisbar) an diejenige von Frosch-Skelett-  
muskelmyofibrillen (97). Säuger-Skelettmuskelmyomesine  
scheinen also sehr nahe miteinander verwandt zu sein;  
sie besitzen aber auch gemeinsame antigenische Determi-

nanten mit Amphibien-Myomesin(en). Eine ähnliche Eigenschaft beobachtet man auch beim Hühner-Skelettmuskelmyomesin; Antikörper gegen dieses Protein kreuzreagieren sehr stark mit einem M-Linienprotein aus einem anderen Vogel, der mit dem Huhn allerdings sehr nahe verwandten Wachtel (persönliche Mitteilung von Dr. D. Turner), sie kreuzreagieren aber auch mit einem entsprechenden Protein aus der Skelettmuskulatur des Hamsters, also eines Säugetieres (persönliche Mitteilung von Dr. M. Eppenberger). Skelettmuskelmyomesine zeigen folglich eine nur wenig ausgeprägte Klassenspezifität; die Tatsache, dass Myomesine aus den evolutionsmässig relativ weit auseinanderliegenden Vertebratenklassen der Amphibien und der Säuger gemeinsame antigenische Determinanten aufweisen, lässt vermuten, dass es sich bei Myomesin um ein relativ konservatives Molekül handelt. Dies würde gut zu der Annahme passen, dass ein Protein, welches eine genau bestimmte strukturelle Funktion beim Aufbau der Myofibrillen innehat, selbst eine "konservative" Molekülkonformation aufweisen muss, um diesen Anforderungen genügen zu können. Andererseits besitzt ein grosses Protein wie Myomesin vermutlich viele antigenische Determinanten, so dass es auch bei hoher Mutationsrate in der Aminosäuresequenz verhältnismässig lange dauern müsste, bis zwei Myomesine keine immunologische Verwandtschaft mehr zeigen würden.

Ueber das Vorkommen von Myomesin bei Invertebraten gibt es noch gar keine Angaben. Antikörper gegen Hühner-Skelettmuskelmyomesin reagieren aber offenbar nicht mit Myofibrillen von Drosophilamuskeln (persönliche Mitteilung von Dr. A. Lang).

Myomesine zeigen eine ausgesprochene Gewebe-Spezifität. Eine positive Reaktion mit Antikörpern gegen Hühner-Ske-

lett-muskelmyomesin findet sich nur in quergestreiften Muskeln, also in Skelett- und in Herzmuskelgewebe sowie im Thymus, der - wie bereits oben erwähnt - skelettmuskeltypähnliche Muskelzellen enthalten kann. Hingegen beobachtet man in glatter Muskulatur sowie in allen anderen getesteten Geweben keine Kreuzreaktion mit diesen Myomesin-Antikörpern. Diese Aussage gilt auch für in vitro kultivierte Zelltypen; nur Skelett- und Herzmuskelzellen reagieren mit den Antikörpern gegen Skelett-muskelmyomesin, während Zellen aus glatter Muskulatur oder Fibroblasten keine positive Reaktion zeigen. Dass eine antigenische Verwandtschaft zwischen den Myomesinen aus Skelett- und aus Herzmuskeln besteht, wurde schon in einer Arbeit mit dem entsprechenden Protein aus Schweinemuskeln vermutet (97). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Resultate zeigen jedoch, dass das Skelett- und das Herzmuskelmyomesin nicht identische Proteine darstellen. Ob sich die Myomesine aus verschiedenen Skelettmuskeltypen voneinander unterscheiden, kann noch nicht schlüssig beantwortet werden. Studien mit Antikörpern gegen Myomesin aus dem Hühner-Brustmuskel (*m. pectoralis maior*) zeigten keine Unterschiede in der Lokalisierung und im Ausmass der Markierung in der M-Linienregion von Myofibrillen aus vorwiegend "schnellen" Typ II-Muskeln (*m. posterior latissimus dorsi*) oder aus vorwiegend "langsamen" Typ I-Muskeln (*m. anterior latissimus dorsi*) des Huhnes.

Die Abwesenheit eines Myomesins vom Typ der quergestreiften Muskeln in glatten Muskeln oder in Nichtmuskelgeweben schliesst das Vorkommen eines Glattmuskel- und/oder Nichtmuskel-"Myomesins" natürlich nicht aus, doch würde sich ein solches Protein vermutlich recht stark von einem Myomesin, das für quergestreifte Musku-

latur spezifisch ist, unterscheiden. Bis jetzt sind Schollmeyer et al. (112) die einzigen Autoren, die das Vorkommen eines 165K-"M-Proteins" in glatter Muskulatur (Hühner-Muskelmagen, menschlicher Uterus) sowie in menschlichen Blutplättchen und in Fibroblasten aus Hühnern und Mäusen beschreiben.

Die Antikörper gegen das aus dem Hühner-Muskelmagen (also aus glatter Muskulatur) gereinigte "M-Protein" scheinen nicht nur mit kultivierten Glattmuskel- und Nichtmuskelzellen aus dem Huhn zu reagieren, sondern auch mit menschlichen Glattmuskel- und Nichtmuskelgeweben und -Zelltypen (112). Darüber hinaus wurde diesen Antikörpern sogar die Fähigkeit zugeschrieben, an die M-Linienregion von Skelettmuskelmyofibrillen binden zu können (112). Diese Resultate bedürfen aber gewiss noch einer genaueren Untersuchung; bei dem von Schollmeyer et al. (112) beschriebenen "M-Protein" könnte es sich nämlich gut um ein von einem "myomesin-ähnlichen" Protein gänzlich verschiedenes Protein handeln. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die von Schollmeyer et al. (112) verwendeten Antikörper gegen "M-Protein" Verunreinigungen gegen eine als starkes Antigen wirkende Kontaminante enthielten.

Die Frage nach dem Vorkommen und der allfälligen Anzahl von Isoproteinen von Myomesin ist also noch keineswegs geklärt. So wie man auch in glatten Muskeln und in kontraktiven Systemen mancher Nichtmuskelzellen Isoproteine von Aktin und von Myosin findet, die sich zum Teil erheblich von den entsprechenden Proteinen der quergestreiften Muskeln unterscheiden, gibt es möglicherweise auch verschiedene Formen von Myomesin. Myomesin stellt vielleicht ein "universelles" Protein von Aktomyosin-Systemen dar, das beim Aufbau der jeweiligen kontraktiven Struktur eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Eine der auffallendsten Eigenschaften von Myomesin ist wohl seine Organellen-Spezifität. Die starke und spezifische Bindung dieses Proteins an Myosin führt dazu, dass es in der quergestreiften Muskulatur ausschliesslich in der Myofibrillenstruktur gefunden wird. Diese Tatsache ist auch mit dafür verantwortlich, dass der intrazelluläre Nachweis von Myomesin relativ gut gelingt, obwohl dieses Protein nur einen verschwindend kleinen Bruchteil aller Muskelproteine ausmacht. Zudem konzentriert sich Myomesin in den Myofibrillen auf die M-Linienregion, also ausschliesslich auf einen sehr beschränkten Abschnitt der einzelnen Sarkomere. Diese spezifische Lokalisierung in der Mitte der Sarkomere von quergestreiften Myofibrillen ist auch die ausschlaggebende Eigenschaft, der Myomesin seinen Namen verdankt.

