

Zellbiologische Charakterisierung des PDZ- und
LIM-Domäne Proteins CLP-36

Kristin Bauer

2000

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Zellbiologische Charakterisierung des PDZ- und
LIM-Domäne Proteins CLP-36

Kristin Bauer

aus

München

2000

Erklärung

Diese Dissertation wurde in Sinne von § 13 Abs 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolfgang Siess betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 20.12.2000

.....
(Unterschrift des Autors)

Dissertation eingereicht am 16.11.2000

1. Gutachter Prof. Dr. Wolfgang Siess

2. Gutachter Prof. Dr. Angelika Vollmar

Mündliche Prüfung am 21.12.2000

Ich glaube ja immer noch, dass das
alles eine große Metapher ist. Ich weiß
nur noch nicht wofür.

Werner Herzog

Im Grunde sind das lauter Gemeinheiten.

Heimito von Doderer

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	3
2.1	Hintergrund	3
2.2	Aufgabenstellung	4
2.3	Theoretische Grundlagen	4
2.3.1	Das Aktinzytoskelett	4
2.3.2	Die Proteinbindungsdomänen PDZ und LIM	11
3	Material und Methoden	18
3.1	Feinchemikalien	18
3.2	Enzyme	19
3.3	Antikörper	19
3.4	Zellkultur	20
3.4.1	HUVEC-Zellen	20
3.4.2	PtK2-Zellen und glatte Muskelzellen	21
3.5	Transformation von HUVEC-Zellen und PtK2-Zellen	21
3.5.1	Elektroporation der Endothelzellen	21
3.5.2	Transformation von PtK2-Zellen nach der Calcium-Phosphat-Methode	21
3.6	Präparation der Blutplättchen	22
3.7	CLP-36 Anti-Seren	23
3.7.1	Gewinnung	23
3.7.2	Reinigung durch Protein A–Sepharose und Affinitätsreinigung	24
3.8	Isolation des Aktinmembranskeletts und des zytoplasmatischen Aktinzytoskeletts aus Plättchenlysaten	25
3.9	Präparation der aktinbindenden Proteinfraktion aus Blutplättchen	26
3.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
3.10.1	Material und Lösungen	27
3.10.2	Herstellung des Polyacrylamidgel	28
3.11	Anfärbung von Proteinen in Gel	29
3.11.1	Coomassie-Proteinfärbung	29
3.11.2	Silberfärbung	30
3.12	Quantitative Proteinbestimmung	31

Inhaltsverzeichnis

3.13	Immunologische Techniken	32
3.13.1	Western-Blotting: Proteintransfer und Immundetektion	32
3.13.2	Immunpräzipitation	34
3.13.3	Immunopull-down Assay	35
3.13.4	Cytochemische Immundetektion durch Immunfluoreszenz und Immunogold-Elektronenmikroskopie	36
3.14	Mikroinjektion von Antikörper	39
3.15	Rekombinante Expression und Reinigung der Polyhistidin- und GST-Fusionsproteine	39
3.15.1	Expression in <i>E.coli</i> und Proteinextraktion	39
3.15.2	Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose	41
3.15.3	Gelfiltration	41
3.15.4	Anionenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Sepharose	42
3.16	Untersuchung der Phosphorylierung von CLP-36	43
3.16.1	Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung	43
3.16.2	Detektion der Serinphosphorylierung im Immunoblot	44
3.16.3	Phosphorylierungs-Assay mit den LIM-Kinasen I und II	44
3.17	Affinitätsblotting: Blot-overlay assay	45
3.18	Yeast two-hybrid Assay	46
3.18.1	Klonierung der Plasmide	48
3.18.2	Lithium-acetat Transformation	49
3.18.3	β -Galaktosidase Assay	50
3.18.4	Präparation von Hefeprotein-Extrakten	51
3.19	Viskoelastische Messungen an Aktinnetzwerken	52
3.20	<i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide	54
3.21	Klonierung in <i>E.coli</i> und DNA-Präparation	55
3.21.1	Enzyme	55
3.21.2	Puffer	55
3.21.3	Nährmedien für <i>E.coli</i> und Zusätze	55
3.21.4	Vorgehensweise	56
3.21.5	Molekularbiologische Kits	57
3.21.6	Transformation der Plasmide in <i>E. coli</i>	57
3.21.7	Klonierung der CLP-36-DNA in pQE-30	57
3.21.8	Klonierung der CLP-36-DNA in p β actin-EGFP	58
3.21.9	Stammhaltung	58
3.21.10	Sequenzierung	59
3.21.11	PCR-Primer	60
3.22	Untersuchung der <i>in vivo</i> -Dynamik von EGFP-CLP-36 durch Videomikroskopie	63
4	Ergebnisse	64
4.1	Analyse der Primärstruktur von CLP-36	64
4.2	Expression von CLP-36	66

4.3	Assoziation von CLP-36 mit dem Aktinzytoskelett in Plättchen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen	68
4.4	Elektronenmikroskopische Lokalisierung von CLP-36 in ruhenden und aktivierten Plättchen	71
4.5	Kokalisation von α -Aktinin und CLP-36 in Endothelzellen und Thrombozyten	74
4.6	Koimmunpräzipitation des thrombozytären α -Aktinins mit endogenem und exogenem CLP-36	77
4.7	Koordinierte Translokation von CLP-36 und α -Aktinin an das Zytoskelett aktivierter Thrombozyten	80
4.8	Kartierung der α -Aktinin-1 / CLP-36 Interaktion mit dem <i>Yeast two-hybrid</i> System	83
4.9	Affinitätsblotting mit biotinyliertem CLP-36 (<i>Blot-overlay assay</i>)	85
4.10	Mikroinjektion von Anti-CLP-36 Antikörper in Endothelzellen	88
4.11	Untersuchung der <i>in vivo</i> Dynamik von fluoreszenzmarkiertem CLP-36 in PtK2-Zellen	90
4.12	Phosphorylierung von CLP-36	94
4.12.1	Untersuchung der Proteinkinase A abhängigen Phosphorylierung von CLP-36 in [³² P]-Orthophosphat-markierten Plättchen	94
4.12.2	Untersuchung der Phosphorylierung von CLP-36 durch die LIM-Kinasen I und II <i>in vitro</i>	96
4.12.3	Immundetektion der Serinphosphorylierung von CLP-36	96
5	Diskussion	100
5.1	Sequenzhomologien und Primärstruktur	100
5.2	Expression von CLP-36	103
5.3	Assoziation von CLP-36 mit dem Aktinzytoskelett	104
5.4	Interaktion von CLP-36 mit α -Aktinin-1	105
5.5	Interaktion von CLP-36 mit Isoformen α -Aktinin-2 und α -Aktinin-4	106
5.6	Kartierung der interagierenden Domänen	107
5.7	CLP-36 auf Stressfasern	109
5.8	<i>In vivo</i> Dynamik von CLP-36 in PtK2-Zellen	110
5.9	Phosphorylierung von CLP-36	111
5.10	Schlussbetrachtung	112
6	Zusammenfassung	113
7	Literatur	116

1

Abkürzungen

Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurerest
3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
BAPTA-AM	Acetoxymethylester der 5,5'-dimethyl-bis-(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	zur messageRNA komplementäre DNA, Produkt der reversen Transkriptase
C-terminal	carboxyterminal
DEAE	Diethylaminoethan
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure/Na ₂ -Salz
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure/freie Säure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EST	Expressed Sequence Tag
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein-isothiocyanat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
Hepes	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
HRP	Horseradish peroxidase
HUVEC	human umbilical venous endothelial cells
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
LIM-Domäne	Akronym für lim-, isl-, mec- Domäne
MCS	Multiple Cloning Site

Abkürzungen

min	Minute
NMR	nuclear magnetic resonance
N-terminal	aminoterminal
NC	Nitrocellulose
NTA	Nitrilotri-Essigsäure
PI	Phosphatidylinositol bzw. Phosphoinositid
PIP	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PP	Polypropylen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaktion
PDZ-Domäne	Akronym für PSD95-, DLG-A-, ZO-1-Domäne
PEG	Polyethylenglycol
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
Pipes	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylsulfonylmethyl Fluorid
PRP	platelet rich plasma
PS	Polystyren
RT	Raumtemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRAP	Thrombinrezeptor aktivierendes Peptid
Tris	Tris-(dimethylamino)-methan
ÜN	über Nacht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

2

Einleitung

2.1 Hintergrund

Blutplättchen (Thrombozyten) sind kernlose Zellfragmente, die im Knochenmark durch Abspaltung aus Megakaryozyten entstehen. Ihre wichtigste Aufgabe ist die Beteiligung an der Hämostase. Von pathophysiologischer Bedeutung ist der Beitrag aktivierter Plättchen an den akuten Komplikationen degenerativer Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der arteriellen Thrombose mit den Folgen der instabilen Angina pectoris, des Myokardinfarkts und des zerebralen Insults. PGI₂ (Prostacyclin) und das stabile PGI₂-Analog Iloprost sind starke Inhibitoren der Plättchenaktivierung (Siess und Lapetina, 1989). PGI₂ wird über spezifische Rezeptoren gebunden und bewirkt in Abhängigkeit des G-Protein G_s eine Stimulierung der Adenylatzyklase. Durch die Aktivierung der Adenylatzyklase steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration und die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) wird aktiviert, was die Phosphorylierung spezifischer Proteine zur Folge hat (Siess et al., 1990). In vorangehenden Untersuchungen wurde ein 38 kDa Protein gefunden, dessen PKA-abhängige Phosphorylierung gut mit der Hemmung der Thrombozytenfunktion korrelierte (Halbrügge et al., 1990; Siess und Lapetina, 1990). Das 38 kDa Protein wurde durch 2D-SDS-Gelelektrophorese isoliert und charakterisiert (Luber, 1994). Basierend auf dem isoelektrischen Punkt des 38 kDa Proteins (pI 6.5) wurde das Protein aus Thrombozytenlysaten mittels präparativer Elektrophorese in der Rotofor^R-Kammer angereichert und anschließend durch 2D-SDS-Gelelektrophorese gereinigt. Durch interne Sequenzanalyse konnten sieben Peptidsequenzen ermittelt werden, mit denen die EST-Datenbank des "Institute of Genomic Research (TIGR)" durchsucht wurde. Anhand überlappendender ESTs¹ konnte der vollständige "offene Leserahmen" (ORF), der für das 38 kDa Protein kodiert, rekonstruiert werden. Aufgrund der 86 %igen Sequenzidentität mit dem C-terminalen LIM-Domäne Protein aus Ratte (rCLP-36; Wang et al., 1995) wurde das 38 kDa Protein als humanes CLP-36 bezeichnet. Mittels sequenzspezifischer PCR-Primer wurde das humane *CLP-36* aus einer HEL-Zell-cDNA-Bibliothek kloniert (Bauer et al., 2000). Zur Untersuchung der zellulären Funktion des Pro-

¹ESTs (Expressed sequence tags) werden durch partielles, unidirektionales Sequenzieren von direkt klonierten cDNA-Bibliotheken gewonnen und ermöglichen eine rasche Erfassung kodierender DNA-Abschnitte (Adams et al., 1993)

teins wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit bakteriell exprimiertem CLP-36 polyklonale Antikörper gewonnen (s. 3.7.1).

2.2 Aufgabenstellung

Mittels primär immunchemischen Ansätzen sollte CLP-36 auf molekularer und zellulärer Ebene charakterisiert und funktionell eingeordnet werden. Dies schloß die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von CLP-36, die Suche nach interagierenden Proteinen, sowie Versuche zur Regulation von CLP-36 ein. In Hinblick auf die Regulation wurde untersucht, ob CLP-36 ein Substrat der Proteinkinase A und der LIM-Kinasen darstellt. Die intrazelluläre Lokalisation wurde v.a. in Plättchen und Endothelzellen untersucht, da beide Zelltypen CLP-36 stark exprimierten. Um die Beteiligung von CLP-36 an dynamischen Vorgängen in der Zelle einschätzen zu können, wurde die Motilität von CLP-36 videomikroskopisch in lebenden Epithelzellen studiert.

Da gefunden wurde, daß CLP-36 in Plättchen und Endothelzellen mit dem Aktinzytoskelett assoziiert, soll im folgenden kurz auf die Funktion und Bedeutung des Aktinzytoskeletts im allgemeinen, und im besonderen in Plättchen und Endothelzellen eingegangen werden.

2.3 Theoretische Grundlagen

2.3.1 Das Aktinzytoskelett

Aktin ist in evolutionärem Sinne sehr alt und wird als eines der fünf häufigsten Proteine auf der Erde betrachtet. Monomeres Aktin (G-Aktin) assoziiert unter physiologischen Bedingungen in eine doppelt-helikale, 10 nm dicke, Filamentstruktur (F-Aktin) und stellt als solches die hauptsächliche Komponente des Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen dar. Die dynamische, semiflexible Natur von Aktinfilamenten erlaubt den Zellen auf extrazelluläre Signale durch Zellbewegung, Zellteilung, Formveränderung, Endocytose und Translokation intrazellulärer Organellen zu antworten. Solche Prozesse sind kritisch für die Entwicklung und Funktion multizellulärer Organismen. So ist beispielsweise die Einwanderung von Leukozyten in das infizierte Gewebe wichtiger Bestandteil der Immunantwort und die Migration von Fibroblasten essentiell für die Wundheilung.

Blutplättchen zeigen innerhalb von Sekunden nach ihrer Aktivierung eine ausgeprägte Reorganisation des Zytoskeletts, die zur Bildung neuer Aktinfilamente und Filamentbündel, eines kontraktiven Aktomyosinrings und Stressfaser-artiger Strukturen führt. Dieser rapide Umbau des Zytoskeletts ermöglicht die spezifischen Plättchenantworten: den Gestaltwandel², die Ausbreitung³, und die Aggregation und Bildung des fibrinreichen Plättchengerinnsels.

²engl. "shape change"

³engl. "spreading"

(Allen et al., 1979; Hartwig, 1992). Das Aktinzytoskelett der Plättchen besteht aus zwei Komponenten: (1) den zytoplasmatischen Aktinfilamenten, die das Zytoplasma ausfüllen und die kontraktile Prozesse vermitteln, (2) dem Membranskelett, das die innere Seite der Plasmamembran auskleidet und die Kontur und Stabilität der Membran sowie die laterale Verteilung der Glykoproteine in der Membran reguliert. Während der Aktivierung der Zelle wird das Glykoprotein $\alpha_{IIb}\beta_3$ kompetent für die Bindung von Fibrinogen. Es bilden sich fokale Kontakte, eine spezielle Form der fokalen Adhäsionen (s.S.8). Durch die Bindung an Fibrinogen wird das Zytoskelett in der Weise umorganisiert, daß die membranskelettalen Proteine, die mit dem Glykoprotein $\alpha_{IIb}\beta_3$ assoziieren, mit dem zytoplasmatischen Aktinfilamenten verknüpft werden. Dadurch kann die Umformung und Stabilisierung des Plättchenklots eingeleitet werden. Als Konsequenz der Fibrinogenbindung durch das Glykoprotein $\alpha_{IIb}\beta_3$ werden Tyrosinkinasen, Calpain, Proteinkinase C und Phosphoinositid-3-Kinase aktiviert, die an den fokalen Kontakten aggregierter Plättchen detektiert werden können (Fox, 1993; Morgenstern et al., 1990). Die Aktivierung der Plättchen ist essentiell für die primäre Blutgerinnung und kritisch involviert in die Pathologie des Schlaganfalls oder Myokardinfarkts.

Endothelzellen kleiden als Monolayer die innere Gefäßwand aus und bilden eine semipermeable Barriere für den Austausch von Makromolekülen und bioaktiven Stoffen zwischen dem Blut und dem Gefäßsystem. Nach Aktivierung durch inflammatorische oder hämostatische Stimuli kommt es zu einer Reorganisation des endothelialen Aktinzytoskeletts und die ruhenden, Pflasterstein-artig angeordneten Endothelzellen gehen in eine abgerundete, kontrahierte Form mit intrazellulären Stressfasern über (Grand et al., 1996). Dies führt zur Entstehung von Lücken im Endothel (Ehringer et al., 2000) und zur Ablagerung von LDL in der vaskulären Intima. Die Lückenbildung ermöglicht die transendotheliale Migration von Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Eine endotheliale Dysfunktion führt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels, die wesentlich zur Entzündung und Atherosklerose beiträgt. Das Aktinzytoskelett in den Endothelzellen vermittelt auch die Migration der Endothelzellen während eines Wundverschlusses oder der Angiogenese.

Aktinfilament-Turnover Filamentwachstum findet an den schnell wachsenden Filamentenden (engl. "barbed ends") durch Assoziation von monomerem, an ATP gebundenem Aktin statt, während monomeres ADP-Aktin vom langsam wachsendem Ende (engl. "pointed end") dissoziiert, so daß im Gleichgewichtszustand eine kritische Konzentration von G-Aktin aufrechterhalten wird (engl. "treadmilling"). Bei einer Monomerkonzentration größer als der kritischen Konzentration findet eine Nettopolymerisation statt, bei einer Monomerkonzentration kleiner als der kritischen Konzentration kommt es zur Nettodepolymerisation. Der Zusammenbau und Zerfall von Aktinfilamenten⁴ sowie die Organisation des tertiären Filamentnetzwerks wird über eine Reihe aktinbindender Proteine reguliert (Übersichtsartikel von Chen et al., 2000). Sie bewirken unter anderem, daß Aktin in der Zelle etwa 100-200mal schneller umgesetzt wird als reines Aktin *in vitro*. β -Thymosin sequestriert ATP-Aktin, um die spontane Nukleation von Filamenten zu verhindern und einen ATP-Aktin-Pool für die Filamentverlängerung bereitzustellen. Profilin beschleunigt den geschwindigkeitsbestimmenden

⁴engl. "actin turnover"

Einleitung

Schritt des Nukleotidaustausches am Aktinmonomer und ermöglicht somit einen gesteigerten Umsatz von G-Aktin. Cofilin und Proteine der ADF (Aktin-depolymerisierender Faktor)-Familie erhöhen die Dissoziationsrate am langsam wachsendem Ende sowie die Assoziationsrate am schnell wachsendem Ende und legen durch Filamentaufbruch (engl. "severing") neue Enden frei. Sie tragen somit ebenfalls zu einem gesteigerten Aktinumsatz bei. Der zu Aktin verwandte Arp2/3 Komplex initiiert eine *de novo* Polymerisation von Aktin (*Filamentnukleation*) und bindet an die Seiten vorhandener Filamente, wodurch Filamentverzweigungen kreiert werden (Machesky und Way, 1998). Capping Protein, Gelsolin und der Arp2/3-Komplex decken Filamentenden ab (engl. "Capping") und regulieren somit den Verlust oder die Addition von monomerem Aktin.

Durch ein koordiniertes Zusammenspiel dieser Proteine wird eine beschleunigte lokale Aktinpolymerisation und -depolymerisation möglich, die z.B. zur Ausbildung von Lamellipodien am vorwärtsgerichteten Pol der Zelle (engl. "leading edge") führt. Die Bewegung des Lamellipodiums ist zur Zeit der am besten verstandene Prozeß, der die Umorganisation eines Aktinnetzwerkes *in vivo* beschreibt (s. Abb.2.1)(Übersichtsartikel von Chen et al., 2000). Lamellipodien sind breite, lagenartige Zellfortsätze, in denen Aktinfilamente in einem gitterartigen Maschenwerk angeordnet sind; das lamellipodiäre Netzwerk wird durch Ausbildung von Filamentabzweigungen durch den ARP2/3-Komplex (Machesky und Way, 1998) sowie durch Filamentbündelung und -Quervernetzung geschaffen. Aktinfilamentbündelung und -Quervernetzung erhöhen beide die Rigidität des Aktinpolymers und liefern unabhängig von Myosin die Kraft für die Deformation der Membran, die für die Ausbreitung des Lamellipodiums und damit für die Zellbewegung benötigt wird (Übersichtsartikel von Lauffenburger und Horwitz, 1996). Die Quervernetzung von Aktinfilamenten trägt darüber hinaus zu den viskoelastischen Eigenschaften des Zytoplasmas bei: der Deformierbarkeit, die Bewegung erlaubt, und der Elastizität, die mechanischen Kräften entgegenwirkt und die Erhaltung der Zellform gewährleistet (Bray et al., 1986). Durch ein Bündeln von Aktinfilamenten können Membranprotrusionen wie die Mikrovilli des Bürstensaumepithels der Darmwand, die Stereozilien des Innenohrs oder die Filopodien aktivierter Plättchen (Allen et al., 1979) ausgebildet werden.

Stressfasern Einen anderen Typ von Mikrofilamentbündeln, der dem Muskelsarkomer ähnelt, repräsentieren die Stressfasern. Sie bilden keine Membranprotrusionen sondern verlaufen transversal durch die ausgebreitete Zelle. Neben F-Aktin enthalten sie α -Aktinin, Filamin, Tropomyosin und Myosin in periodischer, sarkomerähnlicher Anordnung und sind aufgrund der Assoziation mit Myosin kontraktile (Kreis und Birchmeier, 1980; Byers et al., 1984). Analog zur Z-Linie im Muskelsarkomer besitzen sie α -Aktinin-reiche elektronendichte Banden, an denen F-Aktin quervernetzt und monomeres Aktin inkorporiert wird (Turnacioglu et al., 1998). Stressfasern finden sich in ausgebreiteten Kulturzellen sowie *in situ* in arteriellen Endothelzellen (Wong et al., 1981) oder den Skleroblasten (Hornschuppen) des Goldfisches (Byers und Fujiwara, 1982). In kultivierten Zellen ermöglichen sie durch ihr Anknüpfen an adhäsive Matrixkontakte (Fokale Adhäsionen) eine gesteigerte Adhärenz der Zelle; *In situ* stellen sie wahrscheinlich einen Schutz vor Ablösung durch erhöhte Scherkräfte, etwa die des Blutstroms, dar. In Endothelzellen und Plättchen werden Stressfasern nach Aktivierung der Zelle ausgebildet und partizipieren an der Formveränderung der Zelle. Die

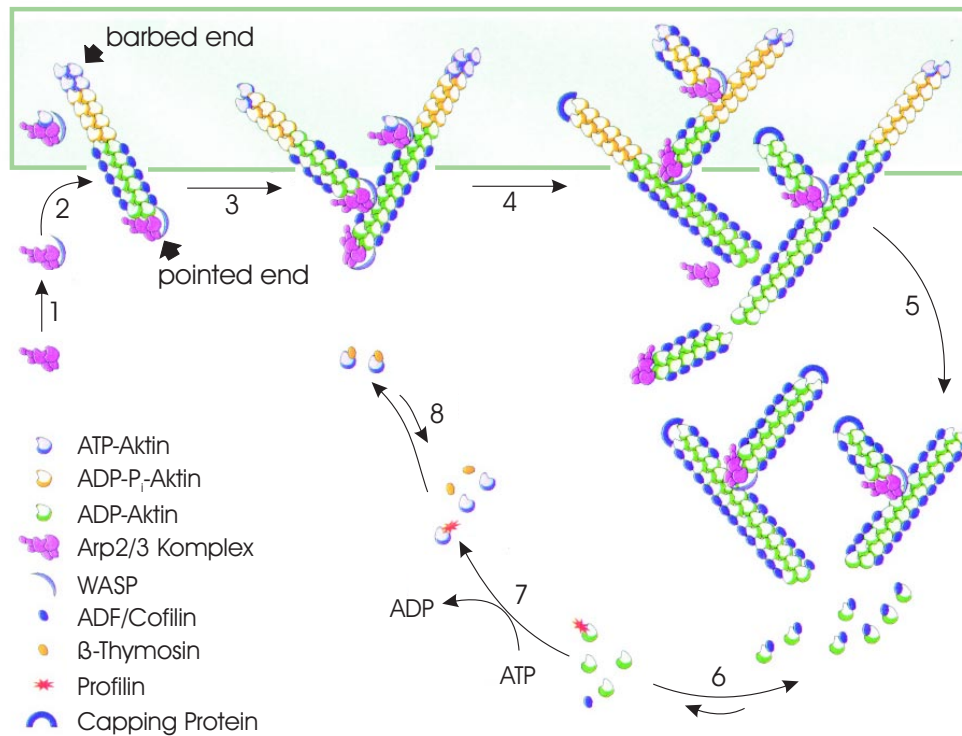


Abbildung 2.1: Modell für den Aktinumsatz im Lamellipodium am vorwärtsgerichteten Pol der Zelle. Die Aktinfilamentfront ist charakterisiert durch ein stark verzweigtes Geflecht an Aktinfilamenten mit nach vorne gerichteten schnell wachsenden (*barbed*) Enden und langsam wachsenden Filamentenden an den Filamentverzweigungen. (1) Der Arp2/3-Komplex wird durch Bindung an WASP aktiviert, das wiederum durch die kleine GTAase Cdc42 aktiviert wird. (2) Der aktive Arp2/3-Komplex nukleiert Aktinfilamentwachstum und deckt die langsam wachsenden freien Filamentenden ab oder (3) er bindet an die Filamentseiten und kreiert dort Filamentabzweigungen. Das Wachstum der Filamente erfolgt schnell und die verzögerte Dissoziation von P_i führt zur Anreicherung von Filamenten an der vorderen Front des Lamellipodiums (grüner Kasten), die hauptsächlich aus ATP- und ADP- P_i -Aktin bestehen und nicht an ADF/Cofilin binden. (4) Das Abdecken der schnell wachsenden Enden durch Capping Protein verhindert eine weitere Verlängerung der Filamentenden. An der hinteren Front des Lamellipodiums tragen zwei Mechanismen, Filamentaufbruch und das Freilegen der langsam wachsenden Filamentenden durch die Entfernung des Arp2/3-Komplexes (engl. "uncapping"), zu einer rapiden Aktindepolymerisation bei. Das Aufbrechen der Filamente wird an Stellen zwischen ADF/Cofilin-gesättigtem ADP-Aktin und "nacktem" F-Aktin besonders begünstigt. (5) ADF/Cofilin beschleunigt auch die F-Aktin-Depolymerisation an den langsam wachsenden Filamentenden. (6) Der Komplex aus ADP-Aktin und ADF/Cofilin, der von den Filamentenden dissoziiert, ist im Gleichgewicht mit den ADF/Cofilin- und ADP-Aktin-Monomeren. (7) Der Nukleotidaustausch ist ein langsamer Prozeß, der durch ADF/Cofilin-Proteine weiter aufgehoben wird, während Profilin den Austausch beschleunigt. (8) ATP-Aktin-Monomere stellen den Pool für den Filamentzusammenbau dar und werden durch β -Thymosin sequestriert, um eine spontane Nukleation zu verhindern; Abb. aus Chen et al., 2000, modifiziert.

Ausbildung der Stressfasern wird durch die kleine GTPase RhoA reguliert und ist abhängig von der Aktivität von Tyrosin-Kinasen (Ridley und Hall, 1992; Ridley und Hall, 1994).

Fokale Adhäsionen Stressfasern inserieren an der Membran in multifunktionellen Proteinkomplexen, den fokalen Adhäsionen, die räumlich und zeitlich die Adhärenz an die Matrix regulieren und so die Adhäsivität und Zellbewegung koordinieren. Die Bildung der fokalen Adhäsionen wird durch die GTPasen Rho, Rac und Cdc42 reguliert (Nobes und Hall, 1995). Sie erfolgt über die Bindung von Matrixpolymeren wie Fibrinogen oder Kollagen an Integrine. Dies führt zur Gruppierung der Integrine in Cluster, und zur darauffolgenden Kopplung der cytoplasmatischen Domänen der Integrine an die Aktinfilamente. Die Kopplung der Integrine an das kontraktile Aktomyosinskelett geschieht über einen Komplex aus zytoskelettalen Proteinen, darunter Talin, Vinkulin, α -Aktinin und Filamin, deren Funktion an den fokalen Adhäsionen besonders gut verstanden ist (Horwitz et al., 1986; Übersichtsartikel von Critchley, 2000). Die Assoziation der Integrine mit dem Zytoskelett ist essentiell für eine normale Integrin/Ligand-Interaktion und somit auch für die Zellmotilität. Die fokalen Adhäsionen sind mit Signalmolekülen wie der fokalen Adhäsionskinase pp125 (FAK) assoziiert (Ilic et al., 1995) und stellen damit die zentralen Schaltstellen für eine integrinvermittelte Signaltransduktion dar. Diese erfolgt bidirektional⁵ und ist essentiell für die Bewegung, Aktivierung und Differenzierung von Zellen während der Immunreaktionen, der Wundheilung, Organogenese und Onkogenese (Übersichtsartikel von Schönwälder und Burridge, 1999). In Blutplättchen sind die fokalen Kontakte an adhäsive Matrixproteine wie Kollagen oder Fibrinogen an der Aktivierung der Plättchenfunktionen beteiligt, und ermöglichen die Bildung und -Retraktion des Gerinnsels während der Hämostase (Morgenstern et al., 1990).

α -Aktinin Zur Ausbildung der beschriebenen Zytoskelettstrukturen stehen filamentbündelnde, -verankernde bzw. quervernetzende Proteine unterschiedlicher Gewebsspezifität und Geometrie zu Verfügung wie z.B. Fascin, Villin, Fimbrin oder α -Aktinin (Übersichtsartikel von Bartles, 2000).

α -Aktinin ist ein stabförmiges antiparalleles Homodimer mit einem Molekulargewicht der Untereinheiten von ca. 100 kDa (Übersichtsartikel von Critchley und Flood, 1998). Durch die antiparallele Anordnung der zwei N-terminalen aktinbindenden Domänen im funktionellen Dimer können Aktinfilamente quervernetzt und gebündelt werden. Die Dimerisierung zweier Monomere wird über die spektrin-artigen Sequenzwiederholungen⁶ 2 und 3 im Mittelteil des Moleküls vermittelt (Djinovic-Carugo et al., 1999)(s. Abb.2.2 A). Es existieren verschiedene Isoformen von α -Aktinin. α -Aktinin-1 und -4 sind in nichtmuskulären Zellen exprimiert, α -Aktinin-2 ist auf Herz- und Skelettmuskelzellen und α -Aktinin-3 auf die Muskulatur der Gliedmaßen beschränkt. Die Bindung an Aktin ist bei den meisten nichtmuskulären Isoformen Ca^{2+} -sensitiv und wird durch die Ca^{2+} -bindende EF-Hand I am C-terminus des Moleküls kontrolliert.

Durch viskoelastische Messungen wurden die mechanischen Eigenschaften von F-Aktin/ α -Aktinin-Netzwerken bestimmt (Xu et al., 1998). Es zeigte sich, daß die Quervernetzung durch

⁵engl. "outside-in" und "inside-out" signaling

⁶engl. "spectrin-like repeats"

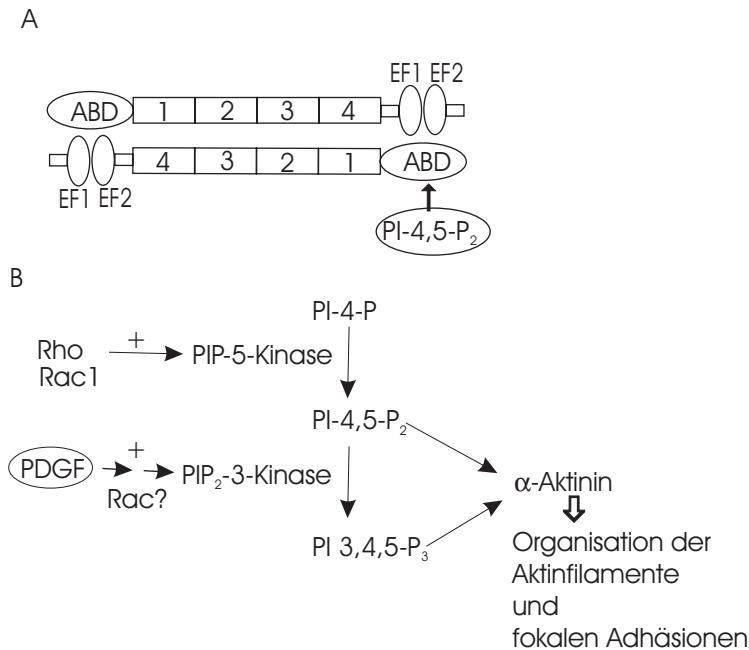


Abbildung 2.2: (A) Schematische Darstellung des α -Aktinin Dimers. Die Monomere bestehen aus einer Aktin-bindenden Domäne (ABD), vier spektin-artigen Sequenzwiederholungen (1-4) und zwei Ca^{2+} -bindenden EF-Händen (EF). (B) Die Funktion von α -Aktinin wird direkt durch Bindung der Phosphoinositide PI-4,5-P_2 und PI-3,4,5-P_3 kontrolliert, die nach Aktivierung von Rho oder nach mitogener Stimulation durch PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) gebildet werden.

α -Aktinin dynamisch ist: die Kinetik der α -Aktinin/F-Aktin-Interaktion und die Dissoziationskonstante von $K_d=1-5\mu\text{M}$ erlauben der Zelle, elastisch auf eine rapide Deformation zu reagieren, ermöglichen aber gleichzeitig eine langsame Deformation des viskoelastischen Zytoplasmas als Antwort auf Zellbewegung.

α -Aktinin verankert Aktinfilamente an den fokalen Adhäsionen, den adhaerenten Membrankontakten und der Z-Scheibe im Muskelsarkomer. An den elektronendichten Banden entlang der Stressfasern bündelt es die Aktinfilamente (Sanger et al., 1983). Es bindet an die zyttoplasmatischen Domänen in Adhäsionsrezeptoren wie den $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Integrinen, L-Selektin, ICAM-1, ICAM-2 sowie an die Zell/Zell-Adhäsionsrezeptoren N- und E-Cadherin via α -Catenin (Jockusch et al., 1995; Pavalko et al., 1995; Knudsen et al., 1995). An den fokalen Adhäsionen verknüpft α -Aktinin die Adhäsionsrezeptoren direkt mit dem Aktinzytoskelett und interagiert dort mit Zyxin und Vinkulin, die ebenfalls in die Bildung und Stabilität der fokalen Adhäsionen involviert sind (Crawford et al., 1992). An den Stressfasern, fokalen Adhäsionen, Zell/Zell-Kontakten und embryonalen Z-Scheiben interagiert α -Aktinin mit Palladin, das essentiell für die Organisation des Zytoskeletts und der fokalen Adhäsionen ist (Parast und Otey, 2000).

Die Bildung der fokalen Adhäsionen und Stressfasern wird durch die kleine GTPase Rho reguliert (Ridley und Hall, 1992; s.o.). Die Aktivierung von Rho während der Zelladhäsion ist mit der Aktivierung der PIP-5-Kinase und der Produktion des Phospholipids PI-(4,5)-P_2 verbunden (Chong et al., 1994). PI-(4,5)-P_2 ist essentiell für die F-Aktin-gelierende Aktivität von α -Aktinin und reguliert die Bindung von α -Aktinin an die Proteinkinase N, die durch Rho aktiviert wird (Fukami et al., 1992; Mukai et al., 1997). α -Aktinin ist neben Aktin und Caldesmon *in vitro* ein Substrat der Proteinkinase N und PI-(4,5)-P_2 reguliert die Kinaseaktivität der Proteinkinase N *in vitro*. Man könnte daher spekulieren, daß die Proteinkinase N die Effekte von Rho vermittelt durch eine Phosphorylierung des α -Aktinins und anderer zy-

Einleitung

toskelettassoziierten Proteine, wenn auch unklar ist, ob die Phosphorylierung dieser Proteine physiologisch relevant ist. Auch die kleine GTPase Rac1, die die Bildung der Lamellipodien vermittelt, assoziiert mit der PI-5-Kinase und führt höchstwahrscheinlich zur Aktivierung der Kinaseaktivität und Bildung von PI-(4,5)-P₂ (Hartwig et al., 1995; Toliás et al., 2000). α -Aktinin bindet neben PI-(4,5)-P₂ auch die PI-3-Kinase und deren Produkt PI-(3,4,5)-P₃. Eine Aktivierung der PI-3-Kinase durch mitogene Stimulation der Zelle führt zu einer partiellen Auflösung der fokalen Adhäsionen und Stressfasern; die Interaktion von α -Aktinin mit der β -Untereinheit des Integrins kann *in vitro* durch Zugabe von PI-(3,4,5)-P₃ inhibiert werden (Greenwood et al., 2000). Beides zusammen spricht dafür, daß die Interaktion von α -Aktinin mit dem β -Integrin an den fokalen Adhäsionen durch PI-(3,4,5)-P₃ reguliert wird. Eine partielle Auflösung der fokalen Adhäsionen könnte physiologisch den Übergang einer stark adhären Zelle zu einer schwächer adhären Zelle bedeuten, der die Motilität der Zelle ermöglicht (Palecek et al., 1997). So findet sich in einigen Krebszellen eine erhöhte PI-(3,4,5)-P₃-Konzentration (Cantley und Neel, 1999), was mit dem Verlust des adhären Phänotyps in Zusammenhang stehen könnte.

Nach Aktivierung der PI-3-Kinase kommt es zu einem Anstieg von α -Aktinin in der triton-X-löslichen Zellfraktion, der begleitet wird von der Entbündelung und Umorganisation der Stressfasern zu einem filamentösen Aktinnetzwerk (Greenwood et al., 2000). Bei niedrigen α -Aktinin-Konzentrationen werden ungeordnete (isotrope) Aktinnetzwerke gebildet, bei hohen Konzentrationen bündelt α -Aktinin Aktinfilamente (Furukawa und Fehheimer, 1997). Die kritische α -Aktinin-Konzentration, die den Übergang eines Aktinnetzwerks zu Aktinbündeln markiert, wird auch von der Affinität von α -Aktinin für die Aktinfilamente beeinflusst. Es kann daher postuliert werden, daß PI-(3,4,5)-P₃ die Affinität von α -Aktinin für F-Aktin reduziert und somit die Umorganisation der Aktinfilamente von einer gebündelten Anordnung (Stressfasern) zu einem isotropen Netzwerk bewirkt. α -Aktinin ist somit ein wichtiger Effektor der durch Phosphatidylinositide vermittelten Regulation des Aktinzytoskeletts (s. Abb.2.2 B) und Schaltstelle für eine partielle Auflösung der fokalen Adhäsionen, die wahrscheinlich zu einer reduzierten Zelladhärenz führt.

Einige der Adapterproteine mit LIM- und PDZ-Domänen, zu denen auch CLP-36 gehört (s.u.), interagieren ebenfalls mit α -Aktinin und rekrutieren Signalproteine an das Zytoskelett (s.2.3.2 und Diskussion). Die Regulation und Bedeutung dieser Interaktionen ist jedoch weitgehend ungeklärt.

Die Überexpressionen von α -Aktinin in Endothelzellen führt zu einer reduzierten Motilität und zur verlangsamten Bewegung der Zelle in einen artifiziellen Wundbereich (Glück und Ben-Ze'ev, 1994). Die Deletion von α -Aktinin in der kollektiven Amöbe *Dictyostelium* verhindert die komplette Entwicklung des Fruchtkörpers (Ponte et al., 2000) und die Mikroinjektion proteolytischer Fragmente von α -Aktinin in Fibroblasten führt zur Disruption der Stressfasern und fokalen Adhäsionen (Pavalko und Burridge, 1991). Dies deutet darauf hin, daß α -Aktinin eine spezifische, nicht-redundante Funktion in der Zelle besitzt.

2.3.2 Die Proteinbindungsdomänen PDZ und LIM

An spezialisierten Domänen der Plasmamembran wie den apikalen, basalen und lateralen Domänen polarisierter Epithelzellen, den synaptischen Membranen in Nervenzellen oder den fokalen Matrixadhäsionen werden größere Proteinkomplexe ausgebildet. Diese vermitteln z.B. die adhäsiven Eigenschaften bestimmter Zellen, die Bildung parazellulärer Barrieren (*engl. "tight junctions"*), den Ionentransport, sowie die Weiterleitung von Signalen zwischen benachbarten Zellen, die Wachstum, Differenzierung und Homeostase regulieren. Die Bildung solcher Proteinkomplexe wird großteils durch die Interaktion modularer Proteinbindungsdomänen bestimmt. Dies sind strukturell konservierte Elemente mit einzigartiger Spezifität, die in Proteinen unterschiedlichster Funktion vorkommen. Beispiele hierfür sind SH3-Domänen, die variable Aminosäuresequenzen in Umgebung einer basischen Pro-X-X-Pro-Stelle erkennen, SH2- und PTB-Domänen, die Phosphotyrosinmotive erkennen (Pawson, 1998), sowie PDZ- und LIM-Domänen. PDZ- und LIM-Domänen interagieren mit diversen Proteinmotiven, wobei die Interaktion einzelner LIM- oder PDZ-Domänen mit hoher Spezifität stattfindet.

CLP-36 besitzt sowohl eine PDZ- als auch eine LIM-Domäne. Daher soll im folgenden das Wissen über diese Proteindomänen wiedergegeben werden.

Die PDZ-Domäne Die PDZ-Domäne wurde ursprünglich als konserviertes Sequenzelement innerhalb des *postsynaptic density proteins* PSD95/SAP90, des Tumorsuppressors dlg-A aus *drosophila* und des Proteins ZO-1 an den parazellulären Barrieren entdeckt. Die Bezeichnung PDZ stellt ein Akronym aus den Anfangsbuchstaben dieser Proteine dar. Die 80-90 Aminosäuren umfassende Domäne wurde bis jetzt in über 75 Proteinen identifiziert und tritt typischerweise in mehreren Kopien innerhalb eines Proteins auf. Sie vermittelt spezifische Proteininteraktionen und findet sich in so diversen Organismen wie Metazoen, Pflanzen und Bakterien, ist also phylogenetisch stark konserviert. PDZ-Domänen zeigen bei paarweisem Sequenzvergleich eine durchschnittliche Identität von etwa 30 %, wobei keine Aminosäure durchgehend konserviert ist. Aufgrund von Sequenzhomologien und des Bindungsmechanismus können PDZ-Domänen in zwei Gruppen unterteilt werden. PDZ-Domänen der ersten Gruppe finden sich in vielen membranassoziierten Proteinen und binden das C-terminale Sequenzmotiv (T/S)-X-(V/hydrophober Rest) in Transmembranproteinen. Diese PDZ-Domänen enthalten eine konservierte GLGF-Sequenz, die an der Bindung des C-terminalen Sequenzmotivs im Proteinliganden beteiligt ist; das C-terminale Sequenzmotiv liegt als antiparalleler β -Strang in einer Spalte, die von der α B-Helix und dem β B-Strang der PDZ-Domäne ausgebildet wird (Doyle et al., 1996)(s. Abb.2.3). Die Bindung der C-terminalen Carboxylgruppe erfolgt über Wasserstoff-Brückenbindungen, der Valinrest liegt in einer hydrophoben Höhle. Die Interaktion des Liganden mit dem β -Strang umfaßt nur Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Hauptketten, die offensichtlich nicht zur Spezifität der Interaktion beitragen. Die Spezifität wird über die Interaktion des Serin- oder Threo-

Einleitung

ninrests an Position -2 des Peptids mit einem positiv geladenem Histidin-Rest in der α -Helix vermittelt. Das Durchmusterung von Peptid-Bibliotheken zeigte, daß viele PDZ-Interaktionen zusätzliche Wechselwirkungen mit Aminosäureresten an den Positionen -1, -4, -5 des Liganden benötigen (Songyang et al., 1997). Außerdem beschränkt sich das Repertoire der möglichen Interaktionspartner durch Rekrutierung des PDZ-Domäne-Proteins an spezifische Membrandomänen durch andere Domänen innerhalb des Proteins.

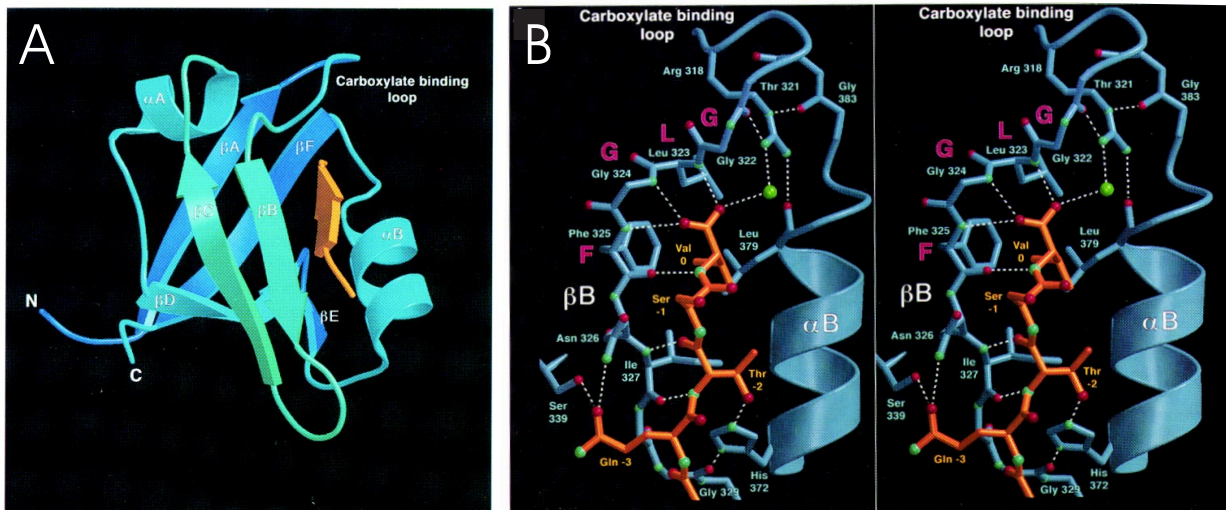


Abbildung 2.3: Strukturelles Diagramm der PDZ-Domäne 3 aus PSD95 und ihrer Interaktion mit einem Peptidliganden. (A) Banden-Diagramm der PDZ3-Domäne. Das interagierende Peptid (gelb) liegt in einer Grube, die von dem βB -Strang und der αB -Helix gebildet wird; der COOH-Terminus des Peptids wird in einer hydrophoben Höhle eingeschlossen, die von der βA - βB Schleife (“Carboxylate binding loop“) ausgebildet wird. (B) Chemische Interaktionen, die in die Peptidbindung involviert sind. Darstellung der Wasserstoff-Brückenbindungen (gestrichelte weiße Linien) zwischen Resten der PDZ-Domäne (blau) und des Peptidliganden (orange) in einem stereoskopischen Doppelbild. Sauerstoffatome in rot, Stickstoffatome in blau. Ein Wassermolekül (grüne Kugel) verbindet die Carboxylatgruppe mit Arginin³¹⁸. Das Motiv GLGF ist konserviert innerhalb der PDZ-Domänen, die an das C-terminale Sequenzmotiv (T/S)-X-(V/hydrophober Rest) des Ligand-Proteins binden. Reproduktion aus Doyle et al., 1996.

PDZ-Domänen der zweiten Gruppe binden an interne Proteindomänen und finden sich oft in Zytoskelett-assoziierten Proteinen. Sie bilden mit anderen PDZ-Domänen Homo- und Heterodimere (Brennan et al., 1996), interagieren mit LIM-Domänen, ankyrin- und spektrinartigen Sequenzwiederholungen oder binden an interne (T/S)-X-V Motive (Shieh und Zhu, 1996).

Die große Mehrheit der Proteine, die PDZ-Domänen enthalten, ist mit der Plasmamembran assoziiert. Obwohl PDZ-Domänen dort in unterschiedlichsten Strukturen zu finden sind, ist jedes einzelne PDZ-Domäne-Protein auf spezifische subzelluläre Domänen wie Synapsen, Zell-Zell-Kontakte oder die apikale, basale oder laterale Epithelzellmembran beschränkt. Dies läßt darauf schließen, daß sich PDZ-Domänen früh entwickelt haben und eine zentrale Rolle

in der Organisation der Membrandomänen einnehmen. PDZ-Domänen agieren als Adapterdomänen und vermitteln die Bildung funktioneller Proteinkomplexe. Sie besitzen eine fundamentale Rolle für die Cluster-Bildung von Transmembranproteinen und die Kopplung der zyttoplasmatischen Domänen von Rezeptoren und Ionenkanälen an Signalproteine. Beispielfür hierfür sind die durch InaD vermittelte Proteininteraktionen im Rhabdomer der Photorezeptor-Zellen von *Drosophila*. InaD enthält fünf PDZ-Domänen und koppelt durch PDZ-Interaktionen das Transmembranprotein Rhodopsin und den TRP-Ca²⁺-Kanal mit der Proteinkinase C und der Phospholipase C β zu einem signalübertragendem Proteinkomplex (Tsunoda et al., 1997)(s. Abb.2.4). Es fungiert also als Gerüstprotein ⁷, das den TRP-Ca²⁺-Kanal in räumliche Nähe zum Rhodopsin bringt, wodurch wahrscheinlich die Effizienz der Phototransduktion verstärkt wird.

PDZ-Domänen in anderen Proteinen koppeln Ionenkanäle und Signalproteine an das Aktin-

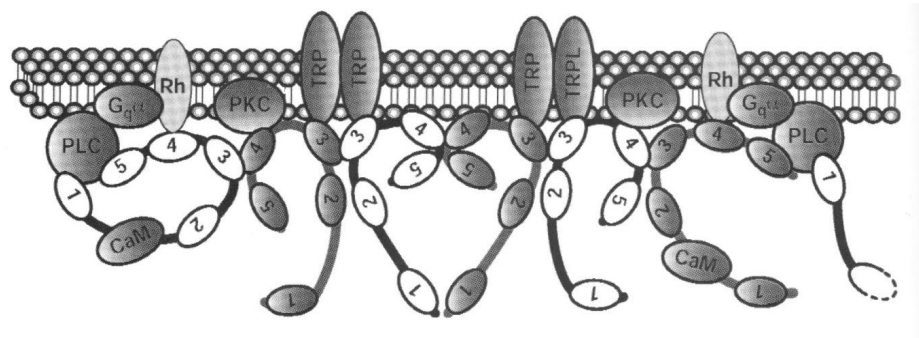


Abbildung 2.4: InaD bindet den G-Protein($G_{q\alpha}$)-gekoppelten Rezeptor Rhodopsin (Rh), die licht-aktivierten Kationen-Kanäle TRP und TRPL, die Phospholipase C- β (PLC), die Proteinkinase C (PKC) über PDZ-Domänen. Calmodulin bindet an die Region zwischen die PDZ-Domänen 1 und 2. Ein hochorganisierter multimerer Proteinkomplex an der Plasmamembran entsteht durch homo- und heteromere Interaktionen zwischen den PDZ-Domänen 3 und 4. Reproduktion aus Xu et al., 1998.

zytoskelett (Tang et al., 2000; Übersichtsartikel von Sheng und Pak, 2000) und sind an der korrekten membranären Lokalisation⁸ adhärenter Zellkontakte oder synaptischer Proteine beteiligt (Legouis et al., 2000). Die Interaktion der PDZ-Domänen mit ihren transmembranen Bindungspartnern kann direkt durch Signaltransduktion kontrolliert werden. So kann die Interaktion der PDZ-Domäne des postsynaptischen Proteins PSD-95 mit dem transmembranen K⁺-Kanal Kir2.3 über Phosphorylierung des Serin-Rests an Position -2 des K⁺-Kanals reguliert werden (Cohen et al., 1996). Weiterhin ist die Bindung der Rezeptor-Tyrosinkinase EphB3 an das PDZ-Protein AF6 an die Aktivierung des Rezeptors gekoppelt (Hock et al., 1998). Entsprechend der Vielzahl an PDZ-Proteinen und der möglichen Interaktionen ist es wahrscheinlich, daß viele Transmembranproteine, Ionenkanäle und Rezeptoren sowie die

⁷ engl. "scaffold"

⁸ engl. "cellular trafficking"

davon ausgehenden Signalereignisse über eine regulierte Assoziation mit PDZ-Domänen organisiert werden (Übersichtsartikel von Fanning und Anderson, 1999).