#### 2.4.2. Auftreten der M-Linienregion-Proteinkomponenten während der Myogenese

Die an ein muskelspezifisches und für den korrekten Aufbau der Myofibrillen möglicherweise entscheidendes Protein gestellte Anforderung, während der Terminaldifferenzierung myogener Zellen zeitlich koordiniert mit den übrigen "Grundbausteinen" der Myofibrille zu erscheinen, wird von Myomesin vollauf erfüllt. Weder in proliferierenden präsumptiven Myoblasten noch in kultivierten myogenen Zellen, die durch BrdUrd an der Terminaldifferenzierung gehindert werden, lässt sich (muskelspezifisches) Myomesin nachweisen. In den postmitotischen Myoblasten und in den Myotuben erfolgt dann aber ein steiler Anstieg der Myomesin-Syntheserate. Auch wenn myogene Zellen durch Entzug von  $Ca^{++}$  aus dem Medium an einer Fusion zu Myotuben gehindert werden (134, 135) oder wenn

ihnen das Absitzen auf einem Substrat nicht erlaubt wird, indem sie in einem geeigneten Medium kultiviert werden (106, 107), so können sie trotzdem - zumindest was die Bildung von Myofibrillen angeht - terminaldifferenzieren. Entsprechend findet auch in solchen Zellen eine Synthese von Myomesin statt.

Schon in den frühesten Stadien der Myofibrillogenese kann Myomesin in der M-Linienregion der entstehenden Sarkomere nachgewiesen werden, was erneut die hohe Affinität dieses Proteins zu den Myosinfilamenten unterstreicht.

Das Auftreten von Myomesin eignet sich somit nicht nur hervorragend als "Marker" der muskelspezifischen Terminaldifferenzierung an sich, sondern auch - wegen der in allen Fällen beobachteten spezifischen Assoziation von Myomesin mit der Myofibrillenstruktur - als "Marker" für die Entstehung der für die quergestreiften Muskeln typischen Organelle, der Myofibrillen.

Die ausserordentliche Eignung von Myomesin als "Marker" der Terminaldifferenzierung von quergestreifter Muskulatur kann auch dazu ausgenutzt werden, die Position und den Weg von terminaldifferenzierenden myogenen Zellen in den Somiten und Myotomen während der Embryonalentwicklung in vivo zu verfolgen. So vermögen die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen Hühner-Skelettmuskelmyomesin auf Gefrierschnitten durch Hühnerembryonen im Stadium 24 nach Hamburger und Hamilton (42) oder in älteren Stadien eindeutig diejenigen Regionen zu markieren, in denen myogene Zellen in der Terminaldifferenzierung stehen (persönliche Mitteilung von Dr. M. Chiquet).

Das zweite bisher bekannte M-Linienprotein, MM-CK, tritt bei der schon unter 2.4.1. erwähnten Kreatinkinase-Iso-



enzymtransition in Muskelzellen ebenfalls erst während der Terminaldifferenzierung der myogenen Zellen auf. Interessanterweise findet sich aber in den "jungen" Myofibrillen dieser entstehenden Muskelzellen häufig noch keine sichtbare M-Linie, obwohl Myomesin zu diesem Zeitpunkt schon eindeutig in der M-Linienregion nachgewiesen werden kann. Dies bedeutet, dass MM-CK, die ja vermutlich für den grössten Teil der Elektronendichte der M-Linie verantwortlich ist, in "jungen" Muskelzellen - obwohl vorhanden - noch nicht an die M-Linienregion der Myofibrillen gebunden wird. Erst in späteren Stadien der Muskelentwicklung erkennt man in den nun dickeren Myofibrillen eine elektronendichte M-Linie. Die Vermutung liegt nahe, dass das Erscheinen der sichtbaren M-Linie und damit das Auftreten von strukturegebundener MM-CK eine funktionelle "Reifung" der Muskelzellen widerspiegelt (siehe dazu auch 1.4.4.). Möglicherweise sind die Skelettmuskelmyotuben erst zu diesem Zeitpunkt zu spontanen Kontraktionen fähig, dann nämlich, wenn ihre Energiereserve in Form von ATP (wenigstens zum Teil) durch die strukturegebundene MM-CK regeneriert werden kann. Andererseits zeigt sich hier auch, dass eine Innervation bzw. eine regelmässige neurale Stimulation der Myotuben für das Auftreten einer sichtbaren M-Linie nicht unbedingt erforderlich ist. Es könnte aber durchaus sein, dass sich die Struktur der elektronendichten M-Linie (also die Anzahl der M-Brücken-Linien bzw. die Menge an strukturegebundener MM-CK) in den Myotuben in vitro ganz wesentlich von derjenigen in den aus denselben Myoblasten entstehenden Muskelzellen in vivo unterscheidet.

### 2.4.3. Bedeutung der M-Linienregion-Proteinkomponenten für den Aufbau von Myofibrillen

Die mögliche Bedeutung der enzymatischen Aktivität von strukturgebundener MM-CK für die Anpassung von Muskelfasern an die an sie gestellten physiologischen Anforderungen wurde schon unter 1.4.4. hervorgehoben. Für den Aufbau von gut organisierten Myofibrillen scheint die Anwesenheit von MM-CK (und damit auch einer elektrodichten M-Linie!) jedoch keine Notwendigkeit zu sein, wie das Beispiel der Hühner-Herzmyofibrillen sowie der entstehenden "jungen" Myofibrillen in terminaldifferenzierenden myogenen Zellen in vitro zeigt. An dieser Stelle muss allerdings auch auf die in einigen Publikationen gemachte wichtige Feststellung hingewiesen werden, dass die M-Linienstruktur, insbesondere die Anzahl und die räumliche Orientierung der Haupt-M-Brücken (welche gemäss unserer Hypothese vorwiegend aus MM-CK bestehen sollen) einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Symmetrie der Anordnung der Myosinfilamente in der myofibrillären H-Zone ausüben könnte (13, 76, 77, 99).