Die LIM-Domäne Das Akronym LIM steht für die Homeodomäne-Proteine Lin-11, Isl1 und Mec-3, in denen die LIM-Domäne als konservierter Sequenzabschnitt entdeckt wurde (Way und Chalfie, 1988; Karlsson et al., 1990). Die LIM-Domäne ist ebenfalls ein Adaptermotiv für Protein-Proteininteraktionen in funktionell diversen Proteinen aus höheren und niederen Metazoen, Pflanzen und Hefen. NMR-Spektren zeigten, daß LIM-Domänen aus zwei Zn^{2+} -koordinierenden Einheiten ("Zinkfinger") bestehen (Schmeichel und Beckerle, 1994), die räumlich getrennte Subdomänen repräsentieren und durch hydrophobe Interaktionen im Kern der Subdomänen eine globuläre Faltung einnehmen. Ein Zinkfinger kann bereits eine spezifische Proteinbindungsstelle ausbilden (Schmeichel und Beckerle, 1997). Wasserstoff-Brückenbindungen sowie ionische Wechselwirkungen stabilisieren die Konformation der LIM-Domäne. Kurze Segmente innerhalb der β -Schleifen (engl. "loops") zwischen den β -Faltblatt-Strukturen besitzen flexible Konformation (Konrat et al., 1997) und könnten zur Optimierung der intermolekularen Wechselwirkungen beitragen. Die vier koordinierenden Liganden in der tetraedrischen Zn^{2+} -Bindungsstelle jedes Zinkfingers sind die Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste, der Imidazolring des Histidins oder gelegentlich Sauerstoff aus Aspartat- oder Glutamatresten. Die Cystein- und Histidin-Seitenketten sind streng konserviert innerhalb der Konsensussequenz C-X₂-C-X₁₇₋₁₉-H-X₂-C-X₂-C-X₂-C-X₁₆₋₂₀-C-X₂-C/H/D der LIM-Domäne (s. Abb.2.5A,B). Die Bindung von LIM-Domänen an Nukleinsäuren, die aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Zinkfinger von CRP1 und CRP2 mit der DNA-bindenden Domäne von GATA1 vermutet werden kann, ist bisher unbewiesen. LIM-Domänen treten wie PDZ-Domänen oft geklustert innerhalb eines Proteins auf und können daher als multifunktionelle Adaptermotive in Proteinkomplexen fungieren. Sie können Homo- oder Heterodimere ausbilden (Arber und Caroni, 1996; Fouassier et al., 2000) und mit einer Reihe anderer, strukturell verschiedenartige Domänen wie der PDZ-Domäne oder *tight-turn*-Motiven interagieren (Wu und Gill, 1994). Die Klassifizierung der LIM-Proteine erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien innerhalb der LIM-Domäne (Klassen A-D) und der Gesamtstruktur des Proteins (Gruppen 1-3)(s. Abb.2.5C; Dawid et al., 1998).

LIM-Domänen der Klassen A und B kommen als Tandem in den LHX-Proteinen mit DNA-bindender Homeodomäne, sowie dem *lim-only* Protein LMO und den LIM-Kinasen vor. Die LHX- und LMO-Proteine sind primär nukleär und regulieren als Transkriptionsfaktoren die zelluläre Entwicklung. Sie bilden die Gruppe 1.

Die LIM-Domänen der Klasse C finden sich in den *lim-only* Proteinen, die großteils aus LIM-Domänen bestehen und in Gruppe 2 zusammengefasst werden. CRP1/2 (*cystein-rich protein* und CRP3/MLP) partizipieren an der Organisation der fokalen Adhäsionen und der Aktin-Mikrofilamente und spielen eine Rolle bei die Entwicklung des Herz- und Skelettmuskels (Arber et al., 1997; Pomies et al., 1997).

Die Proteine der Gruppe 3 sind heterogener und enthalten eine oder mehrere C-terminale LIM-Domänen, die meistens zur Klasse D gehören. Sämtliche Proteine dieser Gruppe sind zytoskelettassoziiert. Sie spielen möglicherweise eine Rolle bei der Organisation der Aktin-Mikrofilamente bzw. der fokalen Adhäsionen. CLP-36 bildet eine Untergruppe mit ALP

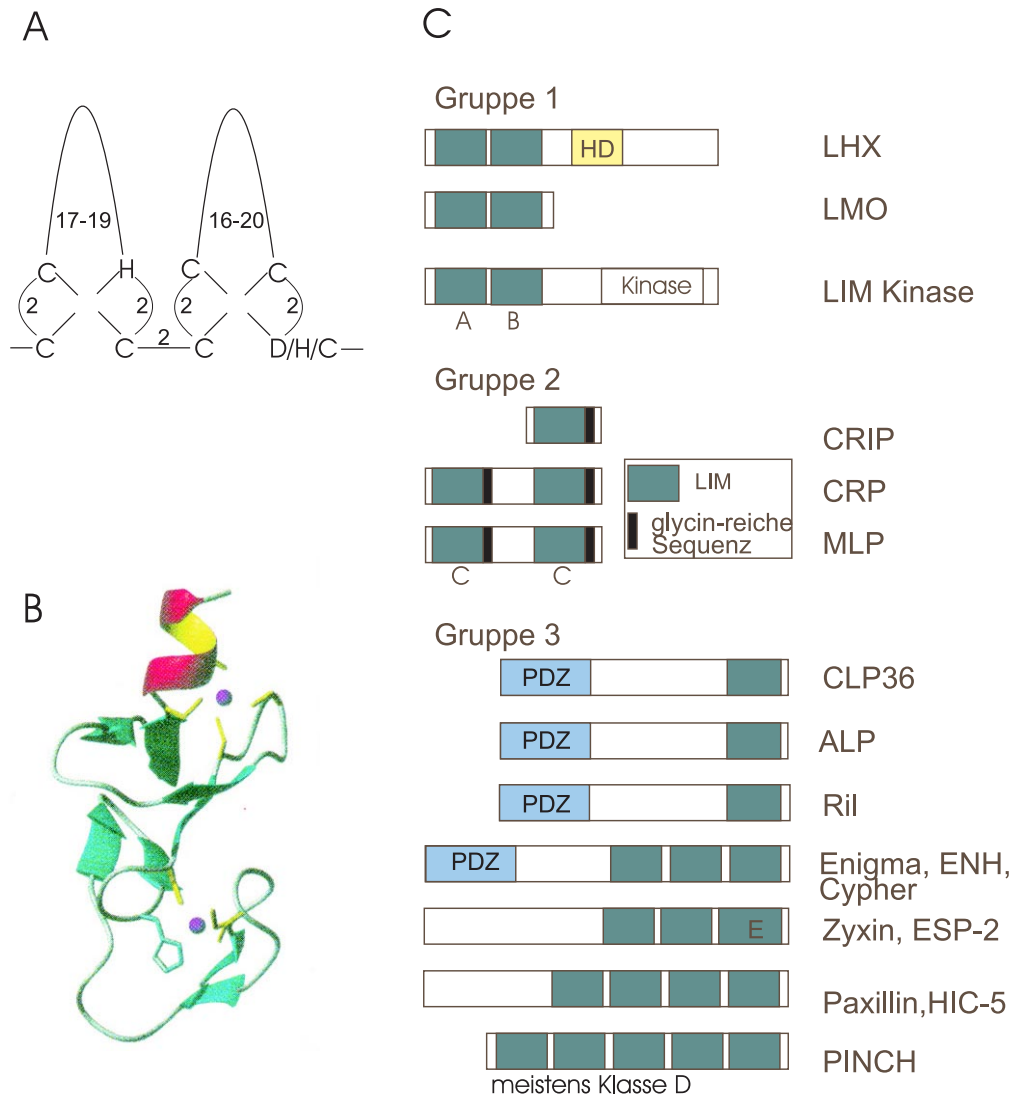


Abbildung 2.5: (A) Schematische Darstellung der "Zinkfinger" der LIM-Domäne mit den konservierten Cystein(C)- und Histidin(H)-Seitenketten. (B) Banden-Zeichnung der NMR-Struktur der C-terminalen LIM-Domäne aus qCRP2 (Reproduktion aus Konrat et al., 1997). Die Zn^{2+} -bindenden Cysteinreste sind gelb dargestellt, die Histidinreste hellblau, die Zn^{2+} -Ionen als magentafarbige Kugeln. Die LIM-Domäne enthält acht β -Faltblatt-Srukturen und endet in einer C-terminalen α -Helix (rot). (C) Klassifizierung der LIM-Domänen bzw. der LIM-Proteine (nach Dawid et al., 1998). Die LIM-Domänen in den LHX Proteinen mit DNA-bindender Homeodomäne, in LMO und LIMK sind sequenzverwandt und bilden Gruppe 1; die Sequenzähnlichkeit zwischen LIMK und anderen Proteinen der Gruppe 1 ist niedriger als die Ähnlichkeit zwischen LHX- und LMO-Proteinen. Die Proteine aus Gruppe 2 haben verwandte LIM-Domänen und enthalten nur ein kurzes zusätzliches Sequenzmotiv (schwarz). Obwohl die Proteine der Gruppe 3 heterogener sind, sind die LIM-Domänen dieser Gruppe untereinander verwandter als mit denen der Gruppen 1 und 2. Proteine mit einer zusätzlichen N-terminalen PDZ-Domäne (s.o.) bilden eine Untergruppe in 3.

(*actinin-associated LIM protein*) und Ril (*reversion-induced LIM protein*), sowie Enigma, Cypher und ENH (*enigma homolog*), die alle zusätzlich eine N-terminale PDZ-Domäne enthalten und größere Homologien innerhalb der LIM und PDZ-Domänen aufweisen. Das Wissen über diese Proteine ist hauptsächlich deskriptiv: sie vereinigen über PDZ- und LIM-Interaktionen Zytoskelettproteine und Signalmoleküle. Über die funktionelle und physiologische Konsequenz dieser Interaktion ist bisher wenig bekannt (s. Diskussion).

Im Gegensatz zu den PDZ/LIM-Domäne Proteinen assoziieren die Proteine Zyxin, Paxillin, HIC-5 (*Hydrogenperoxid-inducible LIM-Protein*) und PINCH mit den fokalen Adhäsionen (Beckerle, 1997; Brown et al., 1996; Wu, 1999). Durch direkte oder indirekte Assoziation mit Integrinen und integrin-assoziierten Kinasen nehmen sie dort eine zentrale Stellung für die Transduktion integrinvermittelter Signale ein. Zyxin und Paxillin enthalten neben den LIM-Domänen auch Bindungsstellen für SH2- und SH3-Domänen, über die zusätzlich Signalproteine gebunden werden können (Crawford et al., 1992).

Paxillin ist das am besten untersuchte Protein innerhalb der Gruppe 3 und bindet an eine Vielzahl von Struktur- und Signalmolekülen. Es rekrutiert die fokale Adhäsionskinase FAK an ihren Wirkort (Brown et al., 1996) und kann als funktioneller Partner von FAK als eines der wichtigsten regulatorischen Proteine an den fokalen Adhäsionen betrachtet werden. Durch seine Interaktion mit dem $\alpha 4$ -Integrin reduziert es die Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen und damit die Ausbreitung der Zellen⁹ (Liu et al., 1999). Paxillin ist an den fokalen Adhäsionen ein Substrat der Onkoproteine v-Src und E6, und somit in die onkogene Transformation involviert (Sattler et al., 2000). Die regulierte Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Paxillin während der Differenzierung der Neuroblasten (Ivankovic-Dikic et al., 2000), der integrinvermittelten Degranulation eosinophiler Leukozyten (Kato et al., 2000), der transendothelialen Lymphozytenmigration (Etienne-Manneville et al., 2000) und während apoptotischer Zytoskelettveränderungen (Song et al., 2000) impliziert eine Funktion während der Zelldifferenzierung, Immunantwort und Apoptose und legt eine ubiquitäre Bedeutung von Paxillin für die Zelladhäsion und die Transduktion integrinabhängiger Signale nahe.

Das zu Paxillin homologe HIC-5 findet sich sowohl in den fokalen Adhäsionen als auch in der Kernmatrix. Es interagiert über die vier C-terminalen LIM-Domänen (s.2.5) mit Vinculin, FAK und der Phosphotyrosin-Phosphatase PEST (Nishiya et al., 1999) sowie mit der Transkriptionsaktivator-Domäne des Glykokortikoid-Rezeptors, wodurch es koaktivierend auf den steroidrezeptor-vermittelte Genexpression wirkt (Yang et al., 2000). HIC-5 ist in die Zellalterung und-Immortalisierung involviert (Ishino K. et al., 2000) und fungiert als Negativregulator während der Muskeldifferenzierung. Die Phosphorylierung von HIC-5 an einem Tyrosinrest durch $CAK\beta$ und Fyn impliziert eine Funktion während der Signaltransduktion (Ishino M. et al., 2000).

Zyxin wird in den Zellkern transportiert und enthält ein leucinreiches Motiv, das den Export aus dem Nukleus ermöglicht. Durch dieses Pendeln¹⁰ zwischen den fokalen Adhäsionen und dem Nukleus ist Zyxin ein potentieller Kandidat für die Steuerung der integrinvermittelten Genexpression (Nix und Beckerle, 1997).

⁹engl "spreading"

¹⁰engl. "shuttle"

LIM- und PDZ-Domänen stellen also zwei strukturell verschiedenartige, hochspezifische Adaptermotive für Protein/Protein-Interaktionen dar, die Transmembranproteine mit ihren Effektorproteinen, Strukturproteinen oder Signalmolekülen zu einem funktionellen Proteinkomplexen vereinen. Dies geschieht an spezialisierten Membranregionen, z.B. den fokalen Adhäsionen, den neuronalen Synapsen oder dem Rhabdomer von Sehzellen. Proteine mit LIM- und/oder PDZ-Domäne assoziieren allerdings auch mit nichtmembranständigen Zytoskelettstrukturen wie den elektronendichten Banden auf Stressfasern oder der Z-Scheibe im Muskelsarkomer, wobei ihre funktionelle Bedeutung dort noch weitgehend ungeklärt ist.

3

Material und Methoden

3.1 Feinchemikalien

O-Acetylsalicylsäure	Fluka
Agarose NA	Pharmacia
Agarose (low EEO)	Sigma
3-Amino-1,2,4-triazol	Sigma
Ampicillin	Sigma
BAPTA-AM	Sigma
Benzamidin	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R	Serva
Cytochalasin D	Sigma
Dithiotreitol	Sigma
DMF	Sigma
DMSO	Sigma
H ₃ ³² PO ₄ (in Wasser, pH 5-7, 8500-9120 Ci/mmol, 150 mCi/ml)	NEN
Hepes	Sigma
Iloprost	Schering
IPTG	Biomol
Kanamycin	Sigma
Lysozym	Biomol
Maleimid aktiviertes Keyhole Limpet Hemocyanin	Pierce
PEG 4000	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma
Pipes	Sigma
PMSF	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Proteaseinhibitor-Cocktail Tabletten, mini (EDTA-frei)	Boehringer Mannheim
Protein A-Sepharose CL-4B	Sigma
TRAP	Sigma
Triton X-100	Sigma

Natriumcitrat (3,1% ig) Apotheke Klinikum Innenstadt
X-Gal Clontech

3.2 Enzyme

Apyrase Sigma
Thrombin Boehringer Mannheim
Faktor Xa Boehringer Mannheim
(Enzyme für die Molekularbiologie s. 3.21)

3.3 Antikörper

- Erstantikörper

- Anti-Huhn α -Aktinin Ig, monoklonal, Klon BM-75.2 Sigma
- Anti-Aktin, monoklonal Chemicon
- Anti-Vinkulin Ig, monoklonal ICN, Aurora, Ohio
- Anti-Phosphoserin IgM, monoklonal (Klon 16.B.4) Biomol
- Anti-Gal4(DBD), Kaninchen, polyklonal Santa Cruz
- Anti-RGSHHHH, Maus IgG₁ Qiagen

(alle monoklonalen Antikörper stammen aus der Maus)

- Zweitantikörper

- Esel Anti-Kaninchen Ig, HRP-gekoppelt, F(ab')₂ Fragment Amersham
- Esel Anti-Maus Ig, HRP-gekoppelt, F(ab')₂ Fragment Amersham
- Ziege Anti-Maus Ig M, HRP-gekoppelt Jackson
- Fluorescein (FITC)–konjugiertes *AffiniPure* Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L) ..
Jackson
- Alexa 568 Ziege Anti-Maus IgG, 2 mg/ml Molecular Probes
- Alexa 488 Ziege Anti-Maus IgG, 2 mg/ml Molecular Probes
- Alexa 568 Ziege Anti-Kaninchen IgG, 2 mg/ml Molecular Probes

3.4 Zellkultur

3.4.1 HUVEC-Zellen

Material:

- Endothelzell-Medium: Endothelial Cell Growth Medium mit Supplementmix (Promocell) + 10 % FCS (Fetal calf serum, Sigma)
- PBS für die Zellkultur (Sigma)
- Kollagen-Lösung: Collagen G 3 mg/ml in 12 mM HCl (seromed) wird 40-fach verdünnt in PBS, 10 min. gerührt und sterilfiltriert
- 1 × Trypsin-EDTA Lösung (Sigma)
- α -Chymotrypsin (Sigma), 0.1 %ig in PBS
- 25 cm² Primariakolben (Falcon), nicht coaten!
- 75 cm² PS-Zellkulturflaschen (Falcon)
- 26 × 33 mm 8-well Platten (Nalge Nunc)
- in Ethanol gewaschene und abgeflamte 1.2 × 1.2 cm Glas-Deckgläschen (Labor-Assistent)

Endothelzellen wurden aus der menschlichen Nabelschnur nach einer Methode von Jaffe (Jaffe et al., 1973) isoliert. Die Zellen, die die Innenwände der Nabelschnurvene auskleiden, wurden durch Chymotrypsinbehandlung abgelöst (30 min., 37°C). Die Vene wurde mit ca. 20 ml PBS nachgespült und die isolierten Endothelzellen bei 110 g und 25°C 10 min. abzentrifugiert, in Endothelzell-Medium resuspendiert und je $5-7 \times 10^5$ Zellen in Primariakolben ausgesät. Das Medium wurde alle 3-4 Tage ausgewechselt. Für die Subkultivierung wurden konfluente 1-2 Wochen alte Passagen bei 37°C für 1-3 min. mit Chymotrypsin inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe desselben Volumens serumhaltigen Mediums, das natürlicherweise Trypsininhibitoren enthält, inhibiert. Die Zellen wurden pelletiert (110 g, 10 min., 25°C), in Endothelzell-Medium resuspendiert und mit einer Konzentration von ca. 50 000 Zellen/ml in Zellkulturflaschen ausgesät. Um adhärentes Zellwachstum zu ermöglichen wurden sämtliche Kulturgefäße mit Kollagen G-Lösung beschichtet (1h, 37°C) und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden bis zur 5. Passage eingesetzt.

Für Immunfluoreszenzpräparate wurden kollagenisierte Glascoverslips in 8-well Platten mit 100 μ l Zellsuspension einer Dichte von 200 000 Zellen/ml überschichtet, 1 h bebrütet und anschließend die wells mit 1.5 ml Medium aufgefüllt. Die auf Glascoverslips kultivierten Zellen wurden für Immunfluoreszenz-Färbungen (s. pagereferendos) verwendet:

Um ruhende Zellen zu erhalten, wurden konfluente Zellen 1 h mit serumarmem (2 % FCS) Endothelzellmedium inkubiert und anschließend fixiert. Um aktivierte Zellen zu erhalten,

wurden die ruhenden, konfluenten Zellen mit Thrombin stimuliert (1 U/ml, 7 min.) und danach fixiert. Subkonfluente migrierende Zellen erhielt man, indem die Zellen etwa 3-6 h nach der Aussaat auf die Deckgläschen fixiert wurden.

3.4.2 PtK2-Zellen und glatte Muskelzellen

PtK2 ist eine epitheliale Zelllinie aus der Niere von Ratten-Kängurus. Die Zellen wurden von Dr. Patrick Keller kultiviert wie beschrieben (Toomre et al., 1999).

Die glatten Muskelzellen wurde von Dr. Wolfgang Erl aus der *Vena saphena magna* isoliert und kultiviert wie beschrieben (Erl et al., 1999).

3.5 Transformation von HUVEC-Zellen und PtK2-Zellen

3.5.1 Elektroporation der Endothelzellen

Die p β actin-EGFP-Plasmide, die für die fluoreszierenden EGFP-CLP-36 Fusionsproteine kodieren (s. 3.21.8), wurden durch Elektroporation in Endothelzellen transformiert, um die Lokalisation von CLP-36, CLP-36_{AS 1-257} und CLP-36_{AS 258-329} *in vivo* zu untersuchen. Während der Elektroporation wird durch Kondensatorentladung ein elektrischer Puls generiert, der zu einer transienten Porenbildung in der Zellmembran führt. Durch die Poren kann DNA aufgenommen werden.

Material:

- Elektroporationsküvetten mit 0.4 cm Elektrodenabstand (Biorad)
- Gene Pulser[®] II Elektroporationssystem mit Capacitance Extender PLUS

2×10^6 subkonfluente Endothelzellen wurden trypsinisiert und das Pellet mit 37°C warmem PBS gespült. Die Zellen wurden in 800 μ l eiskaltem PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis in eine Elektroporationsküvette gefüllt und 20 μ g circuläre Plasmid-DNA eingemischt. Nach einer Inkubation von 5 min. auf Eis wurde die Elektroporation bei 240 V und 960 μ F Kondensator-Kapazität durchgeführt. Die Zeitkonstante τ betrug 16.0 msec. Die Zellen wurde 7 min. auf Eis inkubiert und anschließend in 10 Vol. temperiertem Endothelzell-Medium (s. 3.4.1) aufgenommen und auf Deckgläsern, die mit Kollagen G beschichtet waren, ausgesät. Die Inkubation im Brutschrank verlief selektionsfrei. Eine transiente Expression von EGFP-Fusionsprotein konnte bereits nach 12 h Inkubation beobachtet werden. Die Elektroporationseffizienz betrug jedoch nur ca. 2 %.

3.5.2 Transformation von PtK2-Zellen nach der Calcium-Phosphat-Methode

Die Transformation der rekombinanten p β actinEGFP-Plasmide in die PtK2-Zellen mittels Calcium-Phosphat wurde von Dr. Patrick Keller durchgeführt. Sie erfolgte wie beschrieben

(Toomre et al., 1999).

3.6 Präparation der Blutplättchen

Von gesunden Probanden wurden unter Vorlage von 1/10 Volumen Na₃-Citrat (3,1% ig) 50–300 ml Blut aus der Kubitalvene entnommen, bei 180 g (RT, 20 min.) zentrifugiert und anschließend das Plättchen-reiche Plasma (PRP) abgenommen. Um eine Aktivierung der Plättchen während der Präparation durch freigesetztes Thromboxan und ADP zu verhindern, erfolgte eine Inkubation des PRP mit 1 mM Acetylsalicylsäure und Apyrase (0,3 U/ml) für 15 min bei 37°C; anschließend wurden 9 mM Zitronensäure und 5 mM EDTA (pH 7,6) zugegeben und die Plättchen bei 800 g (20°C, 20 min) pelletiert. Die Plättchen wurden in 2 ml Resuspensionspuffer B (s.u.), der 3 U/ml Apyrase enthielt, resuspendiert und durch Zugabe von 40 ml desselben Puffers, dem 0,6 U Apyrase zupipettiert wurden, gewaschen. Der pH-Wert von 6,2 im Resuspensionspuffer B verhindert die Bindung von Fibrinogen und damit die Plättchenaktivierung. Nach erneuter Pelletierung (800 g, 20°C, 20 min.) erfolgte eine Aufnahme in Resuspensionspuffer C, dem 0,6 U/ml Apyrase und 5 mM Glukose zugegeben wurden. Die Plättchen ruhten nach der Präparation mind. 30 min. bei Raumtemperatur, damit voraktivierte Formen - soweit möglich - wieder zum diskoiden Ausgangszustand zurückkehren konnten.

Plättchenlysate wurden durch Zugabe des gleichen Volumens eiskalten 2 × Lysepuffers gewonnen. Dem Lysepuffer wurde Vanadat zugesetzt, das als P_i-Analogon Phosphatasen inhibiert. Vanadat stabilisiert in der verwendeten Konzentration den Übergangskomplex ADP·P_i und wirkt daher stabilisierend auf das polymere F(filamentös)-Aktin (Combeau and Carrier, 1988).

Resuspensionspuffer B	20 mM	Hepes/pH 6,2
	138 mM	NaCl
	2,9 mM	KCl
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	EGTA
	0,36 mM	NaH ₂ PO ₄
Resuspensionspuffer C	20 mM	Hepes/pH 7,4
	138 mM	NaCl
	2,9 mM	KCl
	1 mM	MgCl ₂
	0,36 mM	NaH ₂ PO ₄

2 × Lysepuffer I	2%.....	Triton-X 100
	150 mM.....	NaCl
	100 mM	Hepes/pH7,4
	2 mM	EGTA
	<i>frisch zugeben:</i>	
	2 mM.....	Na ₃ VO ₄
	Proteaseinhibitor-cocktail: .	
	1 Tablette / 5 ml.....	

3.7 CLP-36 Anti-Seren

3.7.1 Gewinnung

Zur Gewinnung gegen CLP-36 gerichteter Anti-Peptid-Antikörper wurden Kaninchen mit Peptiden aus CLP-36 immunisiert. Hierfür wurden die Peptidsequenzen ESEKGDPNKPSGFRS (AS 226 - AS 239) und EDQIYCEKHARER (AS 302 - AS 314) ausgewählt, da sie eine geringe Sequenzhomologie zu verwandten Proteinen zeigen und gleichzeitig geringe Hydrophobizität aufweisen (bestimmt nach Kyte und Doolittle, 1982). Die geringe Hydrophobizität erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß diese Peptide an der Proteinoberfläche exponiert sind und dadurch immunogen wirken. Die Synthese der Peptide erfolgte durch Georg Arnold (Genzentrum der Universität München, Martinsried). An beide Peptide wurde N-terminal Cystein gekoppelt, um eine Konjugation mit dem aktivierten Trägermolekül „keyhole limpet hemocyanin“ (KLH) zu ermöglichen. Mit den immunogenen Peptid-Träger Konjugaten wurden Kaninchen immunisiert (Elvira Schecklis, pab-production, Hebertshausen). Im Abstand von 2 Wochen erfolgten je 2 Vorimmunisierungen subcutan mit 150 µg Antigen in 0,2 ml PBS + 0,2 ml „Freund’sches Adjuvans komplett“. Mit derselben Antigenaufbereitung wurden 3 Boostinjektionen im Abstand von 3-4 Wochen durchgeführt. Die Applikation erfolgte intramuskulär. Nach allen Immunisierungsschritten erfolgten Blutentnahmen (insgesamt 10).

Zur Gewinnung hochaffiner, hochspezifischer Antiseren wurde außerdem rekombinant exprimiertes His-CLP-36 zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Das Immunisierungsschema war dasselbe wie für die Anti-Peptid-Antikörper.

Im Western-Blot zeigten bereits die Seren der 1. Blutentnahme nach der Vorimmunisierung hohe Antikörper-Titer mit hoher Spezifität. Spezifität und Titer stiegen nicht weiter an mit späteren Abnahmen.

3.7.2 Reinigung durch Protein A–Sephrose und Affinitätsreinigung

Protein A–Sephrose Chromatographie

(nach Ey et al., 1978)

Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet Immunglobulin aus Kaninchen mit hoher Affinität und quantitativ in unter 5 min. und eignet sich daher zur Aufreinigung von Antisera. Gequollene Protein A–Sephrose CL-4B (Sigma) wurde in eine Säule gepackt (Bindungskapazität ca. 10-20 mg Antikörper pro ml gequollene beads) und mit 10 Vol. 1 M Tris-HCl (pH 8.0) äquilibriert. Der pH-Wert im Serum wurde eingestellt durch Zugabe von 1/10 Volumen 1.0 M Tris-HCl (pH 8.0) und das Serum auf die Säule aufgetragen. Die nichtbindenden Serumkomponenten wurden sukzessive ausgewaschen mit 10 Gelvolumen 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 10 Gelvolumen 10 mM Tris-HCl (pH 8.0). Der gebundene Antikörper wurde eluiert durch Zugabe von 100 mM Glycin (pH 3.0). Die Elution erfolgte schrittweise mit je 0.5 ml Puffer, wobei der pH-Wert im Eluat sofort durch Zugabe von 1/10 Volumen 1.0 M Tris-HCl (pH 8.0) neutralisiert wurde. Der Proteingehalt der Eluate wurde gemessen, die Peak-Fractionen vereinigt und in 0.02 % Na-Azid bei 4°C gelagert.

Wenn nicht anders angegeben, wurde für alle immunchemischen Versuche Protein A-gereinigter Antikörper.

Affinitätsreinigung an rekombinantem Antigen

(Internetprotokoll <http://genome-www.stanford.edu/group/botlab/protocols.html>)

Nitrocellulose bindet Protein und kann daher zur nichtkovalenten Immobilisierung von Antigen verwendet werden.

1 ml reine Nitrocellulose (Amersham) wurde in einem 15 ml PP-Falcon 3× mit 10 ml PBS gewaschen. 1 mg gereinigtes 6×His–CLP-36 (siehe dort), gelöst in 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM DTT, wurde mit der Nitrocellulose inkubiert (1 h, RT). Der Überstand wurde dekantiert und verbliebene Bindungsstellen auf der Nitrocellulose blockiert durch Inkubation mit 10 ml Blocklösung (PBS, 2 %BSA) (1 h, RT). Die Blocklösung wurde entfernt und die Nitrocellulose sukzessive gewaschen in 10 ml PBS (3× 5 min.), 10 ml Elutionspuffer (0.2 M Glycin pH 2.5 / 1 mM EGTA) (3× 5 min.) und 10 ml PBS (3× 5 min.).

2 ml Anti-6×His–CLP-36 Serum aus Kaninchen 2 (6. und 7. Blutabnahme) wurden mit der Antigen-gecoateten Nitrocellulose inkubiert (1.5 h, RT). Unspezifischer Antikörper und Serumproteine wurden mit PBS abgewaschen (4× 10 ml je 5 min.). Der spezifisch gebundene Antikörper wurde 2 × 10 min. mit je 1 ml Elutionspuffer eluiert. Der pH-Wert der Eluate wurde anschließend durch Zugabe von 1/10 Volumen Tris pH 8.0 auf pH 7.6 eingestellt.

Alle Inkubationsschritte wurden auf einer rotierenden Plattform (5 Umdrehungen / s) durchgeführt. Die Waschschrte erfolgten wie die Inkubationsschritte bei RT.

Der affinitätsgereinigte Antikörper wurde für die Mikroinjektion in Endothelzellen eingesetzt, da es hierfür wichtig war, eine möglichst hohe Konzentration an antigenspezifischem Antikörper benötigt wird. Dafür wurden die Eluate in 3× 21 Mikroinjektionspuffer (s. 3.14)

dialysiert und mit dem Zentrifugalfilter *Centricon 100* (Millipore) auf 100 μl einer Konzentration von 2.5 mg/ml Antikörper eingeeengt.

3.8 Isolation des Aktinmembranskeletts und des zytosomatischen Aktinzytoskeletts aus Plättchenlysaten

(modifiziert nach Fox et al.,1988)

Zur Untersuchung der physikalischen Assoziation von CLP-36 mit F-Aktin wurde das Aktinzytoskelett und das Membranskelett ruhender und aktivierter Plättchen nach der von Fox et al. (1988) entwickelten Methode isoliert:

500 μl Plättchensuspension einer Konzentration von 1 Mio. Zellen/ μl Resuspensionspuffer C wurden 5 min. auf 37°C vorgewärmt und durch Zugabe des Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptids SFLLRNP ("TRAP") (20 μM) stimuliert. Dies geschah im Aggregometer, da so das Ausmaß der TRAP-induzierten Plättchenaggregation mitverfolgt werden konnte. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Aktivierung wurden die Plättchen durch Zugabe von eiskaltem 2 \times Lysepuffer II lysiert und somit die Aktivierung gestoppt. Das neutrale Detergenz Triton-X 100 lysiert die Zellen und ermöglicht somit die Isolation der Triton-X-unlöslichen Zytoskelettkomponenten. Um eine Depolymerisation des Zytoskeletts durch Ca^{2+} -abhängige Proteine wie Gelsolin zu verhindern und um Proteasen, z.B. die Ca^{2+} -abhängigen Protease (Calpaine), zu hemmen, werden dem Lysepuffer Proteaseinhibitoren und EGTA zugefügt. Die Lysate wurden für 5 sec. gevortext und 30 min. auf Eis stengelassen. Das cytoplasmatische Aktinskelett wurde durch Zentrifugation bei 15000 g für 15 min. bei 4°C sedimentiert. Zur Isolation des Membran-Aktinskeletts wurde der Überstand bei 100 000 g erneut zentrifugiert (2.5 h, 4°C). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Fox et al. (1988) zeigten, daß diese thrombozytären Aktinzytoskelett-Fractionen morphologisch dem Zytoskelett und dem Membranskelett entsprechen. Beide Sedimentfractionen wurden kurz mit Lysepuffer II gewaschen und anschließend in SDS-Auftragspuffer-Puffer resuspendiert und für 5 min. bei 95°C gekocht. Die Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (siehe 3.10) aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet (siehe 3.13.1). Die Detektion der Proteine in den Zytoskelettfractionen erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

2 × Lysepuffer II	2%	Triton-X 100
	150 mM	NaCl
	100 mM	Tris-HCl/pH 7,4
	20 mM	EGTA
	<i>frisch zugeben:</i>	
	2 mM	Na ₃ VO ₄
	Proteaseinhibitor-cocktail: .	
	1 Tablette / 5 ml	

3.9 Präparation der aktinbindenden Proteinfraction aus Blutplättchen

nach Payraastre et al., 1991

Die 15 000 g Fraktion des Aktinzytoskeletts enthält auch die Intermediärfilamente und evt. Proteine, die unspezifisch im Pellet angesammelt sind. Um zu zeigen, daß CLP-36 spezifisch mit dem Aktinzytoskelett assoziiert, wurde das F-Aktin der 15 000 g Fraktion mit einem chaotropen Puffer depolymerisiert, die unlöslichen Intermediärfilamente durch Zentrifugation abgetrennt und anschließend das Aktin durch Dialyse repolymerisiert. Das repolymerisierte F-Aktin enthält nur spezifisch assoziierte Proteine und kann durch Zentrifugation bei 12 000 g erhalten werden.

Suspensionen (0.5 ml) von ruhenden und aktivierten Plättchen wurden in eiskaltem 2×Lysepuffer (2 % Triton X-100, 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM EGTA, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM ZnCl₂, Proteaseinhibitorcocktail (1 Tab./5ml) lysiert. Die Zytoskelettfractionen (15000 g Pellet) wurden in 1.5 ml Puffer A (0.6 M KI, 100 mM Pipes, 100 mM KCl, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM ZnCl₂, pH 6.5) aufgelöst und für 20 min. bei 4°C milde geschüttelt. Die Lösung wurde geklärt durch Zentrifugation bei 40000 g und 4°C für 20 min. Der Überstand, der das Aktin und die aktinbindenden Proteine enthielt, wurde bei 4°C ÜN gegen einen Puffer, der 10 mM Pipes, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 2 µg/ml Pefablock enthielt, dialysiert. Dadurch wurde das Aktin repolymerisiert. Anschließend wurde bei 12 000 g und 4°C für 10 min. zentrifugiert und das Pellet bestehend aus F-Aktin und aktinbindenden Proteinen in Laemmli-Puffer (s.3.10) aufgenommen. Das Protein wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt (s. 3.10) und im Western-Blot (s. 3.13.1) untersucht.

Dialyseschlauch: MW-Ausschluß 12-14 kDa, 18 mm breit (Visking)

3.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Trennung von Proteinen im Polyacrylamidgel wird der Siebeffekt des Gels und die Ladung der Polypeptide ausgenutzt. Im Falle der SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) wird die individuelle Ladung der Polypeptide durch die Bindung des anionischen SDS nahezu ausgeschaltet, wodurch die elektrophoretische Wanderung der Proteine zur Anode allein von der Größe des Proteine und der Porengröße des Gelnetzwerks abhängt. Die Erhitzung der Proben auf 95°C in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol im Auftragspuffer bewirkt durch Reduktion der Schwefelbrücken eine Zerstörung der Quartär- und Tertiärstruktur. Das Gelnetzwerk wird durch die radikalische Polymerisation des monomeren Acrylsäureamids und des quervernetzenden N',N-Methylen-bis-acrylsäureamids aufgebaut. Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems erfolgt vor der eigentlichen Trennung die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel.

3.10.1 Material und Lösungen

- Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur Protean II xi Cell (Biorad)
- Gießstand, Glasplatten (21.5 cm × 18.5 cm × 3 mm) und spacer (Biorad)
- Stromgeber

2 × SDS-Auftragspuffer nach Laemmli	Tris-HCl, pH 6.8	0.1 M
	Glycerin	20 ml
	SDS	4 g
	β -Mercaptoethanol	2 ml
	Bromphenolblau	1 mg
	H ₂ O bidest	ad 100 ml
Acrylamid-Stammlösung	40 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung 37,5 : 1 (Amresco)	
Sammelgel-Puffer	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	
Trenngel-Puffer	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	
Ammoniumpersulfat (APS) ..	10 % (w/v) APS in H ₂ O bidest, in 0,5 ml Aliquots auf -20°C, frisch zusetzen!	
Natriumdodecylsulfat (SDS) ..	10 % (w/v) SDS in H ₂ O bidest	

Material und Methoden

5 × Elektrophoresepuffer Tris 75 g
Glycin 360 g
SDS 25 g
H₂O bidest ad 5 l
pH nicht nachstellen!

3.10.2 Herstellung des Polyacrylamidgel

Pipettierschema für ein 12 %iges Gel der Größe 21.5 cm × 18.5 cm:

	Trenngel (T = 12 %)	Sammelgel (T = 4.6 %)
Acrylamid-Stammlösung	15 ml	2.5 ml
Trenn-/Sammelgel-Puffer	12.5 ml	5 ml
H ₂ O bidest	21.7 ml	13.9 ml
SDS-Lösung	0.5 ml	0.2 ml
<i>Trenngellösung 15 min. entgasen!</i>		
APS-Lösung	0.3 ml	0.06 ml
TEMED	40 µl	20 µl

Trenngel-Lösung für 1 Gradientengel:

	„leichte“ Lösung (T=5.2%)	„schwere“ Lösung (T=20.6%)
Acrylamid-Stammlösung	3 ml	12 ml
Trenngel-Puffer	6 ml	6 ml
H ₂ O bidest	14.7 ml	
Glycerin		5.7 ml
SDS-Lösung	240 µl	240 µl
TEMED	15 µl	15 µl

Gießen des Gels und Elektrophorese:

1. Glasplatten mit Wasser spülen und mit Aceton und Ethanol entfetten. Gelkammer im Gießstand zusammenbauen und auf Dichtheit prüfen.
2. Trenngellösung vorbereiten und luftblasenfrei zwischen die Platten bis ca. 4 cm unter den oberen Rand einfüllen. Für ein Gradientengel „leichte“ und „schwere“ Lösung in Gradientenmischer füllen und Gemisch in die Gelkammer laufen lassen.
3. Trenngellösung mit wasser-gesättigtem Butanol überschichten und ca. 2 h polymerisieren lassen.
4. Butanol mit Filterpapierstreifen abnehmen und Trenngelkante kurz mit H₂O bidest spülen. Wasser mit Filterpapier abnehmen.

5. Zur Sammelgellösung APS und TEMED zugeben und bis zum oberen Rand der Gelkammer eingießen, sofort Kamm mit Probestaschen einsetzen, Luftblasen entfernen und das Sammelgel polymerisieren lassen.
6. Die Glasplatten mit dem Gel zum Schutz vor Austrocknung in feuchte Tücher wickeln, in eine Folie packen und zur vollständigen Polymerisation über Nacht im Kühlraum aufbewahren. Dort bis zur Verwendung lagern.
7. Kamm entfernen und Probestaschen mit Elektrophoresepuffer ausspülen.
8. Gelkammer in Elektrophoreseapparatur einbauen und obere und untere Elektrodenkammer mit Elektrophoresepuffer füllen. Luftblasen in den Probestaschen und am unteren Gelrand beseitigen.
9. Proben in SDS-Auftragspuffer aufnehmen und sofort 5 min. bei 95°C kochen. (Vorher nicht lysierte Plättchensuspensionen enthalten keine Proteaseinhibitoren und wurden daher in kochendem Auftragspuffer aufgenommen.) Unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 15000 g für 5 min. pelletieren und Probe abkühlen lassen.
10. Proben in die Geltaschen pipettieren
11. Elektrophorese über Nacht bei ca. 15 mA durchführen.

3.11 Anfärbung von Proteinen in Gel

3.11.1 Coomassie-Proteinfärbung

Coomassie Brilliant Blue R ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der an Proteine unspezifisch bindet. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0.3-1 µg Protein / Bande. Die Färbelösung färbt das Gel zunächst blau, nach der Entfärbung treten die Proteinbanden gegen einen farblosen Hintergrund hervor.

Lösungen:

Färbelösung.....	Coomassie Brilliant Blue R ... 1.5 g
	Methanol.....455 ml
	Eisessig.....80 ml
	H ₂ O bidest.....ad 1000 ml

Entfärbelösung.....	Methanol.....250 ml
	Eisessig 350 ml
	H ₂ O bidest.....ad 1000 ml

Material und Methoden

Arbeitsprotokoll:

1. Das Gel in eine Wanne mit Färbelösung geben und im Schüttelwasserbad verdeckt bei 60°C oder RT für 15-30 min. schütteln.
2. Färbelösung abgießen und Gel kurz mit Wasser waschen.
3. Das Gel mit Entfärbelösung überdecken und im Schüttelwasserbad bei 60°C oder RT entfärben. Gefaltetes Papiertuch dazulegen, das den Farbstoff aufnimmt.
4. Das entfärbte Gel mind. 10 min. in 10 %iges Glycerin einlegen, dann auf Filterpapier bringen und mit Celluphanfolie zudecken. Im Slab-Dryer 1-2 h bei 80°C trocknen.

3.11.2 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung werden die Proteine sukzessive mit Essigsäure/Methanol und Glutaraldehyd im Gel fixiert und dann in eine Silbernitratlösung eingelegt. Einige Silber-Ionen werden von funktionellen Gruppen im Protein (z.B. Sulfhydryl- und Carboxylgruppen) gebunden und durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. In einem Mechanismus ähnlich der Photographie werden nun durch starke Reduktionsmittel alle Silber-Ionen im Gel zu metallischem Silber reduziert. Dies findet in der Nähe der Silberkeime viel schneller statt als im übrigen Gel. Daher färben sich die Proteinbanden schnell braun bis schwarz. Diese Färbemethode ist etwa $100 \times$ sensitiver als die Coomassie-Färbung. Es können 2-5 ng Protein/Bande nachgewiesen werden.

Nur MilliQ-Wasser und Reinstchemikalien verwenden!

- | | | |
|----------------|---------------|---|
| 1. Fixierung | 2 × 30 min. | |
| | Fixierlösung: | Methanol / H ₂ O / Essigsäure (120 ml / 90 ml / 30 ml) |
| | 2 × 10 min. | waschen mit H ₂ O |
| | 1 × 15 min. | 2.4 g Natriumtetraborat-Decahydrat
150 ml H ₂ O
2 ml 25 % Glutaraldehyd |
| | 3 × 30 min. | oder länger, waschen mit H ₂ O |
| 2. Einlagerung | 1 × 15 min. | 24 ml H ₂ O
2.3 ml 1M NaOH
5 ml 20 % (w/v) AgNO ₃
ad 125 ml H ₂ O |
| | 2 × 5 min. | H ₂ O |

3. Reduktion
- 13 ml Ethanol
 - 0.75 ml 1 % (w/v) Zitronensäure
 - 90 μ l 37 % Formaldehyd
 - ad 150 ml H₂O
- Entwicklung bis zur gewünschten Intensität
4. Reduktionsstop
- 1 \times 10 min. 3.7 g Tris-HCl
 - 2.5 g Na₂S₂O₃
 - 100 ml H₂O
 - 2 \times 5 min. H₂O
5. Hintergrund-Reduktion (Farmer's Reducer)
- 2.5 ml 20 % (w/v) Na₂S₂O₃
 - 2.5 ml 1 % (w/v) K₃[Fe(CN)₆]
 - 220 ml H₂O
 - bis zur gewünschten Hintergrund-Intensität einwirken lassen
 - 3 \times 10 min. H₂O
6. Lagerung
- 20 % Glycerin mindestens 2 h

3.12 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von aufgereinigtem 6 \times His-Clp-36 erfolgte nach Lambert-Beer über die Messung der Absorption bei 280 nm. Der Extinktionskoeffizient von CLP-36 wurde nach Gill und von Hippel (1989, Expasy Tools) anhand der Zahl der Tyr-, Trp- und Cysteinreste in CLP-36 berechnet und beträgt $\epsilon = 20820$ ($M^{-1}cm^{-1}$, 280 nm, in 6 M Guanidium-Hydrochlorid, 20 mM Phosphat-Puffer, pH 6.5).

Proteinbestimmung mit Coomassie Blue

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 liegt in sauren pH-Bereich anionisch vor und interagiert mit den positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Dabei färbt sich die Lösung blau. Die Blaufärbung wird bei 595 nm gemessen. Die Intensität der Färbung ist im Bereich $0.03 < A(595\text{ nm}) < 0.7$ proportional zum Gesamtproteingehalt der Lösung. Das Färberergebnis variiert von Protein zu Protein in Abhängigkeit von der Zahl der positiv geladenen Aminogruppen (Variationskoeffizient = 29 %) und wird auf das Eichprotein BSA bezogen.

Testansatz:

H₂O bidest 350 - x μ l
Proteinlg. x μ l
Coomassie-Blue Fertiglösung (Pierce)
350 μ l

3.13 Immunologische Techniken

3.13.1 Western-Blotting: Proteintransfer und Immundetektion

Die Western-Blot Methode wurde angewandt, um die Expression von CLP-36 in verschiedenen Zellen zu überprüfen und um Anti-CLP-36-Immunpräzipitate zu untersuchen. In den Immunpräzipitaten sollten durch immunologische Detektion kopräzipitierende Proteine detektiert werden und die Phosphorylierung von CLP-36 (s. 3.16.1 und 3.16.2) untersucht werden.

Beim Western-Blot werden Proteine, die durch Gelelektrophorese getrennt wurden, auf eine Membran transferiert und dort mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen.

Zur Trennung der Proteinproben wurde das unter 3.10 beschriebene diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamid-Gel nach Laemmli (1970) verwendet. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte durch elektrophoretische Elution im Semi-Dry-Verfahren (Towbin et al.,1979):

Materialien und Geräte

- Nitrocellulose-Membran Hybond-Super (Amersham)
- Filterpapier Novablot PKG/500(Pharmacia Biotech)
- Semi-Dry-Blotting Apparatur mit Graphitelektroden (LKB 2117 Multiphor II)
- SuperSignal Chemiluminescent Substrate (Pierce)
- ECL Hyperfilm (Amersham)

Anodenpuffer I 0,3 M Tris, 20 % Methanol, pH~10.4 (nicht mit Säure oder Lauge nachstellen!)

Anodenpuffer II 25 mM Tris, 20 % Methanol, pH~10.4 (nicht mit Säure oder Lauge nachstellen!)

Kathodenpuffer 40 mM ϵ -Aminocapronsäure, 20 % Methanol, pH~7.6 (nicht mit Säure oder Lauge nachstellen!)

TBST-Puffer	10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20
Block-Lösung	TBST-Puffer und 5 % (w/v) Magermilchpulver (Biorad)
Erst-Antikörperlösung	Verdünnung des Erst-Antikörpers in 50 ml TBST-Puffer
Zweit-Antikörperlösung	Verdünnung des HRP-markierten Zweit-Antikörpers in 50 ml TBST-Puffer

Elektroblotting

- Die Nitrocellulose-Membran und 15 Filterpapiere auf die entsprechende Gelgröße zurechtschneiden (Standard: 12,5 cm × 16 cm).
- Nitrocellulose-Membran in Milli Q-Wasser tränken und 4 Filterpapiere in Anodenpuffer I, 4 Filterpapiere in Anodenpuffer II und 7 Filterpapiere in Kathodenpuffer einlegen. Die Bildung von Luftblasen an Filterpapier oder Membran vermeiden.
- Nach Beendigung der Gelelektrophorese eine Glasplatte abnehmen und den zum Transfer vorgesehenen Teil ausschneiden.
- Elektrodenplatten der Blotting-Apparatur mit H₂O bidest gleichmäßig benetzen, und überschüssiges H₂O mit Filterpapier abnehmen. Die in Anodenpuffer II getränkten Filterpapieren nacheinander auf die Anode legen.
- Nitrocellulose-Membran auf den Filterpapierstapel auflegen.
- Gel auf die NC-Membran legen.
- Nacheinander 7 in Kathodenpuffer II getränkte Filterpapiere auf das Gel legen.
- Obere Elektrodenplatte prallel auflegen und mit 1,5 kg Metallplatten beschweren. Beim Aufbau ist zu beachten:
Nach jeder Lage Luftblasen aus dem Sandwich durch vorsichtiges Rollen mit einer Walze entfernen. Überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier abnehmen.
- eine konstante Stromstärke von 195 mA einstellen für Gele der Standardgröße 12,5 cm × 16 cm (ansonsten ca. 1,0 mA/cm²). Die Spannung steigt während des Blottens auf max. 20 V an.
- Transfer durchführen für 1h 45'–2h.

Immundetektion

Alle Inkubationen wurden in einer 15 cm × 18 cm Metallschale auf einem Horizontal-Schüttler durchgeführt.