Während der MM-CK also - neben einer nach wie vor nicht auszuschliessenden strukturellen - eine klar bestimmte enzymatische Funktion zukommt, ist für das zweite bisher bekannte Strukturprotein der M-Linienregion, Myomesin, bis jetzt keine definierte enzymatische Aktivität bekannt. In Präparationen von angereichertem, aber noch nicht weiter gereinigtem Myomesin finden sich neben Phosphorylase-Aktivität mehrere weitere enzymatische Aktivitäten, so vor allem diejenigen von Phosphorylasekinase, Myosin "light-chain"-Kinase und "glycogen debranching enzyme" (133). Gereinigtes Myomesin zeigt aber keine dieser Aktivitäten mehr (133), so dass die einzige

bisher bekannte herausragende Eigenschaft dieses Proteins in seiner ungewöhnlich hohen und spezifischen Bindungsaffinität für Myosin besteht. Diese Eigenschaft macht Myomesin zu einem hervorragenden Kandidaten für ein strukturelles Organisationsprotein des Aufbaus und des Zusammenhalts der Myosinfilamente in der myofibrillären A-Bande. Die Tatsache, dass Myomesin schon in der entstehenden M-Linienregion der ersten erkennbaren dünnen Bündel von räumlich organisierten Myofilamenten in differenzierenden Muskelzellen lokalisiert werden kann, unterstützt die Annahme einer wichtigen "Organisationsrolle" dieses Proteins. Es ist denkbar, dass Myomesin nicht nur für die "richtige" parallele Aneinanderlagerung der Myosinfilamente in der H-Zone der Myofibrillen sowie die Aufrechterhaltung dieser Ordnung mitverantwortlich ist, sondern vielleicht auch beim Aufbau der Myosinfilamente aus einzelnen Myosinmolekülen beteiligt ist.

Die genaue Anordnung der Myosinmoleküle in den Myosinfilamenten der verschiedenen Muskeltypen ist noch keineswegs geklärt und bildet noch immer einen wichtigen Forschungsgegenstand (22, 53, 56, 57, 75, 99, 114, 125, 129, 132). Die Untersuchungen über die Beschaffenheit der Myosinfilamente werden noch dadurch erschwert, dass sich innerhalb des Tierreichs eine enorme Vielfalt von verschieden aufgebauten Muskeln entwickelt hat, was sich auch in einer grossen Variabilität im Aufbau der Myosinfilamente widerspiegelt. Es gilt heute als ziemlich sicher, dass ein einzelnes Myosinfilament nicht nur aus Myosinmolekülen besteht, sondern noch zusätzliche Proteine enthält. Während der Aufbau der Myosinfilamente von vielen Invertebratenmuskeln vermutlich entscheidend von dem schon relativ lange bekannten Paramyosin beeinflusst wird (22, 75, 81, 125), ist die Identifizierung eines entsprechenden Proteins in den Myosinfilamenten

der Vertebratenmuskeln noch nicht eindeutig gelungen, obwohl die Anwesenheit von zusätzlichem Nichtmyosinmaterial in isolierten "dicken" Filamenten schon vor einigen Jahren vermutet wurde (56). Elektronendichte "Verdickungen" der Myosinfilamente beobachtet man vor allem in der mittleren, myosinköpfchenfreien Zone (welche im Sarkomer in die M-Linienregion zu liegen kommt) (56), so dass sich Myomesin wegen seiner entsprechenden Lokalisierung sehr gut als mögliches zusätzliches Protein der "dicken" Filamente eignen würde.

Die Tatsache, dass in Glattmuskel- und in Nichtmuskelzellen kein Myomesin vom Quergestreifmuskeltyp gefunden wird, würde - falls die oben gemachte Annahme der möglichen Wichtigkeit von Myomesin für den Aufbau der Myosinfilamente wirklich zutrifft - gut zu der Beobachtung passen (53, 114), dass sich die "dicken" Filamente aus Glattmuskel- und Nichtmuskelzellen in ihrer Struktur wesentlich von derjenigen der quergestreiften Muskeln unterscheiden. Um die mögliche Funktion von Myomesin bei der "Polymerisation" der Myosinmoleküle zu Filamenten genauer kennenzulernen, wird es deshalb notwendig sein, den Einfluss dieses Proteins auf die Aggregatbildung von isolierten Myosinen aus den verschiedensten Muskeltypen zu studieren.

Die Aufklärung der Rolle von Myomesin bei der geordneten Aneinanderlagerung von einzelnen Myosinfilamenten zu ganzen "A-Banden" bildet ein weiteres interessantes Forschungsobjekt. Auch hier wird die Untersuchung "dicke" Filamente aus den verschiedensten Muskeltypen einschliessen müssen. Der Umstand, dass Glattmuskel- und Nichtmuskelzellen zwar Myosinfilamente enthalten, jedoch kaum geordnete, myofibrillenähnliche Strukturen aufweisen, fordert förmlich zum Studium der Wirkung von (Ske-

lettmuskel-) Myomesin auf eben diese speziellen Filamente heraus.

Dass Myomesin zur Aufrechterhaltung einer genau bestimmten Ordnung der Myosinfilamente in der A-Bande auch während der bei einer Längenveränderung des Sarkomers stattfindenden räumlichen Verschiebung dieser Filamente einen wichtigen Beitrag leisten könnte, wurde schon wiederholt erwähnt. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von grosser Bedeutung, dass Myomesin spezifisch mit der S2-Portion des Myosinmoleküls zu interagieren vermag (79, 80). S2 liegt zwischen dem LMM- und dem globulären S1-Teil des Myosinmoleküls und enthält an den beiden Verbindungsstellen flexible Regionen (52, 124). Gemäss dem Modell von Huxley (57) liegen die S2-Portionen der Myosinmoleküle ausserhalb des "Schaftes" der "dicken" (Myosin-) Filamente und ermöglichen - wegen der flexiblen Regionen an den Uebergangsstellen zum LMM- und zum S1-Teil - die Interaktion der Myosinköpfe mit den "dünnen" (Aktin-) Filamenten, auch wenn der Abstand zwischen den "dicken" und den "dünnen" Filamenten während einer Kontraktion zunimmt. Wenn Myomesin tatsächlich an die S2-Portionen der Myosinmoleküle in den beiden Randzonen der M-Linienregion eines Sarkomers bindet, so wäre damit eine gute Voraussetzung dafür geschaffen, dass Myomesin - z.B. als Bestandteil der M-Filamente - eine wichtige Funktion bei der Anordnung der Myosinfilamente in der myofibrillären H-Zone während des Kontraktions-/Relaxationszyklus ausüben könnte.

Aus dem Studium von Muskelkrankheiten kann man sich weitere Hinweise auf die Bedeutung der M-Linienproteine für den Aufbau und die Funktion der quergestreiften Myofibrillen erhoffen. So findet man bei verschiedenen For-

men von Muskeldystrophien nicht nur häufig eine - verglichen mit normalen Muskelzellen - erhöhte intrazelluläre Umsetzungsrate (bzw. eine kürzere Halbwertszeit) von myofibrillären Proteinen wie z.B. Myosin (60), sondern auch Veränderungen im Isoenzymmuster und in der intra- und extrazellulären Verteilung von CK (60, 68). Damit liegt die Vermutung nahe, dass auch Unterschiede im Aufbau und in der Zusammensetzung der (sichtbaren) M-Linie von Myofibrillen aus normalen und aus bestimmten dystrophen Muskeln auftreten können.