- Nach Beendigung des Transfers Membran mit einer stumpfen Pinzette entnehmen und mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben in eine Schale mit 50 ml Block-Lösung überführen.
- Zur Absättigung der Membran mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C schütteln.
- Membran 2 × 5 min. mit 100 ml TBST-Puffer waschen.
- 50 ml der Erst-Antikörperlösung zugeben und 1 h bei RT inkubieren.
- Membran 3 × 10 min. mit 100 ml TBST-Puffer waschen.
- 50 ml der Zweit-Antikörperlösung zugeben und 1 h bei RT inkubieren.
- Membran 3 × 10 min. mit 100 ml TBST-Puffer waschen.
- Für die Chemilumineszenz-Detektion das frisch angesetzte 1:1 Gemisch aus Luminol/Enhancer- und Peroxid-Lösung zugeben und je nach Stärke der zu erwartenden Banden 1 bis 5 min. inkubieren.
- Detektionslösung abkippen und Membran kurz in TBST-Puffer spülen.
- Membran in Frischhaltefolie einwickeln, verbleibende Flüssigkeit und Luftblasen mit einer Walze und Papiertüchern entfernen.
- Markerstreifen (stratagene) und Membran mit der geblotteten Seite nach oben auf einen Karton kleben, in eine Film-Kassette legen und in der Dunkelkammer blausensitiven Hyperfilm auflegen. Exposition bis zur Entwicklung des gewünschten Signals.

3.13.2 Immunpräzipitation

Mithilfe von immobilisierten Antikörpern können Antigene aus Zell-Lysaten präzipitiert und damit spezifisch angereichert werden. Diese Methode wurde eingesetzt, um (a) mit CLP-36 spezifisch kopräzipitierende Proteine, also potentielle CLP-36-bindende Proteine nachzuweisen und (b) die Phosphorylierung von CLP-36 zu untersuchen.

Hierfür wurden die präzipitierten Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s.refsec:SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt und mittels Silberfärbung (s.refSilber) detektiert oder geblottet und anschließend immundetektiert.

Zur Immobilisierung des Antikörpers wurde Protein A–Sephrose CL-4B verwendet, da Protein A aus *Staphylococcus aureus* Kaninchen IgG mit hoher Affinität bindet und CL-4B Sepharose einen vergleichsweise geringen Hintergrund zeigt.

Arbeitsprotkoll:

Alle Schritte werden bei 4°C durchgeführt. Die Inkubationen erfolgen im Horizontalschwenker.

Protein A-Sepharose CL-4B-Lösung: Eine Spatelspitze Protein A-Sepharose (Feststoff) in Lysepuffer I (s.3.6, ohne Zusätze) quellen lassen. 200µl gequollene beads werden 3 × mit Lysepuffer I gewaschen und mit Lysepuffer auf 1 ml eingestellt (1 ml gequollene beads bindet ca. 10-20 mg Antikörper).

1. 500 µl Plättchensuspension mit 1 Mio. Plättchen/µl werden in 500 µl Vol. 2 × Lysepuffer I (s.3.6, ohne Zusätze) aufgenommen, 5 sec. gevortext und 10 min. auf Eis stehengelassen. Zur Untersuchung der Phosphorylierung enthält der Lysepuffer zusätzlich "Phosphatase Inhibitor Cocktail 1", der 1:100 verdünnt eingesetzt wird.
2. Um unlösliche Zellfragmente zu entfernen, werden die Lysate 15 min. bei 15000 g zentrifugiert.
3. Unspezifisch bindende Proteine werden präabsorbiert durch Inkubation der Lysate mit 2 µg Ig aus Präimmenserum und 30 µl Protein A-Sepharose-Lösung für 1 h.
4. An die Antikörper-Sepharose gebundene Proteine werden pelletiert durch Zentrifugation bei 15000 g für 10 min.
5. Der Überstand wird für 1 h mit 15 µg CLP-36 Ig inkubiert.
6. Der Antigen/Antikörper-Komplex wird immobilisiert durch Zugabe von 15 µl Protein A-Sepharose-Lösung (1 h Inkubation).
7. Das spezifisch an die Protein A-Sepharose gebundene Protein wird für 5 min. bei 15000 g abzentrifugiert und 3 × mit Lysepuffer I gewaschen. Der Lysepuffer im letzten Waschschritt enthält keine Phosphatase- und Protease-Inhibitoren.
8. Die gewaschenen beads werden in SDS-Auftragspuffer aufgenommen (s.3.10) und 5 min auf 95°C erhitzt.
9. Die Immunpräzipitate werden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 3.10) und über eine Silberfärbung (s. 3.11.2) des Gels oder im Immunoblot (s. 3.13.1) untersucht. Das Silbergel wird im Slab-Dryer getrocknet (1.5 h, 80°C) oder direkt mit dem *fiery*-gesteuerten Canon CLC 700 Kopiersystem eingescannt.

3.13.3 Immunopull-down Assay

Der Immunopull-down Assay basiert auf einer Immunpräzipitation mit dem Unterschied, daß nicht das endogene CLP-36 aus dem Plättchenlysat, sondern exogen zugegebenes His-CLP-36, His-CLP-36_{AS 1-256} und His-CLP-36_{AS 257-329} präzipitiert werden. Die Methode

diente ebenfalls dem Nachweis kopräzipitierender Proteine. Plättchenlysat wurde mit den Polyhistidin-Fusionsproteinen inkubiert (1 h, 4°C), das anschließend präzipitiert wurde. Dazu wurde ein gegen den *His-tag* gerichteter Antikörper (Anti-RGSHHHH, Quiagen, s. 3.3) verwendet. Das Präzipitat wurde analog zur Immunpräzipitation gewaschen (s. 3.13.2) und im Silbergel untersucht (s. 3.11.2). Die Methode bietet den Vorteil, daß rekombinantes Protein im Überschuß eingesetzt werden kann und daher interagierende Proteine aus dem Lysat quantitativ abgefangen und im Silbergel besser detektiert werden können. Einzelheiten der Durchführung sind unter 4.6 beschrieben.

3.13.4 Cytochemische Immundetektion durch Immunfluoreszenz und Immunogold-Elektronenmikroskopie

Immunfluoreszenzdetektion

Durch Immunfluoreszenz sollte CLP-36 in Plättchen verschiedener Aktivierungsstadien und in ruhenden und aktivierten Endothelzellen lokalisiert werden. Durch spezifische Erst-Antikörper und fluoreszenzfarbstoff-markierte Zweit-Antikörper wurden Antigene in hierfür präparierten Zellen sichtbar gemacht und fluoreszenzmikroskopisch lokalisiert. F-Aktin wurde mit Phalloidin detektiert, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiert war. Phalloidin, ein bitykliches Heptapeptid aus dem grünen Knollenblätterpilz *Amanita phalloides*, bindet spezifisch an filamentöses Aktin und verhindert dessen Depolymerisation.

Material:

- Deckgläser 12 mm² (Labor-Assistent)
- 24-well, 6-well Platten (Corning)
- Normal Goat Serum (Jackson ImmunoResearch), 10 %ig in PBS
- Erst-Antikörperlösung: 0.4 µg CLP-36-Antikörper (s. 3.7.2) wird in 25 µl PBS verdünnt. Alle anderen Antikörper werden eingesetzt wie vom Hersteller empfohlen.
- Zweit-Antikörperlösung: Der mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Zweitantikörper (s. 3.3) wird 1:200 in PBS verdünnt.

10 × PBS, pH 7.4	KCl	2 g
	NaCl	80 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	14 g

PHEM-Puffer	Pipes	60 mM
	Hepes	25 mM
	EGTA	10 mM
	MgCl ₂	3 mM

Vorbereitung:

Herstellung des *Mounting*-Mediums Mowiol (nach Heimer und Taylor, 1974):

2.4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem) werden mit 6 g Glycerin vermischt und in 6 ml Wasser aufgenommen. Die Mischung wird für einige Stunden bei RT inkubiert, 12 ml 0.2 M Tris (pH 8.5) hinzugefügt und unter gelegentlichem Mixen 10 min. auf 50°C erhitzt. Nachdem sich das Mowiol gelöst hat, wird die Lösung geklärt durch Zentrifugation bei 5000 g für 15 min. Um das Verblässen des Farbstoffes zu reduzieren, wird 1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octan (DABCO) 2.5 %ig hinzugefügt. Die Lösung wird aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Zentrifugation der Blutplättchen auf Deckgläser:

Deckgläser wurden für 1 h mit 100 μ l Poly-L-Lysin (0.1 mg/ml) beschichtet, 2 \times mit PBS gewaschen und an der Luft getrocknet. 100 μ l gewaschene Plättchen oder Plättchen-reiches Plasma (PRP) wurden in Resuspensionspuffer C auf eine Konzentration von 15000 / μ l eingestellt und auf die beschichteten Deckgläser aufgebracht. Um die Adhäsion der Plättchen an die Glasoberfläche zu beschleunigen, wurden die Deckgläser in einer "24-well"-Schale 5 min. bei 250 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Plättchen bei 37°C für 5-10 min. inkubiert, um die Ausbreitung der aktivierten Plättchen (engl. „spreading“) zu ermöglichen. Die vorteilhaftigen Formen ausgebreiteter Plättchen konnten vermehrt durch Inkubation bei 38-39°C erhalten werden.

Arbeitsprotokoll:

Alle nachfolgenden Schritte werden bei RT durchgeführt. Die Antikörperlösungen werden auf Parafilm getropft und die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf den Film gelegt. Die Inkubationen erfolgen in einer feuchten Kammer, die Waschschrirte in der 24-well-Schale.

1. Fixierung: Die auf Glas ausgebreiteten Blutplättchen oder auf Deckgläsern kultivierte Endothelzellen (s. 3.4.1) werden durch Austauschen des Mediums gegen Formalin (PHEM-Puffer, 3.7 % Formaldehyd) fixiert, das 10 min. mit den Zellen inkubiert wird. Nach 10 Min. wird die Fixierlösung abgegossen und die Zellen werden mit PBS gewaschen.
2. Die Zellen werden anschließend 5 min. auf einem Horizontal-schwenker in PBS, 0.2 % Triton X-100 permeabilisiert.
3. Die Permeabilisierungslösung wird abgekippt und 2 \times durch kurzes Schwenken der Deckgläser in PBS abgewaschen.
4. Unspezifische Bindungsstellen auf den Endothelzellen werden durch Überschichten der Zellen mit 10 % Ziegen-Normalserum blockiert. Nach 30 min. Inkubation wird die Blocklösung mit PBS abgewaschen (2 \times 10 min.).
5. Die Zellen werden für 1 h mit der Erst-Antikörperlösung inkubiert.

Material und Methoden

6. Die Erst-Antikörperlösung wird entfernt. Die Zellen werden 3×10 min. in PBS gewaschen.
7. Die Zellen werden im Dunkeln 1 h mit der Zweit-Antikörperlösung inkubiert.
8. Die Zweit-Antikörperlösung wird entfernt und die Zellen 3×10 min. in PBS gewaschen.
9. Ca. $10 \mu\text{l}$ Mowiol wird auf einen Objektträger pipettiert und das Deckglas mit den Zellen nach unten aufgelegt. Die Präparate werden geschützt vor Licht bei 4°C gelagert und können untersucht werden, sobald das Mowiol fest geworden ist.

Die Präparate wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop von Leica (Typ DMRBE) mit Hg-Lichtquelle (50W) untersucht. Es wurden PL FLUOTAR Objektive mit $40\times$ (NA 0.7) oder $100\times$ (NA 1.3) Vergrößerung verwendet. Einige Experimente mit auf Glas ausgebreiteten Plättchen wurden in Kooperation mit PD Dr. Jörg Hagmann (Friedrich-Miescher - Institut, Basel) präpariert und dort mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Hierfür wurde ein inverses Mikroskop (Leica), das mit einem TCS konfokalen System und einem Ar/Kr-Laser ausgestattet war, verwendet und Bilder mit $\times 63$ und $\times 100$ Objektiven aufgenommen (Typ UV 1,32NA Öl PL APO). Die Bilverarbeitung erfolgte mit der *Leica NT* software.

Immunogold-Elektronenmikroskopie

Durch Immunogold-Elektronenmikroskopie sollte CLP-36 in ruhenden Plättchen, die zu kein für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sind, und aggregierten Plättchen untersucht werden. Die Methode diente auch zur Bestätigung der durch Immunfluoreszenz gewonnenen Ergebnisse. Durch die hier verwendete Kryosubstitution ist eine verbesserte Konservierung der Zellkompartimente möglich. Die Präparation der Schnitte, Elektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktionen (s.u.) wurden von Prof. Dr. Eberhard Morgenstern (Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) durchgeführt.

Plättchen-reiches Plasma (PRP), antikoaguliert mit Na-Citrat (3.8 %) wurde aus venösem Blut gesunder Spender erhalten. Um ruhende Plättchen zu präparieren, wurde die Suspension vorfixiert mit einer Lösung, die 3 % Paraformaldehyd und 0.1 % Glutaraldehyd ($300 \mu\text{l}/\text{ml}$) enthielt und zentrifugiert. Aktivierte Plättchen wurden gewonnen, indem das PRP ohne Vorfixierung zentrifugiert wurde. In beiden Fällen wurden die Pellets 30 min. bei 4°C in einer Lösung mit 3 % Paraformaldehyd und 0.1 % Glutaraldehyd in 0.1 M Kakodylatpuffer, pH 7.4, fixiert. Nach dem Waschen wurden Blöcke der Pellets infiltriert mit 2.3 M Sucrose und schock-gefroren in flüssigem Stickstoff. Die gefrorenen Proben wurden mit Methanol bei -80°C gefriersubstituiert und bei -40°C in Lowicryl HM20 unter UV-Licht eingebettet, wobei die *CS auto* Kryosubstitutionseinheit (Reichert-Jung, Wien, Österreich) benutzt wurde. Von diesen Proben wurden serielle Schnitte präpariert. Für die Immunmarkierung wurden Lowicryl HM20 Schnitte von ruhenden und aktivierten Plättchen auf Nickel-Gittern mit dem primären polyklonalen anti-CLP-36 Ig inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Gitter mit dem gold-markierten sekundären Antikörper (Ziege anti-Kaninchen Ig, GAR EM 10 nm, Aurion, Wageningen, Niederlande) inkubiert. Die Schnitte wurden mit Uranyl-Acetat und

Blei-Citrat gefärbt und mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht.

Computer-animierte 3D-Rekonstruktion serieller elektronenmikroskopischer Schnitte

Um einen besseren Einblick in die räumlichen Beziehungen zwischen den Plättchen, dem Zytoskelett und der Verteilung der Goldmarkierungen zu erhalten, wurden Modelle nach einer Technik nach Bogusch und Dierichs (Bogusch und Dierichs, 1995) konstruiert, wobei die software *BioModel* benutzt wurde (geschrieben von R. Dierichs, Münster). Charakteristische, repräsentative Regionen wurden für diese Rekonstruktionen ausgewählt. Die strukturellen Elemente (Plasmamembran, zytoskelettale Elemente) und die Goldmarkierungen wurden mit dem *Wacom input* System digitalisiert.

3.14 Mikroinjektion von Antikörper

Mikroinjektionspuffer	50 mM	Tris/pH 7,4
	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂

Affinitätsgereinigter Anti-CLP-36 Antikörper (s.3.7.2) wurde ÜN gegen Mikroinjektionspuffer dialysiert und vor der Mikroinjektion für 15 min. bei 15000 g zentrifugiert. Phemtoliter-Mengen der Antikörperlösung (2,5 mg/ml) wurden mit einem Eppendorf-Transjektor 5246 und einem Eppendorf-Mikromanipulator 5171 in Endothel-Zellen mikroinjiziert. Um die Spezifität eines Effekts beurteilen zu können, wurden Kontrollzellen mit Präimmenserum (Ig-Fraktion) derselben Konzentration injiziert. Die Zellen wurden für 2-5 h mit dem Antikörper inkubiert und anschließend fixiert. Der mikroinjizierte Antikörper wurde durch fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper nachgewiesen, das F-Aktin wurde mit Phalloidin-Rhodamin visualisiert (analog zu 3.13.4). Ca. 40 injizierte Zellen wurden untersucht.

3.15 Rekombinante Expression und Reinigung der Polyhistidin- und GST-Fusionsproteine

3.15.1 Expression in E.coli und Proteinextraktion

Für Immuno*Pull-down*-, GST-*Pull-down* und *Blot-Overlay*-Experimente sowie viskoelastische Messungen wurde rekombinantes CLP-36 benötigt. Dafür wurden die CLP-36-DNA oder einzelne CLP-36-DNA-Domänen rekombinant mit GST (Glutathion-S-Transferase) oder Polyhistidin(“his-tag“) fusioniert, da diese “tags“ die Möglichkeit einer schnellen Aufreinigung der Proteine durch Glutathion- bzw. Ni-NTA-Affinitätschromatographie bieten.

Um GST-Fusionsproteine zu erhalten, wurden die DNA-Sequenzen von CLP-36, CLP-36_{AS 1-256} und CLP-36_{AS 257-329} in den Vektor pGEX kloniert. Für die Proteinexpression wurden drei verschiedene *E. coli*-Stämme (BL21, NM322, XL1 blue) getestet, die jeweils bei zwei verschiedenen Temperaturen (30°C und 37°C) Protein exprimierten. Unabhängig vom verwen-

Material und Methoden

deten Stamm und der Temperatur konnte nur GST-CLP-36_{AS 257-329} exprimiert werden. Die anderen Fusionsproteine wurden offenbar unvollständig exprimiert und/oder in der Zelle degradiert. GST-CLP-36_{AS 257-329} wurde über Glutathion-Affinitätschromatographie gereinigt nach einem Standardprotokoll (s. Handbuch von Qiagen). Klonierung, Expression und Reinigung des GST-Fusionsproteins wurden von Dr. Marcus Otte durchgeführt.

Da CLP-36 und CLP-36_{AS 1-256} als GST-Fusionsproteine nicht exprimiert wurden, wurden diese und zusätzlich CLP-36_{AS 257-329} als Polyhistidin-Fusionsproteine in *E. coli M15* kloniert (s. 3.21.7) und exprimiert (wie folgt). Auf diese Weise konnten His-CLP-36, His-CLP-36_{AS 1-256} und His-CLP-36_{AS 257-329} als *full-length*-Proteine erhalten werden. His-CLP-36_{AS 257-329} wurde nur über Ni-NTA-Agarose gereinigt, da dieses Protein nur im Immunopull-down eingesetzt wurde: während des Immunpull-downs wird His-CLP-36_{AS 257-329} durch Antikörper, die gegen den Polyhistidin-tag gerichtet sind, spezifisch präzipitiert, wobei theoretisch die kontaminierenden Proteine aus *E. coli* entfernt werden sollten (s. 3.13.3).

His-CLP-36 und His-CLP-36_{AS 1-256} wurden im Anschluß an die Ni-NTA-Agarose weiter über Gelfiltration und Anionen-Austauschchromatographie gereinigt wie im folgenden beschrieben. **Material:**

- Ultraschallgerät Labsonic (B.Braun)

Lyse-Puffer.....	Lysozym (Muramidase).....	0.2 mg/ml
	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0.....	0.1 M
	Tris, pH 8.0.....	10 mM
	Phosphataseinhibitor-Tabletten.....	
	2 Stk./10 ml	
	RNase.....	10 µg/ml
	DNase I.....	5 µg/ml

Die Klonierung der CLP-36-DNA in den Vektor pQE-30 ist unter 3.21.7 beschrieben.

Die Plasmide wurden durch Elektroporation (s.3.21.6) in *E.coli* M15 transformiert und die Zellen auf selektiven LB-amp-kan Platten ausgestrichen (s.3.21.3).

Für die rekombinante Expression des His-Tag-Fusionsproteins wurden 50 ml LB-amp Medium mit einer *E.coli* Kolonie beimpft und ÜN in LB-amp-kan Medium angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 1:50 4×500 ml LB-Medium beimpft und bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Die Protein-Expression wurde bei einer OD(600) von 0.64 induziert durch Zugabe von 2 mM IPTG (s.3.21.3). Nach der Induktion wurden die Zellen 12 h bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden in einer Erntezentrifuge pelletiert (3000 g, 25 min., 4°C) und bei -70°C zwischengelagert.

Die Zellen wurden auf Eis in 10 ml Lysepuffer resuspendiert und 30 min. bei 4°C inkubiert. Um die Lyse zu vervollständigen, wurden sie danach 3 × 30 sec. mit Ultraschall behandelt (Einstellungen: power level 89, low). Eine gelb-graue Färbung des Extrakts zeigte die erfolgte Lyse an. Der Zelleextrakt wurde 30 min. bei 10000 g und 4°C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand abgenommen.

3.15.2 Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose

Eine Säule mit 2 ml Ni-NTA Agarose wurde mit 10 Vol. Auftragspuffer äquilibriert und der Proteinrohextrakt (s.o.) aufgetragen. Die Ni-NTA Matrix wurde aufgeschwemmt und 10 min. mit dem Protein inkubiert. Die His-Reste binden über einen stabilen Metall-Chelat-Komplex mit hoher Affinität an die Ni-NTA Matrix. Nichtbindende Proteine im Durchlauf wurden abgefangen und die Säule sukzessive mit je 10 Vol. Waschpuffer pH 6.0 und Waschpuffer pH 5.0 gewaschen. Das *His-tag*-Fusionsproteine wurden eluiert durch Zugabe von Elutionspuffer in 1 ml Fraktionen. Durch den sauren pH werden die sechs His-Reste im *His-tag* protoniert, was die Bindung von Ni²⁺ verhindert und eine Loslösung von der Ni-NTA-Agarose bewirkt. Das Imidazol im Elutionspuffer verdrängt kompetitiv den *his-tag* und trägt damit ebenfalls zur Elution bei. Dies bewirkt die Elution in einem sehr kleinen Volumen, ideal für die anschließende Aufreinigung über eine Gelfiltrationssäule. Die Fraktionen 3 und 4 enthielten max. Mengen an His-tag-Fusionsprotein und wurden zu einem Pool vereinigt (15 mg Protein/2l Bakterienkultur). Das Eluat wurde anschließend im SDS-Polyacrylamid-Gel überprüft.

Material:

- Ni-NTA-Agarose, Bindekapazität: 5-10 mg His-Tag Protein / ml Agarose (Qiagen)

Auftragspuffer	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7.4.....	0.1 M
	Tris, pH 7.4.....	10 mM
Waschpuffer pH 6.0.....	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl.....	300 mM
	Glycerin.....	10 %
Waschpuffer pH 5.0.....	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl.....	300 mM
	Glycerin.....	10 %
Elutionspuffer pH 4.0.....	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl.....	300 mM
	Glycerin.....	10 %
	Imidazol	250 mM

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

3.15.3 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Moleküle nach ihrem Molekulargewicht bzw. ihrer Größe (Stoke'scher Radius) getrennt. Kleine Proteine haben eine durchschnittlich längere Verweildauer in den porösen Gelfiltrationsmedien und bleiben daher länger auf der Säule.

Der Protein-Pool aus der Ni-NTA-Agarose-Chromatographie (s. 3.15.2) wurde ÜN bei 4°C gegen IEDAN-BP-Puffer dialysiert. Da noch Glycerin in der Probe verblieben war und dies bei der Gelfiltration stört, wurde die Proteinlösung zunächst über eine PD-10 Säule um-

Material und Methoden

gepuffert. Eine Glassäule mit 3 cm Innendurchmesser und 150 cm Höhe wurde mit 580 ml Sephadex-Medium bepackt und mit IEDAN-BP-Puffer äquilibriert. Die Chromatographie wurde im Kühlraum durchgeführt. Die Proteinlösung (3 ml) wurde 10 min. bei 10000 g und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen und auf die Säule aufgetragen. Die Laufgeschwindigkeit des Puffers wurde durch eine geeignet hohe Aufhängung der Säule auf 4 cm/h eingestellt. Die ersten 180 ml Leervolumen wurden verworfen, der Rest in 100 Fraktionen zu je 4 ml aufgefangen. Die Analyse der Fraktionen im SDS-Polyacrylamid-Gel zeigte, daß in den Fraktionen 29-34 das His-CLP-36 eluierte; die Fraktionen 35-40 enthielten His-CLP-36_{AS 1-256}. Im Coomassie-Blau-gefärbtem Gel konnten fast keine kontaminierenden Proteine mehr detektiert werden. Die Fraktionen 29-34 und 35-40 wurden zu zwei Protein-Pools zusammengefasst.

Material:

- Dialysekassetten Slide-A-Lyser, MWCO 10000 kDa (Pierce)
- PD-10 Entsalzungssäulen (Biorad)

IEDAN-BP-Puffer, pH 7.6	Imidazol/HCl	10 mM
	DTT	1 mM
	EGTA	1 mM
	NaCl	0.2 M
	Na-Azid	0.02 %
	frisch zugeben:	
	Benzamidin	1 mM
	PMSF	0.5 mM

3.15.4 Anionenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Sepharose

Startpuffer (TEDA-BP)	Tris, pH 8.0	10 mM
	DTT	1 mM
	EGTA	1 mM
	Benzamidin	1 mM
	PMSF	0.5 mM
	Na-Azid	0.02 %

Endpuffer: Startpuffer + 500 mM NaCl

Um die Protein-Pools aus 4.19 auf ein kleineres Volumen einzuengen und weiter aufzureinigen, wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Sepharose durchgeführt. Trennkriterium ist die Ladung des Proteins. Als Gegenion diente Cl⁻ im Puffer B. Die Chromatographie wurde im Kühlraum durchgeführt.

5 ml DEAE (Diethylaminoethan)-Sepharose wurden in eine Säule gepackt und mit Startpuffer äquilibriert. Das Protein wurde aufgetragen und im Gradientenmischer ein Gradient aus Start- und Endpuffer mit ansteigender Ionenstärke erzeugt. Es wurden je 50 ml Start-

und Endpuffer vorgelegt und 60 Fraktionen zu je 2 ml gesammelt. Das His-CLP-36 eluierte mit einem peak in den Fraktionen 4-7, die zu einem Pool vereinigt und mit *Centriprep* 10 Einwegkonzentratoren (Amicon) auf ein Volumen von 3.5 ml mit einer Konzentration von 0.31 mg/ml eingengt wurden. His-CLP-36_{AS 1-256} eluierte in den Fraktionen 11-14; diese Fraktionen wurden vereinigt und ebenfalls eingengt (0.18 mg/ml in 1.5 ml). Beide Konzentrate wurden aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Das Silbergel in Abb. 4.22 zeigt His-CLP-36 und His-CLP-36_{AS 1-256} nach der kompletten Aufreinigung. His-CLP-36_{AS 1-256} scheint vollständig homogen zu sein, während in der His-CLP-36-Präparation ein Fragment von His-CLP-36 zurückblieb, das während der Reinigung nicht vollständig entfernt werden konnte.

3.16 Untersuchung der Phosphorylierung von CLP-36

3.16.1 Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung

Zur Untersuchung der Proteinkinase A-abhängigen Phosphorylierung wurden die Plättchen mit [³²P]-Orthophosphat markiert und anschließend mit Iloprost inkubiert wie folgt. Iloprost ist ein Prostacyclin-Analog, das zur cAMP-vermittelten Inhibierung der Plättchenfunktion und zur Aktibierung der Proteinkinase A führt (s. 3.16.1).

Das Plättchenpellet von 40 ml PRP wurde in 2 ml vorgewärmten Resuspensionspuffer A (s.u.) resuspendiert, der 3 U/ml Apyrase und 10% autologes Plättchen-armes Plasma (PPP) enthielt. Das PPP erhielt man, indem man PRP 3 min in einer Mikrozentrifuge bei 4°C mit 15000 g zentrifugierte. Die Plättchensuspension wurde mit 5 mCi [³²P]-Orthophosphat für 90 min. bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert, anschließend in 20 ml Resuspensionspuffer B verdünnt. Die Plättchen wurden bei 800 g (RT, 20 min.) pelletiert und schließlich in 12 ml Resuspensionspuffer C aufgenommen, der zusätzlich 10 µM CaCl₂, 10 mg/ml BSA, 5 mM Glukose und 0,3 U/ml Apyrase enthielt. Nach einer Inkubation bei RT für 45 min. wurden die Plättchen 10 min. auf 37°C vorgewärmt und anschließend in 1,5 ml-Reagenzgefäßen jeweils 500 µl Plättchensuspension mit dem stabilen Prostazyklin-Analagon Iloprost (1 µM) inkubiert (37°C, 5 min.). Die durch Iloprost vermittelte Wirkung wurde durch Zugabe desselben Volumens eiskalten 2×Lysepuffer I (s. oben) abgestoppt. Der Lysepuffer enthielt außer Na₃VO₄ (2 mM) die Phosphataseinhibitoren NaF (10 mM) und Na₄P₂O₇ (Natrium-pyrophosphat) (4 mM) und war anstatt mit Hepes mit 100 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4) gepuffert. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert bis zur Durchführung der Immunpräzipitation (siehe 3.13.2). Die Autoradiographie der Western-Blot Membranen wurde mit einem PhosphoImager Storm 840 von Molecular Dynamics aufgenommen.

Resuspensionspuffer B und C s.3.6

Resuspensionspuffer A	20 mM	Hepes/pH 7.4
	138 mM	NaCl
	2,9 mM	KCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	EGTA

3.16.2 Detektion der Serinphosphorylierung im Immunoblot

Die Serinphosphorylierung von CLP-36 wurde in ruhenden Plättchen, mit Thrombin aktivierten Plättchen und mit Iloprost behandelten Plättchen analysiert.

Thrombin führt in der verwendeten Konzentration zur vollständigen Aktivierung der Plättchen, begleitet von Gestaltwandel, Sekretion und Aggregation. Gestaltwandel und Aggregation wurden am Aggregometer durch Kontrolle der Lichttransmission überprüft.

Durch Untersuchung der Phosphorylierung von CLP-36 in diesen Plättchen sollte kontrolliert werden, ob CLP-36 durch Proteinkinasen oder -Phosphatasen reguliert wird und ob die Phosphorylierung von CLP-36 mit einer Aktivierung oder Inaktivierung der Plättchenfunktion in Zusammenhang steht.

Hierfür wurden Plättchen isoliert wie beschrieben (s. 3.6) und anschließend mit Thrombin (1U Thrombin / ml Plättchensuspension) oder Iloprost (1 μ M Iloprost) inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 10, 30, 45, 60 und 120 Sekunden und wurde dann mit Lysepuffer abgestoppt (s. 3.6). Die Anti-CLP-Immünpräzipitation erfolgte nach 3.13.2. Die Präzipitate wurde anschließend durchh SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet (s. 3.10 und 3.13.1). Die Detektion der Serinphosphorylierung erfolgte immunologisch durch Inkubation des Blots mit monoklonalem Anti-Phosphoserin-Antikörper (s. 3.3).

3.16.3 Phosphorylierungs-Assay mit den LIM-Kinasen I und II

Da CLP-36 einen Großteil der Erkennungssequenz für die Phosphorylierung durch die LIM-Kinase I enthält, sollte untersucht werden, ob CLP-36 ein Substrat der LIM-Kinasen I und II ist. Die Versuche wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Kensako Mizuno durchgeführt (Kyushu Universität, Japan).

Dieser Assay erfolgte *in vitro*. COS-7 Zellen, die die rekombinanten LIM-Kinasen I und II überexprimierten wurden lysiert und in Anwesenheit von [γ -³²P] ATP mit dem rekombinanten His-CLP-36 und His-CLP-36_{AS1-256} inkubiert (je 0,2 mg/ml). Als Negativkontrolle wurde der Vektor pUCD2 (mock) oder eine Kinasedefekt-Mutante eingesetzt. Als Positivkontrolle diente das LIM-Kinase-Substrat Cofilin. Neben dem rekombinanten CLP-36 wurde auch Plättchenlysat (0,1 mg/ml) mit der LIM-Kinase I inkubiert. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte durch Autoradiographie.

3.17 Affinitätsblotting: Blot-overlay assay

Diese Methode dient dem *in vitro*-Nachweis von Protein/Protein-Wechselwirkungen auf einer Westernblot-Membran. Sie wurde durchgeführt, um in geblottetem Plättchenlysat Proteine zu detektieren, die mit His-CLP-36 oder GST-CLP-36_{AS257-329} interagieren. Hierfür wurden His-CLP-36 und GST-LIM biotinyliert und als Sonde zur Suche nach CLP-36 bindender Proteine in Plättchenlysaten eingesetzt. Die biotinylierten Proteine wurden über Komplexbildung mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase detektiert.

Material:

- Dialyseschläuche, 18 mm breit, MW-Ausschluß 12-14 kDa (Visking)
- N-(+)-Biotinyl-6-amino-capronsäure-N-succinimidylester, 50 µg/µl (Fluka)
- Extravidin-Peroxidase (Sigma)
- Reaktionspuffer: 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4
- Overlay-Puffer: TBST-Puffer + 0.5 % Trockenmilchpulver (s.3.13.1)

Biotinylierung der CLP-36 Konstrukte:

(nach Kincaid und Vaughan, 1988)

0.75 mg 6×His-CLP-36, 0.5 mg GST-LIM und 1.1 mg GST wurden bei 4°C 3 × 7 h gegen jeweils 2 l Reaktionspuffer dialysiert. Anschließend wurde die 16-fache molare Menge Biotinylester dazugegeben und die Kopplung 2 h bei 4°C durchgeführt. Überschüssiger Biotinylester wurde durch Dialyse gegen Reaktionspuffer entfernt (3 × 8 h, je 2 l). Zur Kontrolle der Derivatisierung wurde ein Aliquot Protein über SDS-PAGE (s.3.10) aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (s.3.13.1) und mit Extravidin-Peroxidase inkubiert. Ein sehr starkes Chemilumineszenz-Signal auf der Höhe des entsprechenden Molekulargewichts zeigte, daß die Proteine biotinyliert worden waren. Das Protein wurde bei -20°C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurde biotinyliertes Protein in 20 % Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Blot-overlay assay:

Suspensionen (150 µl) gewaschener Thrombozyten (1 Mio./µl), entweder ruhend oder mit Thrombin aktiviert (0.5 U/ml, 30 sec, gerührt), wurden in kochendem Laemmli-Puffer lysiert, über SDS-PAGE aufgetrennt (s.3.10) und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (s.3.13.1). Die Membran wurde ÜN bei 4°C mit Blocking-Puffer (TBST-Puffer, 3 % Magermilchpulver) abgesättigt und anschließend 4 h bei RT mit 15 ml Overlay-Puffer, der 100 ng/ml biotinyliertes Protein enthielt, inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM DTT in den Overlay-Puffer konnten unspezifische Interaktionen mit den biotinylierten Proteinen deutlich reduziert werden. Der Overlay-Puffer enthält das nichtionische Detergenz Tween 20 in einer Konzentration, die nicht mit der spezifischen Bindungsaktivität von Proteinen interferiert. Die Membran wurde 3 × 10 min. mit Overlay-Puffer gewaschen und für 1 h bei RT

mit Extravidin-Peroxidase (1:10 000) inkubiert. Das Enzym wurde mit Overlay-Puffer abgewaschen (3×10 min.) und die Membran 5 min. mit Chemilumineszenz-Substrat inkubiert. Anschließend wurde die Membran dem ECL-Film exponiert. (s. 3.13.1)

3.18 Yeast two-hybrid Assay

Das two-hybrid System ist eine genetische Methode, die die Transkription eines Reportergens als Maßstab für Protein/Protein-Interaktion benutzt. Dem System zugrunde liegt der modulare Aufbau vieler Transkriptionsfaktoren. Das hier verwendete System basiert auf dem eukaryotischen Transkriptionsfaktor Gal4, der nativ in der Hefe den Galaktose-Metabolismus reguliert. Gal4 besteht aus einer DNA-bindenden Domäne und einer die Transkription aktivierenden Domäne. Die DNA-bindende Domäne bindet an eine spezifische Upstream-Aktivatorsequenz, und ermöglicht so der aktivierenden Domäne, *cis*-aktiv Kontakt mit dem basalen Transkriptionsapparat aufzunehmen und die Transkription auszulösen. Im two-hybrid System werden zwei Hybride konstruiert: Ein Protein X wird fusioniert mit der DNA-bindenden Domäne (DNA-BD, „bait“-Plasmid) des Transkriptionsfaktors Gal4, ein Protein Y mit der DNA-aktivierenden Domäne (DNA-AD, „prey“-Plasmid) von Gal4. Wenn die Proteine X und Y interagieren entsteht ein funktioneller Aktivator, da die DNA-bindende Domäne in räumliche Nähe zur aktivierenden Domäne gebracht wird. Binden die Proteine X und Y nicht aneinander, so wird keine Transkription ausgelöst, da die DNA-Bindungsdomäne kein Aktivierungspotential besitzt und die Aktivierungsdomäne nicht in der Nähe des Reportergens gebunden ist. Die Hybridkonstrukte werden auf selektierbaren Plasmiden in die Hefe eingebracht und exprimiert.

Die hier verwendeten Hefestämme besaßen als Reportergene *HIS3* und *LacZ*, vor die die Upstream-Aktivatorsequenz des GAL1-Gens geschaltet war. Die aktivierbare Transkription des *LacZ*-Gens wurde über einen β -Galactosidase Assay gemessen, bei dem X-Gal als Substrat eingesetzt wurde. Die Plasmide und Hefestämme stammten aus dem MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 von Clontech. Die Arbeitsprotokolle glichen weitgehend denen im mitgelieferten Handbuch. Nach vergleichenden Versuchen mit den *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen HF7c, CG-1945 und Y190, wurde ausschließlich der Stamm Y190 benutzt, da er mit den Kontrollplasmiden für eine positive Interaktion die höchste X-Gal Expression zeigte. In jedem der Stämme war das negative Kontrollplasmid im X-Gal Assay negativ. Y190 besitzt den nativen *HIS3* Promotor, der eine signifikante konstitutive („leaky“) Expression des Reportergens *HIS3* bewirkt. Durch Zugabe von 30 mM 3-Amino-1,2,4-triazol, einem kompetitiven Inhibitor des *HIS3* Proteins, ließ sich das konstitutiv exprimierte *HIS3* inhibieren. Die Menge des Inhibitors wurde so gewählt, daß grössere Mengen an *HIS3*-Protein, wie sie nach einer Aktivierung des *HIS3*-Gens durch eine positive two-hybrid Interaktion gebildet werden, nicht inhibiert werden und daher die Selektion positiver Klone auf *HIS*⁻-Medium möglich war.

Material:

Stamm:	Genotyp	Reporter	Referenzen
Y190	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>cyh^r 2</i> , <i>LYS::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-His3</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	<i>HIS3</i> , <i>lacZ</i>	Harper et al., 1993; . Flick & Johnston, 1990

Vektoren:	Beschreibung	Selectionsmarker	Größe (kb)	Referenzen
pAS2-1 (bait)	<i>GAL4</i> ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, <i>TRP1</i> ,amp ^r , <i>CYH^s 2</i>	Trp1	8.4	Harper et al.,1993
pACT2 (prey)	<i>GAL4</i> ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, <i>Leu2</i> ,amp ^r , HA epitop tag	Leu2	8.1	Li et al.,1994; Elledge, Clontech

- pVA3-1: pAS2-1 Vektor, in dem die DNA-BD mit dem murinem p53 fusioniert ist
 - pTD1-1: pACT2 Vektor, in dem die DNA-AD mit dem SV40 large T-antigen fusioniert ist
 pVA3-1 und pTD1 werden als Kontrollplasmide für eine positive Interaktion verwendet.

- pCL1: Positivkontroll-Plasmid mit wild-type full-length *GAL4*
- pLAM5'-1: pAS2-1 mit humanem Lamin C, Negativkontroll-Plasmid

Die Multiple Cloning Site der Plasmide pACT2 und pAS2-1 ist so lokalisiert, daß die inserierte cDNA am C-terminalen Ende mit der aktivierenden bzw. DNA-bindenden Domäne fusioniert wird.

YPD-Medium: 20 g/l Difco Pepton
 10 g/l Hefeextrakt
 20 g/l Agar (nur für Platten)

pH auf 5.8 einstellen, Medium autoklavieren (121°C, 15 min.), auf ca. 55°C abkühlen und Glukose 2%ig zufügen (50 ml pro l aus einer sterilen 40% Stammlösung).

SD-Medium: 6.7 g yeast nitrogen base without aminoacids
 20 g Agar (nur für Platten)
 850 ml H₂O
 100 ml entsprechende sterile 10 × dropout Lösung

pH auf 5.8 einstellen, autoklavieren. Falls angegeben, wurde 30mM 3-AT aus einer sterilen 1M Stammlösung in das auf 55°C abgekühlte Medium zugegeben.

Material und Methoden

10 × Dropout Supplemente: (Sigma)	L-Leucin	1000 mg/l
	L-Tryptophan	200 mg/l
	L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/l

Die entsprechenden Aminosäuren werden dem SD-Medium 1:10 verdünnt zugegeben. 10 × Dropout Supplemente können autoklaviert werden und können bei 4°C bis zu 1 Jahr gelagert werden.

- 145×20 mm Petrischalen (Greiner)

Durchführung des Screenings:

Das Yeast two-hybrid System wurde hier eingesetzt, um die Wechselwirkung zwischen α -Aktinin 1 und CLP-36 zu verifizieren und zu kartieren. Dafür wurde Y190 mit den zu testenden „bait“- und „prey“-Plasmiden cotransformiert. Das „bait“-Plasmid kann die Trp-Deletion, das „prey“-Plasmid die Leu-Deletion des Hefestammes komplementieren. Die transformierten Zellen wurden auf SD-Medium plattiert, das kein Leucin und Tryptophan enthielt (LEU^-TRP^- -SD-Medium), also beide Plasmide positiv selektionierte. Die Kolonien wurden über den β -Galaktosidase Assay (s.3.18.3) auf eine two-hybrid Interaktion getestet. Positive und negative two-hybrid Interaktionen wurden durch Ausplattieren auf $LEU^-TRP^-HIS^-$ -SD-medium (+ 30 mM 3-AT) verifiziert, auf dem die Zellen nur bei einer Aktivierung des HIS3 Reportergens, also im Falle einer positiven Interaktion, wachsen.

3.18.1 Klonierung der Plasmide

CLP-36/DNA-BD Hybride:

Die aus HEL-Zellen klonierte *CLP-36* cDNA (s.3.15.1) wurde über PCR mit sequenzspezifischen Primern (s. 3.21.11) amplifiziert, die die Schnittstellen *Cla I* und *Hind III* für die Subklonierung in den „bait“-Vektor pAS2-1 enthielten. (s. 3.21) Folgende *CLP-36*-Konstrukte wurden mit dem Vektor ligiert:

- full-length CLP-36 (AS 1-329)
- die N-terminalen CLP-36 Fragmente AS 1-82 (PDZ-Domäne), 1-104, 1-127 und 1-256
- die C-terminale LIM-Domäne (AS 257-329).

α -Aktinin-1/DNA-AD Hybride:

Die α -Aktinin 1 cDNA wurde über PCR mit den Primern MO 15 und MO 16 (s.3.21.11) aus einer Endothelzell-cDNA Bank amplifiziert. Die Subamplifikate für die Insertion in den „prey“-Vektor pACT2 enthielten die endständigen Klonierungs-Schnittstellen *Xho I* und *Eco RI*, mit denen auch der Vektor geschnitten wurde. (s.3.21). Für die Subamplifikation wurden die unter 3.21.11 angegebenen Primer verwendet. Folgende α -Aktinin Konstrukte wurden an die DNA-aktivierende Domäne fusioniert:

- full-length α -Aktinin 1 (AS 1-892, MW 103kDa)
- Spectrin-repeat 1 (AS 245-363)
- Spectrin-repeats 1-2 (AS 245-478)

- Spectrin-repeats 1-3 (AS 245-599)
- Spectrin-repeats 1-4 (AS 245-712)
- Spectrin-repeats 2-3 (AS 364-599)
- Spectrin-repeat 3 (AS 479-599).

3.18.2 Lithium-acetat Transformation

- **Stammlösungen:**

- **50 % PEG 4000** (Polyethylenglycol, avg. mol. wt.=3350), filter-sterilisiert.
- **100 % DMSO** (Dimethylsulfoxid)
- **10 × TE-Puffer:** 0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5, autoklaviert.
- **10 × LiAc:** 1 M Lithium-acetat, pH 7.5 mit verdünnter Essigsäure einstellen.
- **PEG/LiAc-Lösung:** 40 % PEG 4000, 1 × TE-Puffer, 1 × LiAc.

- Herring Testes Carrier DNA, denaturiert, geschert (Clontech)
- Glasperlen, säure-gewaschen, 710-1180 μm Größe (Sigma)

Die Lithium-Acetat (LiAc) Methode basiert darauf, daß alkalische Kationen Hefezellen kompetent für die Aufnahme von DNA machen (Ito et al, 1983). Polyethylenglykol (PEG) und Erhitzen auf 42°C triggern die DNA-Aufnahme. Das Hinzufügen von carrier-DNA erhöht die Transformations-Effizienz um 1-2 Größenordnungen.

Die Hefezellkultur und Transformation wurden entsprechend der Anleitung im Clontech-Handbuch durchgeführt. Die Zellkultur erfolgte im (Schüttel-)Inkubator (250 rpm) bei 30°C.

Herstellung kompetenter Zellen:

Ein Aliquot Y190-Zellen wurden aus dem Glycerin-stock (25 % Glycerin, -70°C) entnommen und auf eine YPD-Agar-Platte ausgestrichen. Die Zellen wurden bei 30°C 3-5 Tage inkubiert, bis die Kolonien eine Größe von ca. 2 mm erreicht hatten. Die Platten wurden bei 4°C gelagert und bis zu 3 Monate als Stammlatte zum Abimpfen von Kolonien verwendet.

Einige Kolonien wurden in 50 ml YPD-Medium überimpft und 16-18 h bis zur stationären Phase inkubiert ($\text{OD}_{600} \geq 1.5$). Mit dieser Vorkultur wurden 150 ml YPD-Medium (ausreichend für mind. 10 Transformationsansätze) beimpft, bis die OD_{600} 0.2-0.3 betrug. Die Zellen wurden 3 h geschüttelt bis zu einer OD_{600} von 0.4-0.6 und anschließend in 50 ml Falcon-Gefäßen geerntet (1000 g, 5 min., RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen durch Vortexen in 40 ml sterilem H_2O bidest resuspendiert. Die Zellen wurden vereinigt, in einem 250 ml Erntebecher pelletiert (1000 g, 5 min., RT) und in 0.75 ml frisch präpariertem, sterilem 1 × TE/LiAc aufgenommen.

Transformation

„bait“- und „prey“-Plasmid wurden kotransformiert. Dafür wurden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß je 0.1 μg -Plasmid mit 0.1 mg textitHerring testes carrier DNA vermischt. 0.1 ml kompetente Hefezellen wurden zugegeben und durch Vortexen eingemischt. Anschließend

Material und Methoden

wurden 0.6 ml PEG/LiAc Lösung zupipettiert und durch Vortexen für 10 sec. gemischt. Der Ansatz wurde bei 30°C für 30 min. im Thermomixer (200 rpm) geschüttelt. 70 μ l DMSO, das als "Carrier" diente, wurden zugegeben und durch mehrmaliges Kippen eingemischt. Anschließend wurde der Hitzeschock im 42°C Wasserbad für 15 min. durchgeführt. Die Zellen wurden für 1-2 min. auf Eis abgekühlt für 5 sec. bei 14000 g abzentrifugiert und in 0.5 ml sterilem 1 \times TE-Puffer resuspendiert. Die transformierten Zellen wurden mithilfe von Glasperlen auf einer 145 \times 20 mm Kulturschale mit 50 ml *LEU⁻TRP⁻*-SD-Agar verteilt. Die Platte wurde umgedreht, die Glasperlen auf die Deckelinnenseite geklopft und der Ansatz bei 30°C für 3-4 Tage inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von 1-3 mm erreicht hatten.

3.18.3 β -Galaktosidase Assay

Z-Puffer:

16.1 g/l	Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O
5.5 g/l	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O
0.75 g/l	KCl
0.246 g/l	MgSO ₄ ·7 H ₂ O

X-Gal Stammlösung:

X-Gal wird in DMF auf 20 mg/ml verdünnt und im Dunkeln bei -20°C gelagert.

Z-Puffer/X-Gal Lösung:

100 ml	Z-Puffer
0.27 ml	β -mercaptoethanol
1.67 ml	X-Gal Stammlösung

Für ein qualitatives Blau/Weiß-Screening wurde der β -Galaktosidase Filter-Assay durchgeführt (s. Clontech-Handbuch).

Die auf *LEU⁻TRP⁻*-SD-Agar gewachsene Kolonien aus dem Transformationsansatz von 3.18.2, darunter auch die Kontrollen mit positiven und negativen two-hybrid Interaktionen (s. S. 47), wurden vor der Durchführung des Assays für mind. 2 h bei 30°C inkubiert. Je 5 ml frisch präparierte Z-Puffer/X-Gal Lösung wurden in eine 145 mm Petrischale vorgelegt und ein auf 140 mm zugeschnittene Whatman-Rundfilter darin eingelegt. Ein zweites, autoklaviertes Whatman-Filterpapier wurde unter einer sterilen Arbeitsbank auf die Platte mit den Kolonien aufgelegt und die Kolonien durch sanftes Andrücken auf den Filter übertragen. Der Filter wurde mit einer stumpfen Pinzette abgenommen und für 10 sec. in eine Wanne mit flüssigem Stickstoff eingetaucht. Der komplett gefrorene Filter wurde bei RT aufgetaut, was zur Permeabilisierung der Hefezellen führte, und anschließend mit den Kolonien nach oben luftblasenfrei auf den mit Z-Puffer/X-Gal vollgesaugten Filter gelegt. Die Petrischale mit den Filtern wurde geschützt vor Verdunstung abgedeckt und bei RT inkubiert. Die Filter wurden in regelmäßigen Zeitabständen auf das Erscheinen blauer Kolonien untersucht.

3.18.4 Präparation von Hefeprotein-Extrakten

Material:

- Cracking-Puffer Stammlösung:

Urea	8 M
SDS	5 % w/v
Tris-HCl (ph 6.8)	40 mM
EDTA	0.1 mM
Bromphenol Blau	0.4 mg/ml

- Cracking Puffer (ausreichend für eine Proteinextraktion):

Cracking-Puffer Stammlösung	1 ml
β -Mercaptoethanol	10 μ l
Protease-Inhibitor Cocktail	1 Tablette/2ml

Um die full-length Expression der Hybridproteine zu überprüfen, wurden Proteinextrakte hergestellt, diese über SDS-PAGE aufgetrennt und am Western Blot die Expression überprüft.