In einer kürzlich erschienenen Studie an kultivierten Brustmuskelzellen aus Hühnerembryonen mit einer vererblichen, autosomal rezessiven Muskeldystrophie wird über das - verglichen mit der Situation in normalen Zellen - verspätete Auftreten von Myosinfilamenten berichtet (1). In den noch später entstehenden Myofibrillen dieser Zellen fehlt eine sichtbare M-Linie und die Myosinfilamente zeigen nur eine "lose" Organisation in der A-Bande der Sarkomere. Eine detaillierte Untersuchung der Proteinzusammensetzung sowie der Ultrastruktur der M-Linienregion solcher Myofibrillen könnte weitere aufschlussreiche Resultate über die Bedeutung der M-Linienstruktur für den Aufbau von quergestreiften Myofibrillen liefern.

Von einer vertieften Kenntnis der für den Aufbau und die Funktion der Myofibrillen entscheidenden Proteinkomponenten darf man sich kaum eine Antwort auf die noch immer umstrittene Frage nach der Herkunft (z.B. "neurogen" oder "myogen") der verschiedenen Muskelkrankheiten versprechen. Die Kenntnis des Aufbaus der für die Funktion der quergestreiften Muskulatur hauptverantwortlichen Organelle kann jedoch für die Diagnose von Muskelabnormalitäten von Bedeutung sein; zudem bildet sie eine wichtige Grundlage für das Verständnis des noch lange

nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus der Umsetzung  
von chemischer in mechanische Energie in den Lebewesen.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Allen, E.R. and May, J.F.  
(1979) Virchows Arch. B Cell Path. 31, 243-250.  
Aspects of normal and dystrophic chicken muscle grown in vitro.
- (2) Allen, E.R. and Pepe, F.A.  
(1965) Am. J. Anat. 116, 115-148.  
Ultrastructure of developing muscle cells in the chick embryo.
- (3) Ash, J.F., Louvard, D. and Singer, S.J.  
(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5584-5588.  
Antibody-induced linkage of plasma membrane proteins to intracellular actomyosin-containing filaments in cultured fibroblasts.
- (4) Bogenmann, E. and Eppenberger, H.M.  
(1980) J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 17-27.  
DNA-synthesis and polyploidization of chicken heart muscle cells in mass cultures.
- (5) Botts, J., Stone, D.B., Wang, A.T.L. and Mendelson, R.A.  
(1975) J. Supramol. Struct. 3, 141-145.  
Electron paramagnetic resonance and nanosecond fluorescence depolarization studies on creatine-phosphokinase interaction with myosin and its fragments.
- (6) Brunk, C.F., Jones, K.C. and James, T.W.  
(1979) Anal. Biochem. 92, 497-500.  
Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates.



- (7) Caravatti, M.  
(1979) Dissertation ETH Zürich No. 6444.  
Synthese und Degradation von Kreatin-Kinase-Untereinheiten während der Terminaldifferenzierung embryonaler Hühner-Skelettmuskelzellen in vitro.
- (8) Caravatti, M., Perriard, J.-C. and Eppenberger, H.M.  
(1979) J. Biol. Chem. 254, 1388-1394.  
Developmental regulation of creatine kinase isoenzymes in myogenic cell cultures from chicken. Biosynthesis of creatine kinase subunits M and B.
- (9) Chi, J.C.H., Rubinstein, N., Strahs, K. and Holtzer, H.  
(1975) J. Cell Biol. 67, 523-537.  
Synthesis of myosin heavy and light chains in muscle cultures.
- (10) Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K.  
(1977) J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.  
Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis.
- (11) Corsi, A., Muscatello, U. and Ronchetti, I.  
(1967) J. Ultrastruct. Res. 19, 260-272.  
Electron microscope observations of the location of actin and tropomyosin in the rabbit myofibril.
- (12) Corsi, A. and Perry, S.V.  
(1958) Biochem. J. 68, 12-17.  
Some observations on the localization of myosin, actin and tropomyosin in the rabbit myofibril.

- (13) Craig, R.  
(1977) J. Mol. Biol. 109, 69-81.  
Structure of A-segments from frog and rabbit skeletal muscle.
- (14) Dawson, D.M. and Eppenberger, H.M.  
(1970) Methods Enzymol. 17A, 995-1002.  
Creatine kinase (chicken skeletal and heart muscle; rabbit brain).
- (15) Dawson, D.M., Eppenberger, H.M. and Kaplan, N.O.  
(1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 346-353.  
Creatine kinase: evidence for a dimeric structure.
- (16) Devlin, R.B. and Emerson, C.P., Jr.  
(1978) Cell 13, 599-611.  
Coordinated regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation.
- (17) Devlin, R.B. and Emerson, C.P., Jr.  
(1979) Dev. Biol. 69, 202-216.  
Coordinate accumulation of contractile protein mRNAs during myoblast differentiation.
- (18) Dhanarajan, Z.C. and Atkinson, B.G.  
(1980) Can. J. Biochem. 58, 516-526.  
M-line protein preparations from frog skeletal muscle: isolation and localization of an M-line protein and a 105,000 dalton polypeptide contaminant.
- (19) Doetschman, T.C., Dym, H.P., Siegel, E.J. and Heywood, S.M.  
(1980) Differentiation 16, 149-162.  
Myoblast stored myosin heavy chain transcripts are precursors to the myotube polysomal myosin heavy chain mRNAs.

- (20) Draper, M.H. and Hodge, A.J.  
(1949) Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. 27, 465.  
Studies on muscle with the electron microscope. I. The ultrastructure of toad striated muscle.
- (21) Eaton, B.L. and Pepe, F.A.  
(1972) J. Cell Biol. 55, 681-695.  
M band protein. Two components isolated from chicken breast muscle.
- (22) Elliott, A.  
(1974) Proc. R. Soc. 186, 53-66.  
The arrangement of myosin on the surface of paramyosin filaments in the white adductor muscle of *Crassostrea angulata*.
- (23) Elliott, G.F., Lowy, J. and Millman, B.M.  
(1965) Nature 206, 1357-1358.  
X-ray diffraction from living striated muscle during contraction.
- (24) Elliott, G.F., Lowy, J. and Millman, B.M.  
(1967) J. Mol. Biol. 25, 31-45.  
Low angle X-ray diffraction studies of living striated muscle during contraction.
- (25) Elliott, G.F., Lowy, J. and Worthington, C.R.  
(1963) J. Mol. Biol. 6, 295-305.  
An X-ray and light-diffraction study of the filament lattice of striated muscle in the living state and in rigor.
- (26) Emerson, C.P., Jr. and Beckner, S.H.  
(1975) J. Mol. Biol. 93, 431-448.  
Activation of myosin synthesis in fusing and mononucleated myoblasts.

- (27) Eppenberger, H.M., Dawson, D.M. and Kaplan, N.O.  
(1967) J. Biol. Chem. 242, 204-209.  
The comparative enzymology of creatine kinases. I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues.
- (28) Eppenberger, H.M., Eppenberger, M.E., Richterich, R. and Aebi, H.  
(1964) Dev. Biol. 10, 1-16.  
The ontogeny of creatine kinase isoenzymes.
- (29) Eppenberger, H.M., Eppenberger, M.E. and Scholl, A.  
(1970) FEBS Proc. Meet. 18, 269-279.  
Comparative aspects of creatine kinase isoenzymes.
- (30) Eppenberger, H.M., Wallimann, T., Kuhn, H.J. and Turner, D.C.  
(1975) In: Isozymes II. C. Markert, editor. Academic Press, Inc., New York. 409-424.  
Localization of creatine kinase isoenzymes in muscle cells: physiological significance.
- (31) Etlinger, J.D. and Fischman, D.A.  
(1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 511-522.  
M and Z band components and the assembly of myofibrils.
- (32) Etlinger, J.D., Zak, R. and Fischman, D.A.  
(1976) J. Cell Biol. 68, 123-141.  
Compositional studies of myofibrils from rabbit striated muscle.
- (33) Farrell, E.C., Jr., Bab, N., Brierley, G.P. and Grümer, H.-D.  
(1972) Lab. Invest. 27, 209-213.  
On the creatine kinase of heart muscle mitochondria.

- (34) Firket, H.  
(1967) Z. Zellforsch. 78, 313-327.  
Ultrastructural aspects of myofibril formation in cultured skeletal muscle.
- (35) Fischbach, G.D.  
(1972) Dev. Biol. 28, 407-429.  
Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures.
- (36) Fischman, D.A.  
(1967) J. Cell Biol. 32, 557-575.  
An electron microscope study of myofibril formation in embryonic chick skeletal muscle.
- (37) Fischman, D.A.  
(1970) Cur. Top. Dev. Biol. 5, 235-280.  
The synthesis and assembly of myofibrils in embryonic muscle.
- (38) Franzini-Armstrong, C. and Porter, K.R.  
(1964) J. Cell Biol. 22, 675-696.  
Sarcolemmal invaginations constituting the T system in fish muscle fibers.
- (39) Gergely, J.  
(1950) Fed. Proc. 9, 176.  
Relation of ATP-ase and myosin.
- (40) Hall, C.E., Jakus, M.A. and Schmitt, F.O.  
(1946) Biol. Bull. 90, 32.  
An investigation of cross-striations and myosin filaments in muscle.

- (41) Hall, N.; Addis, P. and DeLuca M.  
(1979) *Biochemistry* 18, 1745-1751.  
Mitochondrial creatine kinase. Physical and kinetic properties of the purified enzyme from beef heart.
- (42) Hamburger, V. and Hamilton, H.L.  
(1951) *J. Morphol.* 88, 49-92.  
A series of normal steps in the development of the chick embryo.
- (43) Hanson, J. and Huxley, H.E.  
(1953) *Nature* 172, 530-532.  
Structural basis of the cross-striations in muscle.
- (44) Hay, E.D.  
(1963) *Z. Zellforsch.* 59, 6-34.  
The fine structure of differentiating muscle in the salamander tail.
- (45) Heizmann, C.W., Bläuenstein, I.E. and Eppenberger, H.M.  
(1978) *Experientia (Basel)* 34, 38-40.  
Comparison of the localization of several muscle proteins in relaxed and contracted myofibrils.
- (46) Heizmann, C. and Eppenberger, H.M.  
(1976) *Experientia (Basel)* 32, 755.  
M-line proteins from chicken muscle.
- (47) Heizmann, C.W. and Eppenberger, H.M.  
(1978) *J. Biol. Chem.* 253, 270-277.  
Isolation and characterization of glycogen phosphorylase b from chicken breast muscle. Comparison with a protein extracted from the M-line.

- (48) Heizmann, C.W. and Eppenberger, H.M.  
(1979) FEBS Lett. 105, 35-39.  
Glycogen debranching enzyme from chicken pectoralis muscle. Comparison with a 165,000 molecular weight myofibrillar protein.
- (49) Herasymowych, O.S., Mani, R.S. and Kay, C.M.  
(1978) Biochim. Biophys. Acta 534, 38-47.  
Isolation, purification and characterization of creatine kinase from bovine cardiac muscle.
- (50) Herasymowych, O.S., Mani, R.S., Kay, C.M., Bradley, R.D. and Scraba, D.G.  
(1980) J. Mol. Biol. 136, 193-198.  
Ultrastructure studies on the binding of creatine kinase and the 165,000 molecular weight component to the M-band of muscle.
- (51) Hibbs, R.G.  
(1956) Am. J. Anat. 99, 17-51.  
Electron microscopy of developing cardiac muscle in chick embryos.
- (52) Highsmith, S., Kretschmar, K.M., O'Konski, C.T. and Morales, M.F.  
(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4986-4990.  
Flexibility of myosin rod, light meromyosin, and myosin subfragment-2 in solution.
- (53) Hinssen, H., D'Haese, J., Small, J.V. and Sobieszek, A.  
(1978) J. Ultrastruct. Res. 64, 282-302.  
Mode of filament assembly of myosins from muscle and nonmuscle cells.

- (54) Houk, T.W., Jr. and Putnam, S.V.  
(1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1271-1277.  
Location of the creatine phosphokinase binding site of myosin.
- (55) Huang, C.Y.  
(1967) *J. Ultrastruct. Res.* 20, 211-226.  
Electron microscopic study of the development of heart muscle of the frog, *Rana pipiens*.
- (56) Huxley, H.E.  
(1963) *J. Mol. Biol.* 7, 281-308.  
Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle.
- (57) Huxley, H.E.  
(1969) *Science* 164, 1356-1366.  
The mechanism of muscular contraction.
- (58) Huxley, H.E.  
(1972) In: *The structure and function of muscle*. Vol. I. G.H. Bourne, editor. Academic Press, Inc., New York. 301-387.  
Molecular basis of contraction in cross-striated muscles.
- (59) Huxley, H.E. and Hanson, J.  
(1957) *Biochim. Biophys. Acta* 23, 229-249.  
Quantitative studies on the structure of cross-striated myofibrils. I. Investigations by interference microscopy.
- (60) Ionasescu, V., Ionasescu, R., Witte, D., Feld, R., Cancilla, P., Kaeding, L., Kraus, L. and Stern, L.  
(1980) *J. Neurol. Sci.* 46, 157-168.  
Altered protein synthesis and creatine kinase in breast muscle cell cultures from dystrophic chick embryos.



- (61) Jacobs, H., Heldt, H.W. and Klingenberg, M.  
(1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 516-521.  
High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain. Evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase.
- (62) Jacobus, W.E. and Lehninger, A.L.  
(1973) J. Biol. Chem. 248, 4803-4810.  
Creatine kinase of heart mitochondria: coupling of creatine phosphorylation to electron transport.
- (63) Jockusch, H. and Jockusch, B.M.  
(1980) Dev. Biol. 75, 231-238.  
Structural organization of the Z-line protein,  $\alpha$ -actinin, in developing skeletal muscle cells.
- (64) Ketelsen, U.-P. and Wekerle, H.  
(1976) Differentiation 5, 185-187.  
Thymus-derived striated muscle clones. An ultrastructural analysis of cell differentiation.
- (65) Kilarski, W. and Jakubowska, M.  
(1979) Z. mikrosk.-anat. Forsch. (Leipzig) 93, 1159-1181.  
An electron microscope study of myofibril formation in embryonic rabbit skeletal muscle.
- (66) Knappeis, G.G. and Carlsen, F.  
(1962) J. Cell Biol. 13, 323-335.  
The ultrastructure of the Z disc in skeletal muscle.
- (67) Knappeis, G.G. and Carlsen, F.  
(1968) J. Cell Biol. 38, 202-211.  
The ultrastructure of the M line in skeletal muscle.