5 ml selektives SD-Medium wurden mit einer einer oder mehreren (falls die Kolonien phänotypisch unterschiedlich waren) Kolonien beimpft und ÜN bei 30°C im Schüttelinkubator angezogen. Als Hintergrund-Kontrolle wurden Zellen ohne Plasmid in YPD kultiviert. Mit der gesamten ÜN-Kultur wurden 50ml YPD- bzw. selektives SD-Medium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4-0.6 bebrütet. Die Kultur wurde auf zwei zur Hälfte mit Eis gefüllte 50ml Falcons verteilt und bei 1000 g und 4°C 5 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem sterilen Wasser resuspendiert und die Zellen erneut bei 1000 g und 4°C 5 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei -70°C zwischengelagert, wenn die Proteinextraktion nicht sofort erfolgte.

Proteinextraktion:

Die Zellen wurden durch Zugabe von 100 μ l auf 60°C vorgewärmten Cracking-Puffer pro 7.5 OD₆₀₀ Units Zellen (Unit = OD₆₀₀ x Kulturvol. (ml)) aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 1.5 ml Schraubdeckel-Gefäß gegeben, das 80 μ l Glasperlen pro 7.5 OD₆₀₀ Units Zellen enthält und für 10 min. auf 70°C erwärmt. Die Probe wurde 1 min. intensiv gevortext. Zelltrümmer und intakte Zellen wurden bei 15000 g für 5 min. bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde auf Eis gelagert, das Pellet in einem 95°C Heizblock 5 min. erhitzt und 1 min. gevortext und bei 15000 g, 4°C für 5 min. erneut zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und kurz auf 95°C erhitzt. Zur Analyse der Proteinexpression wurde das

Proteinextrakt über SDS-PAGE (3.10) aufgetrennt, geblottet und das rekombinante Protein immunodetektiert (s. 3.13.1).

3.19 Viskoelastische Messungen an Aktinnetzwerken

Zellbiologische Daten lassen Rückschlüsse auf die Lokalisation, Regulation und *in vivo*-Funktion einzelner Proteine zu. Über biochemische und physikalisch-chemische Versuche kann die Dissoziationskonstante und Kinetik einer Proteininteraktion bestimmt werden. Für ein erweitertes Verständnis von Aktinnetzwerken in der Zelle sind zusätzlich zu zellbiologischen und biochemischen Daten Kenntnisse der Materialeigenschaften von Aktinfilamenten nötig. F-Aktin ist ein semiflexibles Polymer. Lösungen aus F-Aktin besitzen sowohl visköse Fließ- als auch elastische Festkörpereigenschaften. Sie verhalten sich *viskoelastisch*. Viskoelastische Messungen geben Auskunft über die dynamischen Eigenschaften und die Rigidität von Aktinnetzwerken. Die dynamischen Eigenschaften von Aktinnetzwerken bestimmen die elastische Antwort der Zelle auf mechanische Deformation und ermöglichen gleichzeitig die Bewegung der Zelle während einer langsamen, integrinvermittelten Deformation (Xu et al., 1998); die Rigidität des Aktinnetzwerks stellt letztendlich eine der treibenden Kräfte für die Migration der Zelle dar. Durch viskoelastische Messungen wurde in früheren Arbeiten gezeigt, daß in Abhängigkeit von der Konzentration und Affinität von α -Aktinin zu Aktin entweder die Ausbildung von Aktinnetzwerken oder die Ausbildung von Aktinfilamentbündeln favorisiert wird (Furukawa und Fehheimer, 1997). Die Umorganisation von Aktinnetzwerken zu -Bündeln und umgekehrt kann ein zentrales Ereignis während des Gestaltwandels und der Regulation der Adhärenz der Zelle darstellen (s. Einleitung).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob CLP-36 die filamentquervernetzenden Eigenschaften von α -Aktinin beeinflusst. Dazu wurden die viskoelastischen Eigenschaften einer Lösung aus F-Aktin, α -Aktinin und CLP-36 im Vergleich zu einer Referenzlösung, die kein CLP-36 enthält, erfaßt. Es wurden Polymerisationsmessungen durchgeführt, um die Geschwindigkeit der Gelatierung in beiden Lösungen zu vergleichen. In frequenzabhängigen Messungen wurde ein schon auspolymerisiertes Aktin/ α -Aktinin-Netzwerk auf seine Steifigkeit hin untersucht. Die Messungen wurden bei 8°C durchgeführt, da bei dieser Temperatur α -Aktinin maximale Gelatierungsaktivität zeigt. Außerdem wurden Messungen bei 26°C und 37°C durchgeführt, da diese Temperaturen physiologisch relevanter sind. Das Aktin wurde aus Skelettmuskel vom Hase isoliert nach Pardee und Spudich (1982), das α -Aktinin stammt aus der glatten Muskulatur von Truthahnmägen und wird nach einem Verfahren von Craig et al. (1982) gereinigt.

Standardansatz (500 μ l)	10 μ M..... Aktin 1 μ M..... α -Aktinin-Dimer 1 μ M..... His-CLP-36 ¹ 1 mM..... MgCl ₂ 1 \times Monomer-Puffer 1 \times Polymer-Puffer
Referenzansatz (500 μ l)	10 μ M..... Aktin 1 μ M..... α -Aktinin-Dimer 1 mM..... MgCl ₂ 1 \times Monomer-Puffer 1 \times Polymer-Puffer
1 \times Monomerpuffer (pH 7,5)	2 mM Tris 0,2 mM..... ATP 0,2 mM CaCl ₂ 0,2 mM DTT 0,05% NaN ₃
1 \times Polymerpuffer (pH 7,5)	20 mM Tris 5 mM..... ATP 1 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 2 mM DTT 20 mM..... MgCl ₂

Die viskoelastischen Moduln wurden mit dem oszillierenden Torsionsrheometer ermittelt, das von Dr. O. Müller konstruiert wurde (Müller, 1991). Die Funktionsweise sei kurz erläutert:

Auf das zu untersuchende Probenvolumen (Standardansatz) wird eine kreisförmige Scheibe (8 mm) aufgelegt, die Scherung der Probe erfolgt durch Rotation der Scheibe um die Achse senkrecht zu der durch sie definierten Ebene. Auf der Scheibe ist ein Permanentmagnet befestigt. Vier durch einen Computer gesteuerte Elektromagneten, die in der Ebene der Scheibe positioniert sind, erzeugen ein zeitlich verändertes Magnetfeld, durch das die Scheibe in eine Rotationsschwingung versetzt wird. Die Bewegung der Scheibe gibt die mechanische Antwort des Mediums wieder, auf das die Scheibe aufgelegt ist. Zur Detektion wird die Auslenkung eines Laserstrahls verwendet, der durch einen ebenfalls auf der Scheibe befestigten Spiegel reflektiert wird. Der Steuerstrom in den Magneten wird im Meßrechner zusammen

¹Der *His-tag* sollte durch Verdau mit Faktor X_a (s.??) proteolytisch abgespalten werden. Der Verdau von His-CLP-36 mit Faktor X_a führte aber zu einem kompletten Abbau des Proteins. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Präparation des Faktor X_a (Boehringer) mit anderen Proteasen verunreinigt war oder His-CLP-36 nicht korrekt gefaltet war. Denn inkorrekt gefaltete Proteine sind anfälliger für eine unspezifische Degradation. Da die Proteolyse scheiterte, wurde CLP-36 mit *his-tag* für die Messungen eingesetzt.

mit der Auslenkung des Laserstrahls erfaßt, so daß jederzeit die Scherspannungsinformation zusammen mit der resultierenden Deformation verfügbar ist. Um eine Denaturierung von Proteinen an der Grenzfläche zwischen Probenvolumen und Luft zu vermeiden, wird zwischen Scheibe und Proteinoberfläche ein Lipid-Monofilm aufgebracht. Die Scheibe selbst ist hydrophobisiert, d.h. sie tritt mit den Kohlenwasserstoffen der Lipide in Kontakt, während die Lipid-Kopfgruppen der wäßrigen Lösung der Probe zugewandt sind. Experimentell zugänglich sind (1) die Phasenverschiebung zwischen Kraftanregung und Antwortschwingung, (2) die Spannungs- und Deformationsamplitude. Aus diesen Werten lassen sich die viskösen- und Festkörpereigenschaften des Aktinnetzwerks ableiten.

Die Messungen wurden freundlicherweise von Dipl.-Phys. B. Hinner durchgeführt. Die Rohdaten (Messung der Speichermoduln, Verlustmoduln und Komplexmoduln in Abhängigkeit von der Frequenz und Zeit) sind nur bei einer gleichzeitigen Erläuterung der physikalischen Zusammenhänge verständlich. Dies würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen². Deshalb wird hier nur eine Zusammenfassung der Ergebnisse präsentiert:

(1) Aus unerklärlichen Gründen war die Streuung der Messwerte relativ hoch. Es war daher nicht möglich, die geringen Unterschiede, die anfangs zwischen den Netzwerken mit CLP-36 und den Netzwerken ohne CLP-36 gemessen wurden, reproduzierbar darzustellen. Inhomogenitäten im Aktinnetzwerk, Veränderungen des Lipidfilms oder Gerätefehler könnten für die Schwankungen verantwortlich sein.

(2) Die Reproduzierbarkeit war bei 37°C besonders gering. Aufgrund der Temperaturerhöhung auf 37°C löste sich weniger Gas im Reaktionsansatz und es lagerten sich z.T. winzige Gasblasen unterhalb der rotierenden Scheibe ab, die die Meßergebnisse verfälscht haben könnten.

(3) Letztendlich war es nicht möglich, einen signifikanten Unterschied zwischen den viskoelastischen Eigenschaften eines Aktin/ α -Aktinin-Netzwerks mit und ohne CLP-36 festzustellen. Ein größerer Effekt von CLP-36 auf die quervernetzenden Eigenschaften kann jedoch relativ sicher ausgeschlossen werden.

3.20 *E. coli*-Stämme und Plasmide

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> XL1-blue	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, lac [F', proAB, lacI_qZ\Delta M15, Tn10, (tet^R)]$	Stratagene / Bullock et al., 1987
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]*	$Nal^S Str^S rif^S, lac^- ara^- gal^- mtl^- F^- recA^+ uvr^+ [pREP4: lacI^q tet^S]$	Quiagen

²Eine ausführliche Beschreibung der Viskoelastizitätstheorie findet man in den Arbeiten von Müller (1991) und Tempel (1996)

*pREP4 überexprimiert den Lac-Repressor und verhindert so die Proteinexpression vor der Induktion

3.21 Klonierung in *E.coli* und DNA-Präparation

3.21.1 Enzyme

- Taq-DNA-Polymerase (Clontech) für analytische PCR
- ExpandTM High Fidelity PCR Enzyme Mix (Taq- und Pwo-DNA-Polymerasen) (Boehringer Mannheim) für präparative PCR
- T4 DNA-Ligase (Boehringer Mannheim)
- Kälberdarm alkalische Phosphatase (Boehringer Mannheim)
- Restriktionsenzyme von Biolabs und Boehringer Mannheim

3.21.2 Puffer

10 × DNA-Auftragspuffer	Ficoll 400	20 %
	EDTA, pH 8.0	0.1 M
	SDS	1 %
	Bromphenolblau	0.25 %

TAE-Puffer diente zur Herstellung von Agarosegelen und als Puffer für Agarosegel-Elektrophorese:

50 × TAE-Puffer	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	0.1 M
	pH 8.3	

3.21.3 Nährmedien für *E.coli* und Zusätze

Als Flüssigmedium für *E.coli* wurde das Vollmedium Luria-Bertani (LB-Medium) verwendet (fertig in Gelatine-Kapseln von BIO 101):

LB-Medium (g/l)	Tryptone-B	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g

Als Festmedium diente L-Broth Agar (fertig in Kapseln von BIO 101):

Material und Methoden

L-Broth Agar (g/l).....	Tryptone-B	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Agar	15 g
	NaCl.....	0.5 g

Die Medien wurden bei 121°C für 30 min. autoklaviert, auf ca. 45°C abgekühlt und mit den sterilfiltrierten Antibiotika für die Plasmidselektion versetzt. LB-amp Medium enthielt 100 µg/ml Ampicillin, LB-kan Medium 30 µg/ml Kanamycin

1000 × Ampicillin-Stammlösung ... 100 mg Ampicillin / ml 50% Ethanol in H₂O bidest (bei -20°C)

1000 × Kanamycin-Stammlösung 30 mg Kanamycin / ml H₂O bidest (bei -20°C)

IPTG ist ein künstlicher Induktor des lac-Operons und wurde *E.coli*M15 Kulturen mit pQE-Vektor bei einer OD₆₀₀ von 0.6-0.8 zur Induktion der Genexpression zugesetzt.

500 × IPTG-Stammlösung 1 M IPTG in 50% Ethanol (bei -20°C lagern)

3.21.4 Vorgehensweise

CLP-36 oder einzelne Domänen aus CLP-36, die in einen Vektor ligiert werden sollte, wurde über PCR amplifiziert (25-30 Zyklen), wobei der Vektor pCR-Script Amp SK(+), der die CLP-36 cDNA aus HEL-Zellen enthielt, als template diente. Für die Klonierung der α-Aktinin-Konstrukte für das *yeast two-hybrid*-System (s.refactklo) wurde die cDNA von α-Aktinin-1 aus einer Endothelzell-cDNA-Bank als template verwendet. Die Annealing-Temperatur für die PCR wurde 1-2°C kleiner als die Schmelztemperatur T_m ($T_m = 4G/C + 2AT$) gewählt. Die PCR-Primer enthielten endständig die geeigneten Schnittstellen für den Restriktionsverdau. Eine Liste aller verwendeten Primer mit Angabe der jeweiligen PCR-Produkte findet sich unter 3.21.11. Die Synthese erfolgte durch Georg Arnold, Genzentrum der LMU München, Martinsried.

Die amplifizierte cDNA wurde über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (50 ml Gel, 100 V), aus dem Gel extrahiert und über einer Silica-Matrix aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Die Multiple Cloning Sites der Vektoren (ebenfalls unter 3.21.11) wurde mit denselben Restriktions-Endonukleasen oder Isoschizomeren verdaut wie die cDNA-Inserts. Die Ligation der Fragmente erfolgte mit T4-DNA-Ligase bei 16°C ÜN. Für die Präparation und Analyse der rekombinanten Plasmide wurden Zellen mit Plasmid aus dem Ligationsansatz transformiert (s.3.21.6) und auf selektiven LB-Platten ausplattiert und ÜN im 37°C-Brutschrank inkubiert. Eine Kolonie wurde in 50 ml selektives LB-medium überimpft und bei 37°C ÜN unter heftigem Schütteln inkubiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte über alkalischen Zellaufschluß und anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA

über Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Gruppen sowie einer Isopropanolpräzipitation (Midi Kit, Qiagen (s.3.21.5)). Anschließend wurde über Restriktionskartierung oder Längenanalyse der korrekte Einbau des Inserts in den Vektor kontrolliert.

3.21.5 Molekularbiologische Kits

- Nucleobond AX DNA Purification Kit (Macherey-Nagel)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

3.21.6 Transformation der Plasmide in *E. coli*

Die Transformation erfolgte durch Elektroporation:

Material:

- Elektroporationsküvetten mit 0.2 cm Elektrodenabstand (Biorad)
- Gene Pulser[®] II Elektroporationssystem

50 μ l elektrokompente *E. coli* (Präparation elektrokompenter Zellen nach Dower et al., 1988) wurden mit Plasmid-DNA vermischt und bei 2.5 kV, 200 Ω und 25 μ F Kondensatorkapazität elektroporiert. Die Zeitkonstante τ betrug ca. 4.9 msec. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in SOC-Medium überführt und für 30-60 min. bei 37°C inkubiert zur Ausprägung der Ampicillinresistenz. Aliquots der elektroporierten Zellen wurden schließlich auf Selektionsmedium ausplattiert und ÜN bei 37°C bebrütet.

SOC-Medium	Hefeextrakt	0.5 %
	Trypton	2 %
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glukose	20 mM

3.21.7 Klonierung der CLP-36-DNA in pQE-30

Die clp-36 cDNA, die von Prof. Dr. Michael Kratzer 1997 am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten aus HEL-Zellen amplifiziert und in dem Vektor pCR-Script Amp SK8(+) (Stratagene) kloniert worden war, wurde subkloniert in den Vektor pQE-30 (Qiagen), um Polyhistidin-Fusionsproteine (N-terminale Fusion) zu erhalten (s. 3.15). Für die Insertion der cDNA in den Vektor wurde die "Multiple Cloning Site" von pQE-30 mit den Restriktions-Endonukleasen BamH1 / SalI verdaut. Die über PCR amplifizierte cDNA aus dem Vektor pCR-Script Amp SK8(+) wurde mit BclI und SalI verdaut. Die Schnittstellen für BclI und SalI wurden über die entsprechenden Primer eingebracht (s. 3.21.11). Neben der

kompletten *clp-36* Sequenz wurden auf dieselbe Weise auch die LIM-Domäne des Proteins (aa 257-329, nt 772-987) und die *clp-36* Sequenz ohne LIM-Domäne (CLP-36 Δ LIM, aa 1-256, nt 1-771) subkloniert. Um für die viskoelastischen Messungen den His-tag proteolytisch abspalten zu können, wurde vor die Sequenzen nt 1-987 und nt 1-771 über den PCR-Primer 5'-AGCTGATCAATTGAGGGACGCACCACCCAGCAGATAGAC-3' die Spaltstelle für den Faktor Xa (IEGR↓) eingebaut (s. 3.19). Die verwendeten Primer sind unter 3.21.11 aufgelistet. Die rekombinanten Plasmide wurden durch Elektroporation (s. 3.21.6 in *E. coli* transformiert).

3.21.8 Klonierung der CLP-36-DNA in p β actin-EGFP

Der hier verwendete Vektor p β actin-EGFP (s. Abb. 3.1) ermöglicht eine Fusion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) (ursprünglich aus *Aequorea victoria*) mit CLP-36 bzw. seinen Domänen. Die Vektoren werden in Zellen transfiziert und das exprimierte fluoreszierende Protein fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Die Insert-Sequenzen von CLP-36 (nt 1-987), CLP-36 Δ LIM (nt 1-771) und LIM_{CLP-36} (nt 772-987) wurden über PCR mit den in 3.21.11 beschriebenen Primern amplifiziert und in den Vektor p β actin-EGFP ligiert, der von Dr. A. Matus (Friedrich Miescher-Institut, Basel) konstruiert wurde. p β actin-EGFP entspricht dem Vektor p β actin-CGFP, der von B. Ludin (Ludin et al., 1996) entwickelt wurde (pUC 18 Derivat), mit der Ausnahme, daß EGFP (enhanced GFP, Clontech) anstatt von GFP-S65T verwendet wurde. EGFP besitzt weitere Mutationen im Chromophor, was zu einer 7-fach verstärkten Fluoreszenz führt. Der Vektor stammt von p β actin16 (Fregien und Davidson, 1986) ab, enthält also den β actin Promotor aus Huhn. Für die Insertion der CLP-36 Sequenzen in den Vektor wurden die Schnittstellen *HindIII* und *ClaI* verwendet. Im resultierenden EGFP-Fusionsprotein ist EGFP C-terminal positioniert. Die Vorwärts-Primer enthielten die Kozak-Konsensussequenz GCCGCCAGCCATGA hinter der *HindIII*-Schnittstelle, um eine effiziente Expression zu gewährleisten (s. 3.21.11). Ein Ausschnitt aus der MCS mit den verwendeten Klonierungs-Schnittstellen verdeutlicht, wo die CLP-36-DNA inseriert wurde:

```
HindIII  ApaI      Kozak           ClaI      EcoRV      NcoI
AAGCTTGGGCCCCCGCCAGCCATGATCGATGATATCACCATGG
...
Startcodon EGFP  $\Rightarrow$ 
```

Die Plasmide wurden in *E. coli* kloniert und in Endothelzellen und PtK2-Zellen transformiert. Die Transformation erfolgte in Endothelzellen durch Elektroporation, PtK2-Zellen wurden nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert (s. 3.5). Die Endothelzellen wurden 24 h nach der Elektroporation mit 3.7% Formaldehyd (s. 3.13.4) fixiert und anschließend am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die PtK2-Zellen wurden *in vivo* beobachtet (s. ??).

3.21.9 Stammhaltung

Logarithmisch wachsende *E. coli*- und Hefe-Zellen wurden mit 15% sterilem Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden die Zellen auf selektiven LB-Platten zu

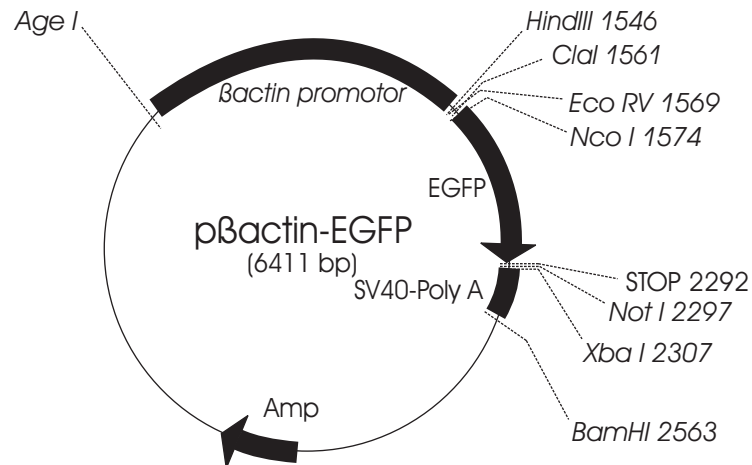


Abbildung 3.1: pβactin-EGFP Vektor

Einzelkolonien ausgestrichen und bei 37°C bebrütet.

3.21.10 Sequenzierung

Bei sämtlichen klonierten Plasmiden wurde das Insert durch forward- und reverse-Strang Sequenzierung analysiert, bis sich die Richtigkeit des Einbaus und die Fehlerlosigkeit der inserierten Sequenz bestätigen ließ. Die Sequenzierungen wurden von MWG-Biotech (Ebersberg bei München) oder TopLab (Martinsried/München) durchgeführt. Wenn möglich wurden vektorspezifische Standardprimer verwendet, im Falle der EGFP-Konstrukte wurden die Vektor-Primer (5'→3') CCGGCAGGAAGGAAATGG (for.-Primer) und GTTTACGTCCG-CGTCCAG (rev.-Primer) sowie die clp-36 spezifischen rev.-Primer (5'→3') CCACATTTGT-CACACATAGG und CTGGTTTGTGATGACCCTG eingesetzt.

Material und Methoden

3.21.11 PCR-Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	Haupt- produkte	Vektor	Orien- tierung
für Klonierung in <i>E. coli</i> :				
KB 1Xa	<i>BclI</i> I E G R↓2 AGCTGATCAATTGAGGGACGCACC- ACCCAGCAGATAGAC	CLP-36 CLP-36ΔLIM	pQE 30	for
KB 2	<i>SalI</i> 257 256 ACGCGTCGACTCATTACAACTTCT- GAGCATTTCCAA	CLP- 36ΔLIM	pQE 30	back
KB 3	<i>BclI</i> 258 259 AGCTGATCACCTATGTGTGACTGTG LIM		pQE 30	for
KB 4	<i>SalI</i> 329 328 ACGCGTCGACTCATTACTTGGGGA- ACACAGTGAC	CLP-36, LIM	pQE 30	back
für Klonierung in PtK2-Zellen und Endothelzellen:				
KB 5	<i>HindIII</i> Kozak 2 GCCAAGCTTGCCGCCAGCCATGAC- CACCCAGCAGATAG	CLP-36ΔLIM, CLP-36	pβactin-EGFP	for
KB 6	<i>ClaI</i> 329 328 CCATCGATCTTGGGGAACACAGTGAC	CLP-36, LIM	pβactin-EGFP	rev
KB 7	<i>ClaI</i> 257 256 CCATCGATCAACTTCTGAGCATTT- CCAA	CLP- 36ΔLIM	pβactin-EGFP	rev
KB 8	<i>HindIII</i> Kozak 258 GCCAAGCTTGCCGCCAGCCATGCC- TATGTGTGACAAATGTGG	LIM	pβactin-EGFP	for
für Klonierung in <i>S. cerevisiae</i> Y190 für das <i>Yeast two-hybrid</i> -System:				
MO 7	<i>NdeI</i> 2 3 GGAATTCCATATGACCACCAGCA- GATAGAC	CLP-36ΔLIM, CLP-36	pAS2-1	for

Fortsetzung:

	<i>PstI</i>	329 328			
MO 8	AACTGCAGCTATTACTTGGGGAAC- ACAGTGAC		CLP-36, LIM	pAS2-1	back
	<i>SalI</i>	257 256			
MO 9	ACGCGTCGACCTATTACAACCTTCT- GAGCATTTCCAA		CLP-36 Δ LIM	pAS2-1	back
	<i>NdeI</i>	258 259			
MO 11	GGAATTCATATGCCTATGTGTGA- CAAATGTG		LIM	pAS2-1	for
	<i>PstI</i>	82 81			
MO 14	AACTGCAGCTATTATACAGTGAGT- CAAGTTGTC		PDZ	pAS2-1	back
	<i>PstI</i>	127 126			
KB-PDZ 1	AACTGCAGCTATTAAGGGGCATG- GCACTTCGGT		PDZ 1	pAS2-1	back
	<i>PstI</i>	104 103			
KB-PDZ 2	AACTGCAGCTATTACATCTTGTAT- GGATGACGCTT		PDZ 2	pAS2-1	back
MO 15	ATGGACCATTATGATTCTCAGC		α -Aktinin-1	template	for
MO 16	TTAGAGGTCACTCTCGCCG		α -Aktinin-1	template	back
(MO 15 und MO 16 liefern die <i>template</i> -Stränge für die nachfolgenden Primer)					
	<i>EcoRI</i>	245 246			
MO 17	GGAATTCGATTCTACCACGCCTTC- TCTG		α -Aktinin-1, repeat 1	pACT-2	for
	<i>XhoI</i>	363 362			
MO 18	CCGCTCGAGCTATTAGTCCGAGAC- CATCCTGC		α -Aktinin-1, repeat 1	pACT-2	back
	<i>XhoI</i>	478 477			
MO 19	CCGCTCGAGCTATTACTTTTGGCA- ACGGGCGTT		α -Aktinin-1, repeat 2	pACT-2	back

Material und Methoden

Fortsetzung:

MO 20	<i>Xho I</i> 599 598 CCGCTCGAGCTATTACTCCTGAGG- CGTGATGGT	α -Aktinin-1, repeat 3	pACT-2	back
MO 21	<i>Xho I</i> 712 711 CCGCTCGAGCTATTAGTGGTCGCC- CTCCAGCTG	α -Aktinin-1, repeat 4	pACT-2	back
MO 22	<i>Eco RI</i> 1 2 GGAATTCGAATGGACCATTATGAT- TCTCAG	α -Aktinin-1	pACT-2	for
MO 23	<i>Xho I</i> 912 911 CCGCTCGAGCTATTAGAGGTCACT- CTCGCC	α -Aktinin-1	pACT-2	back
Spec23fn	<i>Eco RI</i> 435 436 CCGGAATTCGAATCAACAATGCCT- GGGGC	α -Aktinin-1, repeat 2	pACT-2	for
Spec3f	<i>Eco RI</i> 556 557 CCGGAATTCGAATCTGTGACCAGT- GGGAC	α -Aktinin-1, repeat 3	pACT-2	for

3.22 Untersuchung der *in vivo*-Dynamik von EGFP-CLP-36 durch Videomikroskopie

Dynamische Prozesse können mithilfe der GFP (Green Fluorescent Protein)-Technologie und verbesserter Mikroskope in der lebenden Zelle mit hervorragender räumlicher und zeitlicher Auflösung dargestellt werden. Dies ist ein großer Schritt vorwärts von einem statischen zu einem dynamischen Bild der Zelle. Um die Dynamik von CLP-36 in der lebenden Zelle zu beobachten, wurden die oben beschriebenen Plasmide in PtK2-Zellen transformiert. PtK2-Zellen sind für eine *in vivo*-Beobachtung besonders geeignet, da sie sehr flach sind und daher die meisten Vorgänge am Zytoskelett in einer einzigen fokalen Ebene ablaufen. Dafür wurden die Zellen auf runden Deckgläsern (1 cm Durchmesser) angezogen und transfiziert. 1-3 Tage nach der Transfektion wurden die Deckgläser in eine Lochplatte eingesetzt, mit einem Tropfen Medium überschichtet und mit einer zweiten Glasplatte versiegelt. Die Zellen wurden unter einem inversen Mikroskop IX70 (Olympus) mit Inkubatorgehäuse, das auf 37°C temperiert wurde, beobachtet. Die Fluoreszenz des EGFP-Proteins wurde durch das Bandenspektrum einer Quecksilberlampe angeregt. Die Bildverarbeitung erfolgte mit dem TILL Imaging System von Photonics (Martinsried, München). Die Einzelbilder wurden alle 200 msec, 400 msec oder jede Sekunde in Zyklen von 200-300 Einzelbildern pro Video aufgenommen; in der Videoabspielung mit dem Windows Mediaplayer auf Standard-PCs erscheinen die Videos entsprechend in einem 3-fachen bis 15-fachen Zeitraffer.