- (68) Kuby, S.A., Palmieri, R.H., Okabe, K., Frischat, A. and Cress, M.C.  
(1979) Arch. Biochem. Biophys. 194, 336-353.  
Studies on muscular dystrophy: a comparison by physical and chemical means of the normal human ATP-creatine transphosphorylases (creatine kinases) with those from tissues of Duchenne muscular dystrophy.
- (69) Kundrat, E. and Pepe, F.A.  
(1971) J. Cell Biol. 48, 340-347.  
The M-band. Studies with fluorescent antibody staining.
- (70) Laemmli, U.K.  
(1970) Nature 227, 680-685.  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
- (71) Landon, M.-F. and Oriol, C.  
(1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 241-245.  
Native conformation of M-protein.
- (72) Lang, A.B.  
(1980) Dissertation ETH Zürich No. 6694.  
Biochemische, immun cytologische und genetische Untersuchungen verschiedener Muskeltypen von *Drosophila melanogaster*.
- (73) Lang, A.B., Wyss, C. and Eppenberger, H.M.  
(1980) J. Muscle Res. Cell Motility 1, 147-161.  
Localization of arginine kinase in muscle fibres of *Drosophila melanogaster*.
- (74) Layne, E.  
(1957) Methods Enzymol. 3, 447-454.  
Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins.

- (75) Levine, R.J.C., Elfvin, M., Dewey, M.M. and Walcott, B.  
(1976) J. Cell Biol. 71, 273-279.  
Paramyosin in invertebrate muscles. II. Content in relation to structure and function.
- (76) Luther, P. and Squire, J.  
(1978) J. Mol. Biol. 125, 313-324.  
Three-dimensional structure of the vertebrate muscle M-region.
- (77) Luther, P.K. and Squire, J.M.  
(1980) J. Mol. Biol. 141, 409-439.  
Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. II. The myosin filament superlattice.
- (78) Mani, R.S. and Kay, C.M.  
(1978) Biochim. Biophys. Acta 533, 248-256.  
Isolation and characterization of the 165,000 dalton protein component of the M-line of rabbit skeletal muscle and its interaction with creatine kinase.
- (79) Mani, R.S. and Kay, C.M.  
(1978) Biochim. Biophys. Acta 536, 134-141.  
Interaction studies of the 165,000 dalton protein component of the M-line with the S2 subfragment of myosin.
- (80) Mani, R.S. and Kay, C.M.  
(1979) J. Biochem. (Tokyo) 86, 1817-1820.  
Interaction studies of a 100,000 dalton chymotryptic fragment of rabbit skeletal M-line protein with the S2 subfragment of myosin.
- (81) Margulis, B.A., Bobrova, I.F., Mashanski, V.F. and Pinaev, G.P.  
(1979) Comp. Biochem. Physiol. 64A, 291-298.  
Major myofibrillar protein content and the structure of mollusc adductor contractile apparatus.

- (82) Markwald, R.R.  
(1973) J. Mol. Cell. Cardiol. 5, 341-350.  
Distribution and relationship of precursor Z material to organizing myofibrillar bundles in embryonic rat and hamster ventricular myocytes.
- (83) Masaki, T. and Takaiti, O.  
(1972) J. Biochem. (Tokyo) 71, 355-357.  
Purification of M-protein.
- (84) Masaki, T. and Takaiti, O.  
(1974) J. Biochem. (Tokyo) 75, 367-380.  
M-protein.
- (85) Masaki, T., Takaiti, O. and Ebashi, S.  
(1968) J. Biochem. (Tokyo) 64, 909-910.  
"M-substance", a new protein constituting the M-line of myofibrils.
- (86) Merlie, J.P. and Gros, F.  
(1976) Exp. Cell Res. 97, 406-412.  
In vitro myogenesis. Expression of muscle-specific function in the absence of cell fusion.
- (87) Merrill, C.R., Switzer, R.C. and Van Keuren, M.L.  
(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4335-4339.  
Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain.
- (88) Meyer, F., Heilmeyer, L.M.G., Jr., Haschke, R.H. and Fischer, E.H.  
(1970) J. Biol. Chem. 245, 6642-6648.  
Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. Isolation and characterization of the protein-glycogen complex.

- (89) Morimoto, K. and Harrington, W.F.  
(1972) J. Biol. Chem. 247, 3052-3061.  
Isolation and physical chemical properties of an M-line protein from skeletal muscle.
- (90) Moss, P.S. and Strohman, R.C.  
(1976) Dev. Biol. 48, 431-437.  
Myosin synthesis in fusion arrested chick embryo myoblasts in cell culture.
- (91) Mueller, H.  
(1965) J. Biol. Chem. 240, 3816-3828.  
Characterization of the molecular region containing the active sites of myosin.
- (92) Mueller, H. and Perry, S.V.  
(1961) Biochim. Biophys. Acta 50, 599-601.  
Studies on the tryptic digestion of heavy meromyosin.
- (93) Obinata, T., Yamamoto, M. and Maruyama, K.  
(1966) Dev. Biol. 14, 192-213.  
The identification of randomly formed thin filaments in differentiating muscle cells of the chick embryo.
- (94) O'Neill, M.C. and Stockdale, F.E.  
(1974) Dev. Biol. 37, 117-132.  
5-Bromodeoxyuridine inhibition of differentiation. Kinetics of inhibition and reversal in myoblasts.
- (95) Ouchterlony, O.  
(1967) In: Handbook of Experimental Immunology. D.M. Weir, editor. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford. 655-706.  
Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis.

- (96) Page, S.G.  
(1965) J. Cell Biol. 26, 477-497.  
A comparison of the fine structures of frog slow and twitch muscle fibres.
- (97) Palmer, E.G.  
(1975) Can. J. Zool. 53, 788-799.  
Antibody localization studies of the M-line in striated muscle.
- (98) Paterson, B. and Strohman, R.C.  
(1972) Dev. Biol. 29, 113-138.  
Myosin synthesis in cultures of differentiating chicken embryo skeletal muscle.
- (99) Pepe, F.A.  
(1967) J. Mol. Biol. 27, 203-225.  
The myosin filament. I. Structural organization from antibody staining observed in electron microscopy.
- (100) Pepe, F.A.  
(1971) Progr. Biophys. Mol. Biol. 22, 77-96.  
Structure of the myosin filament of striated muscle.
- (101) Perriard, J.-C.  
(1979) J. Biol. Chem. 254, 7036-7041.  
Developmental regulation of creatine kinase isoenzymes in myogenic cell cultures from chicken. Levels of mRNA for creatine kinase subunits M and B.
- (102) Perriard, J.-C., Caravatti, M., Perriard, E.R. and Eppenberger, H.M.  
(1978) Arch. Biochem. Biophys. 191, 90-100.  
Quantitation of creatine kinase isoenzyme transitions in differentiating chicken embryonic breast muscle and myogenic cell cultures by immunoadsorption.

- (103) Perriard, J.-C., Perriard, E.R. and Eppenberger, H.M.  
(1978) J. Biol. Chem. 253, 6529-6535.  
Detection and relative quantitation of mRNA for creatine kinase isoenzymes in RNA from myogenic cell cultures and embryonic chicken tissues.
- (104) Perry, S.V. and Corsi, A.  
(1958) Biochem. J. 68, 5-12.  
Extraction of proteins other than myosin from the isolated rabbit myofibril.
- (105) Porter, R.R.  
(1959) Biochem. J. 73, 119-127.  
The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain.
- (106) Puri, E.C.  
(1979) Dissertation ETH Zürich No. 6449.  
Skeletal muscle development in culture.
- (107) Puri, E.C., Caravatti, M., Perriard, J.-C., Turner, D.C. and Eppenberger, H.M.  
(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5297-5301.  
Anchorage-independent muscle cell differentiation.
- (108) Rice, R.V.  
(1961) Biochim. Biophys. Acta 52, 602-604.  
Conformation of individual macromolecular particles from myosin solutions.
- (109) Saetersdal, T., Engedal, H., Lie, R. and Myklebust, R.  
(1980) Cell Tissue Res. 207, 21-29.  
On the origin of Z-band material and myofilaments in myoblasts from the human atrial wall.

- (110) Samosudova, N.V.  
(1966) In: Electron Microscopy. R. Uyeda, editor. Maruzen Co., Ltd., Tokyo. 691-692.  
The ultrastructure of myofibrils after the extraction of protein other than myosin.
- (111) Schiebler, T.H. and Wolff, H.H.  
(1966) Z. Zellforsch. 69, 22-40.  
Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Herzmuskel der Ratte während der Entwicklung.
- (112) Schollmeyer, J.E., Furcht, L.T., Goll, D.E., Robson, R.M. and Stromer, M.H.  
(1976) Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation 3A, 361-388.  
Localization of contractile proteins in smooth muscle cells and in normal and transformed fibroblasts.
- (113) Shimada, Y., Fischman, D.A. and Moscona, A.A.  
(1967) J. Cell Biol. 35, 445-453.  
The fine structure of embryonic chick skeletal muscle cells differentiated in vitro.
- (114) Shoenberg, C.F. and Stewart, M.  
(1980) J. Muscle Res. Cell Motility 1, 117-126.  
Filament formation in smooth muscle homogenates.
- (115) Showe, M.K., Isobe, E. and Onorato, L.  
(1976) J. Mol. Biol. 107, 55-69.  
Bacteriophage T4 prehead proteinase. II. Its cleavage from the product of gene 21 and regulation in phage-infected cells.
- (116) Sjöström, M. and Squire, J.  
(1977) J. Mol. Biol. 109, 49-68.  
Fine structure of the A-band in cryo-sections.



- (117) Sjöström, M. and Squire, J.M.  
(1977) J. Microsc. (Oxf.) 111, 239-278.  
Cryo-ultramicrotomy and myofibrillar fine structure:  
A review.
- (118) Slayter, H.S. and Lowey, S.  
(1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58, 1611-1618.  
Substructure of the myosin molecule as visualized by  
electron microscopy.
- (119) Sober, H.A. and Peterson, E.A.  
(1958) Fed. Proc. 17, 1116-1126.  
Protein chromatography on ion exchange cellulose.
- (120) Sommer, J.R. and Johnson, A.  
(1969) Z. Zellforsch. 98, 437-468.  
The ultrastructure of frog and chicken cardiac muscle.
- (121) Spiro, D.  
(1962) Trans. N.Y. Acad. Sci. 24, 879-885.  
The ultrastructure of heart muscle.
- (122) Strehler, E.E.  
(1977) Diplomarbeit ETH Zürich.  
Isolation und Charakterisierung von Parvalbumin und Par-  
valbumin-ähnlichen Proteinen aus dem Hühner Skelettmus-  
kel.
- (123) Stromer, M.H., Hartshorne, D.J., Mueller, H. and Rice,  
R.V.  
(1969) J. Cell Biol. 40, 167-178.  
The effect of various protein fractions on Z- and M-line  
reconstitution.

- (124) Sutoh, K., Sutoh, K., Karr, T. and Harrington, W.F.  
(1978) J. Mol. Biol. 126, 1-22.  
Isolation and physico-chemical properties of a high molecular weight subfragment-2 of myosin.
- (125) Szent-Györgyi, A.G., Cohen, C. and Kendrick-Jones, J.  
(1971) J. Mol. Biol. 56, 239-258.  
Paramyosin and the filaments of molluscan "smooth" muscles. II. Native filaments: isolation and purification.
- (126) Szent-Györgyi, A.G., Cohen, C. and Philpott, D.E.  
(1960) J. Mol. Biol. 2, 133-142.  
Light meromyosin fraction I: A helical molecule from myosin.
- (127) Taylor, C., Cox, A.J., Kernohan, J.C. and Cohen, P.  
(1975) Eur. J. Biochem. 51, 105-115.  
Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle. Purification, properties and physiological role.
- (128) Thornell, L.E. and Sjöström, M.  
(1975) J. Microsc. (Oxf.) 104, 263-268.  
The myofibrillar M-band in cryo-section analysis of section thickness.
- (129) Tregear, R.T. and Squire, J.M.  
(1973) J. Mol. Biol. 77, 279-290.  
Myosin content and filament structure in smooth and striated muscle.
- (130) Trinick, J.A.  
(1974) Fed. Proc. 33, 1580.  
Identity of the 90,000 dalton M-protein from chicken muscle.

- (131) Trinick, J.A.  
(1975) Fed. Proc. 34, 540.  
Purification of M-line protein from chicken breast muscle.
- (132) Trinick, J. and Elliott, A.  
(1979) J. Mol. Biol. 131, 133-136.  
Electron microscope studies of thick filaments from vertebrate skeletal muscle.
- (133) Trinick, J. and Lowey, S.  
(1977) J. Mol. Biol. 113, 343-368.  
M-Protein from chicken pectoralis muscle: Isolation and characterization.
- (134) Turner, D.C., Gmür, R., Lebherz, H.G., Siegrist, M., Wallimann, T. and Eppenberger, H.M.  
(1976) Dev. Biol. 48, 284-307.  
Differentiation in cultures derived from embryonic chicken muscle. II. Phosphorylase histochemistry and fluorescent antibody staining for creatine kinase and aldolase.
- (135) Turner, D.C., Gmür, R., Siegrist, M., Burckhardt, E. and Eppenberger, H.M.  
(1976) Dev. Biol. 48, 258-283.  
Differentiation in cultures derived from embryonic chicken muscle. I. Muscle-specific enzyme changes before fusion in EGTA-synchronized cultures.
- (136) Turner, D.C., Maier, V. and Eppenberger, H.M.  
(1974) Dev. Biol. 37, 63-89.  
Creatine kinase and aldolase isoenzyme transitions in cultures of chick skeletal muscle cells.

- (137) Turner, D.C., Wallimann, T. and Eppenberger, H.M.  
(1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 702-705.  
A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase.
- (138) Vertel, B.M. and Fischman, D.A.  
(1976) Dev. Biol. 48, 438-446.  
Myosin accumulation in mononucleated cells of chick muscle cultures.
- (139) Wainrach, S. and Sotelo, J.R.  
(1961) Z. Zellforsch. 55, 622-634.  
Electron microscope study of the developing chick embryo heart.
- (140) Wallimann, T.  
(1975) Dissertation ETH Zürich No. 5437.  
Creatinkinase-Isoenzyme und Myofibrillen-Struktur.
- (141) Wallimann, T., Kuhn, H.J., Pelloni, G., Turner, D.C. and Eppenberger, H.M.  
(1977) J. Cell Biol. 75, 318-325.  
Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. II. Chicken heart muscle.
- (142) Wallimann, T., Pelloni, G., Turner, D.C. and Eppenberger, H.M.  
(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4296-4300.  
Monovalent antibodies against MM-creatine kinase remove the M-line from myofibrils.
- (143) Wallimann, T., Turner, D.C. and Eppenberger, H.M.  
(1977) J. Cell Biol. 75, 297-317.  
Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. I. Chicken skeletal muscle.

- (144) Wekerle, H., Paterson, B., Ketelsen, U.-P. and Feldman, M.  
(1975) Nature 256, 493-494.  
Striated muscle fibres differentiate in monolayer cultures of adult thymus reticulum.
- (145) Young, R.B., Goll, D.E. and Stromer, M.H.  
(1975) Dev. Biol. 47, 123-135.  
Isolation of myosin-synthesizing polysomes from cultures of embryonic chicken myoblasts before fusion.
- (146) Zobel, C.R. and Carlson, F.D.  
(1963) J. Mol. Biol. 7, 78-89.  
An electron microscopic investigation of myosin and some of its aggregates.

PUBLIKATIONSLISTE

FULL PAPERS

- Strehler, E.E., Eppenberger, H.M. and Heizmann, C.W.  
(1977) FEBS Lett. 78, 127-133.  
Isolation and characterization of parvalbumin from chicken leg-muscle.
  
- Heizmann, C.W. and Strehler, E.E.  
(1979) J. Biol. Chem. 254, 4296-4303.  
Chicken parvalbumin. Comparison with parvalbumin-like protein and three other components ( $M_r = 8,000$  to 13,000).
  
- Strehler, E.E., Pelloni, G., Heizmann, C.W. and Eppenberger, H.M.  
(1979) Exp. Cell Res. 124, 39-45.  
M-protein in chicken cardiac muscle.
  
- Strehler, E.E., Pelloni, G., Heizmann, C.W. and Eppenberger, H.M.  
(1980) J. Cell Biol. 86, 775-783.  
Biochemical and ultrastructural aspects of  $M_r$  165,000 M-protein in cross-striated chicken muscle.
  
- Eppenberger, H.M., Perriard, J.-C., Rosenberg, U.B. and Strehler, E.E.  
(1981) J. Cell Biol., in press.  
The  $M_r$  165,000 M-protein Myomesin: A specific protein of cross-striated muscle cells.

PUBLISHED ABSTRACTS

- Strehler, E.E., Eppenberger, H.M. and Heizmann, C.W.  
(1978) *Experientia* (Basel) 34, 919.  
Low molecular weight calcium-binding proteins from chicken muscle.  
(10th annual meeting of the Union of Swiss Societies of Experimental Biology (USSEB), May 19-20, 1978; Davos, Switzerland)
  
- Strehler, E. and Eppenberger, H.M.  
(1979) *Experientia* (Basel) 35, 944-945.  
Immunochemical detection of M-protein.  
(11th annual meeting of the USSEB, April 20-21, 1979; Geneva, Switzerland)
  
- Strehler, E.E. and Eppenberger, H.M.  
(1980) *J. Muscle Res. Cell Motility* 1, 206.  
M-protein in chicken muscle.  
(Proc. 8th Eur. Conf. Muscle & Motility, September 17-20, 1979; Heidelberg, West Germany)
  
- Eppenberger, H.M., Strehler, E., Rosenberg, U., Turner, D. and Perriard, J.-C.  
(1980) *Experientia* (Basel) 36, 743.  
Myofibrillogenesis in muscle cell culture: The 165K M-protein as marker of assembly.  
(12th annual meeting of the USSEB, March 13-14, 1980; Basle, Switzerland)
  
- Eppenberger, H.M. and Strehler, E.E.  
(1980) *Eur. J. Cell Biol.* 22, 400.  
Myofibrillogenesis in muscle cell culture: The 165K M-protein as marker of assembly.  
(2nd Int. Congress on Cell Biology, August 31 - September 5, 1980; Berlin (West))

- Strehler, E.E. and Eppenberger, H.M.

(1980) J. Muscle Res. Cell Motility 1, 481.

The 165K M-protein (myomesin) is specific for cross-striated muscle. Is it a prerequisite for myofibrillar assembly?

(9th Eur. Congress on Muscle & Motility, September 15-18, 1980; Salzburg, Austria)

#### ABSTRACTS

- Heizmann, C.W. and Strehler, E.E.

Comparison of chicken parvalbumin with a parvalbumin-like protein and three other components ( $M_r = 8,000$  to  $13,000$ ) and study of its biological function.

Proc. 7th Eur. Conf. Muscle & Motility, June 29 - July 1, 1978; Warsaw, Poland.

- Eppenberger, H.M. and Strehler, E.E.

Immunofluorescence studies of M-line components during myofibrillogenesis in culture.

EMBO workshop on: Muscle cell culture in the study of gene expression during differentiation, March 9-14, 1980; Shohesh, Israel.



LEBENS LAUF

- 1954 Geboren am 17. Juni in Zürich
- 1961 - 1967 Primarschule in Feldbach/ZH
- 1967 - 1973 Kantonsschule Zürcher Oberland in Wetzikon/ZH  
Abschluss mit Matura Typus B
- 1973 - 1977 Studium an der Abteilung für Naturwissenschaften der  
Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich,  
Teilrichtung Bd (Biochemie)  
Abschluss als dipl. Natw. ETH
- 1978 - 1980 Anstellung als Assistent II am Institut für Zellbio-  
logie der ETH; Dissertation unter der Leitung von  
Prof. Dr. H.M. Eppenberger