Die Kultur der PtK2-Zellen, die Ca-Phosphat-Transformation sowie die *in vivo*-Mikroskopie wurden freundlicherweise von Dr. Patrick Keller (EMBL Heidelberg) durchgeführt.

4

Ergebnisse

4.1 Analyse der Primärstruktur von CLP-36

Die aus HEL-Zellen klonierte cDNA kodiert für ein 329 AS Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 36.1kDa und einem isoelektrischen Punkt von pI 6,5 (s.S.3). Aufgrund der 86%igen AS-Sequenzidentität zu CLP-36 (C-terminales LIM-Domäne Protein, 36 kDa; Wang et al., 1995) aus Ratte wurde das Protein als humanes CLP-36 bezeichnet. Zu CLP-36 aus Maus (AF053367) besteht eine 88%ige Sequenzübereinstimmung (Kotaka et al., 1998; Datenbankreferenz). Der C-terminale Teil enthält die Konsensussequenz C-X₂-C-X₁₇₋₁₉-H-X₂-C-X₂-C-X₂-C-X₁₆₋₂₀-C-X₂-C/H/D der LIM-Domäne, ein Strukturmotiv mit einem doppelten Zinkfinger (s.S.14 und Abb. 4.1). CLP-36 kann aufgrund der Lage der LIM-Domäne am C-terminus und der Sequenzhomologie der LIM-Domäne zur Gruppe 3 der LIM-Domäne Proteine gezählt werden. Den N-terminus des Proteins bildet eine 82 AS lange PDZ-Domäne (s.S.11 und Abb. 4.1). Beides sind Protein/Protein-Interaktionsmotive, die innerhalb eines Proteins oft geclustert auftreten und wahrscheinlich eine Adapterfunktion in Proteinkomplexen erfüllen (s.S.11). Das Motiv ASGV an Position 169-172 in CLP-36 ist Bestandteil der Erkennungssequenz ASGVXVXD, an der die Aktin depolymerisierenden Faktoren (ADFs) und Cofilin durch die LIM-Kinase I phosphoryliert werden. Es wurde daher in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kensaku Mizuno überprüft, ob CLP-36 *in vitro* ein Substrat der LIM-Kinasen ist (s. 4.12.2).

CLP-36 gehört mit ALP (Actinin-associated LIM Protein; Xia et al., 1997), RIL (Reversion Induced LIM Protein; Wang et al., 1995), Enigma (Guy et al., 1999), Oracle (Passier et al., 2000) und Cypher (Zhou et al., 1999) in die Gruppe der PDZ-LIM Proteine, die eine N-terminale PDZ-Domäne und eine oder drei C-terminale LIM-Domänen enthalten, wobei die Proteine ALP und RIL die höchste Homologie zu CLP-36 zeigen (s. Abb.4.2). Abb.4.3 verdeutlicht die Homologie innerhalb der Domänen LIM (AS 256-310) und PDZ (AS 1-80). Der Mittelteil dieser Proteine (AS 194-259) ist reich an Serin- und Prolinresten, von denen einige konserviert sind. Im Mittelteil ist die Sequenzhomologie zu den anderen Proteinen innerhalb der Aminosäuren 194-249 aus CLP-36 besonders hoch. Die konservierten Reste finden sich auch in CLP-36 aus Maus (AF053367) und Ratte (nicht gezeigt). Sie könnten daher von Bedeutung für die Funktion dieser Proteine sein. Außerdem wurde die Hefechromosom-

1	ATG ACC ACC CAG CAG ATA GAC CTC CAG GGC CCG GGG CCG TGG GGC	15
	M T T Q Q I D L Q G P G P W G	
46	TTC CGC CTC GTG GGC GGC AAG GAC TTC GAG CAG CCT CTC GCC ATT	
	F R L V G G K <u>D F E Q P L A I</u>	30
91	TCC CGG GTC ACT CCT GGA AGC AAG GCG GCT CTA GCT AAT TTA TGT	
	<u>S R V T P G S K</u> A A L A N L C	45
136	ATT GGA GAT GTA ATC ACA GCC ATT GAT GGG GAA AAT ACT AGC AAT	
	I G D V I T A I D G E N T S N	60
181	ATG ACA CAC TTG GAA GCT CAG AAC AGA ATC AAA GGC TGC ACA GAC	
	M T H L E A Q N R I K G C <u>T D</u>	75
226	AAC TTG ACT CTC ACT GTA GCC AGA TCT GAA CAT AAA GTC TGG TCT	
	<u>N L T L T V A R</u> S E H K <u>V W S</u>	90
271	CCT CTG GTG ACG GAG GAA GGG AAG CGT CAT CCA TAC AAG ATG AAT	
	<u>P L V T E E G K</u> R H P Y K M N	105
316	TTA GCC TCT GAA CCC CAG GAG GTC CTG CAC ATA GGA AGC GCC CAC	
	L A S E P Q E V L H I G S A H	120
361	AAC CGA AGT GCC ATG CCC TTT ACC GCC TCG CCT GCC TCC AGC ACT	
	N R S A M P F T A S P A S S T	135
406	ACT GCC AGG GTC ATC ACA AAC CAG TAC AAC AAC CCA GCT GGC CTC	
	T A R V I T N Q Y N N P A G L	150
451	TAC TCT TCT GAA AAT ATC TCC AAC TTC AAC AAT GCC CTG GAG TCA	
	Y S S E N I S N F N N A L E S	165
496	AAG ACT GCT GCC AGC GGG GTG GAG GCG AAC AGC AGA CCC TTA GAC	
	K T <u>A A S G V E A N</u> S R P L D	180
541	CAT GCT CAG CCT CCA AGC AGC CTT GTC ATC GAC AAA GAA TCT GAA	
	H A Q P P S S L V I D K E S E	195
586	GTT TAC AAG ATG CTT CAG GAG AAA CAG GAG TTG AAT GAG CCC CCG	
	V Y K M L Q E K Q E L N E P P	210
631	AAA CAG TCC ACG TCT TTC TTG GTT TTG CAG GAA ATC CTG GAG TCT	
	K Q S T S F L V L Q E I L E S	225
676	GAA GAA AAA GGG GAT CCC AAC AAG CCC TCA GGA TTC AGA AGT GTT	
	E E K G D P N K P S G F R S V	240
721	AAA GCT CCT GTC ACT AAA GTG GCT GCG TCG ATT GGA AAT GCT CAG	
	K A P V T K V A A S I G N A Q	255
766	AAG TTG CCT ATG TGT GAC AAA TGT GGC ACT GGG ATT GTT GGT GTG	
	K L P M C D K C <u>G T G I V G V</u>	270
811	TTT GTG AAG CTG CGG GAC CGT CAC CGC CAC CCT GAG TGT TAT GTG	
	<u>F V K</u> L R D R H R H P E C Y V	285
856	TGC ACT GAC TGT GGC ACC AAC CTG AAA CAG AAG GGC CAT TTC TTT	
	C T D C G T N L K Q K G H <u>F F</u>	300
901	GTG GAG GAT CAA ATC TAC TGT GAG AAG CAT GCC CGG GAG CGA GTC	
	<u>V E D Q I Y C E K H A R E</u> V	315
946	ACA CCA CCT GAG GGT TAT GAA GTG GTC ACT GTG TTC CCC AAG TGA	
	<u>T P P E G Y E V</u> V T V F P K	330
991	GCC AGC AGA TCT GAC CAC TGT TCT CCA GCA GGC CTC TGC TGC AGC	
1036	TTT TTC TCT CAG TGT TCT GGC CCT CTC CTC TCT TGA AAG TTC TCT	
1081	GCT TAC TTT GGT T	

Abbildung 4.1: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäure-Sequenz der humanen clp-36 cDNA aus HEL-Zellen. Die PDZ-Domäne (AS 1-82) ist in dunklem Grau, die C-terminale LIM-Domäne (AS 260-310) hellgrau markiert. Die Peptide, gegen die die Anti-Peptid Antikörpern gerichtet sind, sind fettgedruckt. Die durch aminoterminalen Sequenzanalyse (Methodik s. Eckerskorn et al., 1988) gewonnen Peptidsequenzen, die zur Identifizierung des gereinigten Plättchenproteins führten, sind unterstrichen.

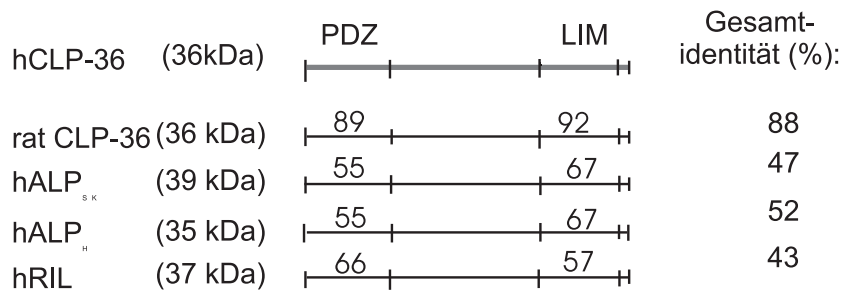


Abbildung 4.2: Homologie von ALP, exprimiert in Skelettmuskel (hALP_{SK}; accession no. AF002280) und Herzmuskel (hALP_H; accession no. AF002282) und humanem RIL (hRIL; accession no. AF153882) zu humanem CLP-36 (hCLP-36)

Datenbank der Stanford University nach homologen ORF-Sequenzen durchsucht. Es konnte ein ORF mit Namen BOP3 identifiziert werden, der für ein hypothetisches 44 kDa Protein kodiert, das eine 22%ige Identität zu CLP-36 besitzt. BOP3 kodiert keine PDZ- und LIM-Domäne, zeigt aber ebenfalls im Mittelteil eine große Anzahl konservierter Serin- und Prolinreste (s. Abb.4.4). Diese Serin- und Prolinreste könnten essentiell für die Funktion von CLP-36 und BOP3 sein.

4.2 Expression von CLP-36

Die aus Kaninchen gewonnenen Anti-CLP-36 Seren (3.7.1) wurden über Protein A-Sepharose (3.7.2) gereinigt und die so erhaltenen Immunglobulinfraktionen zur Detektion von CLP-36 im Western Blot (3.13.1) eingesetzt. In Plättchengesamtprotein ("ganze Plättchen") erkannten sowohl die Antipeptid- als auch die Anti-CLP-36 Antikörper spezifisch eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 36 kDa (s. Abb.4.15). Die Immundetektion im Western-Blot zeigte hohe Sensitivität, so konnten mit 1:20000 verdünntem Anti-14-Peptid Serum noch 3 ng GST-CLP-36_{AS 258-329} Fusionsprotein nachgewiesen werden. Außer in Plättchen ließ sich CLP-36 in humanen venösen und arteriellen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC, HUAEC) detektieren (Bauer et al., 2000). Es war dort relativ zum Gesamtprotein in geringeren Mengen exprimiert als in Plättchen und die Expression schwankte stark in Abhängigkeit von der Zellpassage und der Nabelschnurpräparation. In der monozytären Zelllinie U937 und *human foreskin fibroblasts* (HFF) konnte mit der Western-Blot Methode kein CLP-36 nachgewiesen werden. Um weitere Informationen zur gewebs- und zellspezifischen Expression von CLP-36 zu erhalten, wurden Expressed Sequence Tags (ESTs)-Datenbanken (dbEST und preblast-est) nach ESTs durchsucht, die komplementär zu *CLP-36* sind¹. Es wurden 182 ESTs für CLP-36 gefunden, die v.a. aus folgenden Geweben und Zelllinien stammten: Lunge, Leber, Pankreas, Milz, Colon, Schilddrüse, Placenta, Skelettmuskel, Endothelzellen, seneszente Fibroblasten und Jurkat-T-Zellen. CLP-36 wird also offenbar in einer Vielzahl von

¹Expressed Sequence Tags werden durch automatisiertes, partielles Sequenzieren von cDNA-Klonen aus definierten Geweben/Zelllinien erhalten und unter anderem zum Etikettieren ("sequence tags") kodierender Abschnitte in Genom herangezogen.

CLP-36	1	MTTQQIDLQGGPWGFRLVGGKDFEQPLAISRVTPGSKAALA--NLCTGDVITAI	DGENT
ALP-SK	1	-MPQTVILPGPAPWGFRLSGGIDFNQPLVITRIITPGSKAAAA--NLCPGDVILA	IDGFGT
RIL	1	-MPHSVTLRGPSPWGFRLVG-RDFSAPLTISRVAHGSKASLA--ALCPGDLIQA	INGEST
Enigma	1	MDSEKVVLEGPAPWGFRLVGGKDFENVPLSISRLTPGGKAAQAGVAFTVGDWVLS	SIDGENA
CLP-36	59	SNMTHLEAQNRIKCTDNLTTLTVARSEHKVWSPLVTEEGKRHPYKMNLAS	EPQEVVLHIGS
ALP-SK	58	ESMTHADAQDRIKAAAHQLCLKIDRGETHLWSPQVSEDKAHPFKINLESE	PDGNYFEH
RIL	57	ELMTHLEAQNRIKCHDHLTTLVSRPEGRSW-PSAPDSDKAQAHRIHIDPE	IQDGSPTTS
Enigma	61	GSLTHLEAQNKIRACGERLSLGLSRAQPVQSKPKOKASAPAADPPRTFTPLH	PASPSTRRP
CLP-36	119	AHNRSAMPFTASPASSTTARVITNQY-----NNPAGLYSSENI	SNFNNALESKTAASG
ALP-SK	118	KHNIRKPPFVIPGRSSGCSTPSG--I-----DCGSGRSTPSSV	STVSTICPGDLKVAA
RIL	116	RRPSGTGTGPEGRPSLGSPIYK-----PPCFVPHNGSS	SEATLPAQMSTLHVS
Enigma	121	NPLGPPAEDSPPQQNGQPLRPLVPDASKQRLMENTEDWRPRPGQAS	SRFTVPSASLPTSQA
CLP-36	172	VEANSRPLDHAQP-----PSSLVID	
ALP-SK	169	KLAPNIPLEMELPGVKIVHAQFNTPMQLYSDDNIMETLQGQVSTALGET	PLMNEPTASVP
RIL	165	PPPSADPAEASRG-----AGSRVD	
Enigma	181	PSSCKTPDEEHLKSSQ-----VP-----DRSP-----SPSLIYT	
CLP-36	192	KESEVYKMLQEKQE-----LNEPFPKQSTSFVLVQEI	LESEEKCDPNKPSGFRS----VKA
ALP-SK	229	PESDVYRMLHDNRN-----EPTQPROSGSFRVLQGMVDD---GSDDR	PAGTRS----VRA
RIL	184	LGSEVYRMLREPAEP---VAAEPKQSGSFRYLQGMLEAGEGGDWP	GGPRN----LKP
Enigma	211	PGALAWPYRPPYQPPALFTGCGPCVCRALCPGQNEHSADPHSQPAT	PTPLQSRTSIVQA
CLP-36	243	PVTKVAASIGNAOKLPMCDK--CGTGIVGVFVKLRDRHRHPECYVCT	DCGTNLKQKGFHFF
ALP-SK	277	PVTKVHGGSGGAQRMPLCDK--CGSGIVGAVVKARDKYRHPECFVCA	DCNLTNLKQKGYFF
RIL	236	TASKLGAPLSGLQGLPECTR--CCHGIVGTIVKERDKLYHPECFMCS	DCGLNLKQKRGYFF
Enigma	271	AAGGVPGGGSNNGKTPVCHFTQCHKVIRGRYLVALGHAYHPEEFVCS	QCGKVL EEGGFFE
CLP-36	301	VEDQIYCEKHAREVRTPEGEYEVVTVFPK-----	
ALP-SK	335	IEGELYCETHARARTKPPEGYDVTLYPKA-----	
RIL	294	LDERLYCESHAKARVKPPEGYDVVAVYPNAKVELV-----	
Enigma	331	EKGAIFCPPCYDVRYPASCAFTKCKKKITGEIMHALKMTWHVHCFT	CAACKTPIRNRAFY
CLP-36		-----	
ALP-SK		-----	
RIL		-----	
Enigma	391	MEEGVPYCERDYEKMFGTKCHFTGCDFKIDAGDRFLEALGFSWHD	TCFVCAICQINLEGK
CLP-36		-----	
ALP-SK		-----	
RIL		-----	
Enigma	451	TFYSKKDRPLCKSHAFSHV	

Abbildung 4.3: Alignment der humanen PDZ-LIM Proteine CLP-36, ALP-SK (ALP-Isoform des Skelettmuskels), RIL und Enigma. Die identischen Aminosäuren sind schwarz, die chemisch ähnlichen Aminosäuren grau unterlegt.

```
CLP36: 95 EEGKRHPYKMNLASEPQEV LHIGSAH----NRSAMPFTAS---PASSTTARVITNQYNNP 147
      E+ K+ YK+ + E+ + S+ N+ F PASS +NN
BOP3: 57 EKTKQQYYKLENLNRSIELFKLASSSGLPINQIHKL FNTDHGVPASSPMKAGGNQPHNNT 116

CLP36: 148 AGLYSSENISNFNNALES-----KTAASGVEANSRPLDHAQPPSSLVIDKESEVYKMLQE 202
      G SSEN+ N +++S S + +P + P SS +Q
BOP3: 117 EGTQSSENL PRLNGSMKSLKPLNMNTV SPTPMSRQPSYKFPASSSTGGISHSTVTNVQR 176

CLP36: 203 KQELNEPPKQSTSFLV-LQEILESEEKGDPNK-PSGFRSVKAPVTKVAASIGNAQ-KLPM 259
      + N P + S + L + + +E+ + PSG +S ++P+ K S+ + LP+
BOP3: 177 RA--NSPARIGASAVAALNDNISIKEEDVARRIPSGTKSQESPLNKKPTSLHSRNLSLPI 234
```

Abbildung 4.4: Sequenzvergleich zwischen hCLP-36 und dem hypothetischen Hefeprotein BOP3. Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren in beiden Proteinen an.

Gewebe und Zelltypen exprimiert.

4.3 Assoziation von CLP-36 mit dem Aktinzytoskelett in Plättchen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von CLP-36 in Plättchen und Endothelzellen wurden CLP-36 Antikörper und fluoreszenzmarkierter Zweit-Antikörper zur Immundetektion eingesetzt (3.13.4). Die Zellpräparate wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop oder einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet.

In aktivierten Plättchen, in denen der Großteil des Aktins in filamentöser Form innerhalb komplexer Zytoskelettstrukturen vorliegt, zeigte sich eine partielle Kolo-kalisation von CLP-36 mit dem Aktinzytoskelett. Die Immundetektionen waren spezifisch für CLP-36, denn Kontrollen mit Präimmenserum und eine Präinkubation des Antikörpers mit His-CLP-36 zeigten - abhängig vom Zelltyp - kein oder nur ein sehr schwaches unspezifisches Fluoreszenzsignal (Ergebnisse nicht gezeigt und Bauer et al., 2000).

Plättchen adhären an bestimmte Oberflächen (z.B. an Glas) und breiten sich aus², wobei sie das ca. 5-fache ihres Durchmessers zunehmen. Die ausgebreiteten Plättchen zeigen unterschiedliche Morphologien, und stellen ein gutes Modell für die Untersuchung spezieller Aktinstrukturen und aktinassoziierter Proteine dar. Während der initialen Plättchenaktivierung vollzieht sich ein Gestaltwandel³, in dem das Plättchen von der diskoiden in eine sphärische Form übergeht und Filopodien ausbildet, die dichtgepackt mit Aktinfilamentbündeln sind (Hartwig, 1992). Doppel-Fluoreszenzdetektionen von CLP-36 und F-Aktin zeigten, daß CLP-36 in sich ausbildenden (Abb.4.5(a)) und bereits elongierten Filopodien (Abb.4.5(b)) an den Aktinfilamenten konzentriert ist.

Sich ausbreitende Plättchen bilden radial verlaufende Aktinfilamente und einen kortikalen

²engl. "spreading"

³engl. "shape change"

Filamentring aus orthogonal vernetztem F-Aktin aus (Allen et al., 1979, Hartwig, 1992). CLP-36 kolokalisierte mit beiden Aktinstrukturen, wobei der kortikale Filamentring nur an der Innenseite mit CLP-36 assoziiert war (Abb.4.5(c')). In Spätstadien der Ausbreitung zeigen manche Plättchen transversale, parallel angeordnete F-Aktinfasern (Stressfasern). Auf diesen war CLP-36 punkt- bzw. bandenförmig angeordnet (Abb.4.5(d,d')). Die Aktinfilamente sind membranterminal über fokale Adhäsionen mit der extrazellulären Matrix verbunden (s.S.8). In ausgebreiteten Plättchen mit vortexartig ausgebildeten Aktinfilamenten sind die fokalen Adhäsionen spiralförmig angeordnet. Sie wurden dort mit Vinkulin-Antikörper sichtbar gemacht (Abb.4.5(Vinc)). CLP-36 (Abb.4.5(e)) zeigte keine Kolokalisation mit Vinkulin (Abb.4.5(e')), d.h. CLP-36 ist nicht mit den fokalen Adhäsionen assoziiert oder kann dort aufgrund schlechter Zugänglichkeit für den Antikörper nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß CLP-36 in ausgebreiteten Plättchen mit den Aktinfilamenten in den Filopodien, im Zellkortex und den Aktinstressfasern assoziiert war, wobei CLP-36 entlang der gebündelten Aktinfilamente der Stressfasern (s.S.6) nicht durchgehend, sondern periodisch angeordnet war.

Für die Ausbreitung von Plättchen ist die Ausbildung kortikaler, orthogonal vernetzter Aktinnetzwerke innerhalb der Lamellipodien essentiell. Die Bildung der Lamellipodien ist Ca^{2+} -abhängig und kann durch Präinkubation der Plättchen mit dem zytosolischen Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM gehemmt werden (Hartwig, 1992). Die behandelten Plättchen können an eine Poly-L-Lysin beschichtete Glasmatrix adhären, sich aber nicht mehr ausbreiten. Für diesen Effekt ist möglicherweise die BAPTA-AM-induzierte Inaktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Zytoskelettproteine (Hartwig, 1992), die für ein funktionelles Lamellipodium nötig sind, z.B. Gelsolin, verantwortlich.

Gewaschene Plättchen wurden vor ihrer Aktivierung durch Glaskontakt (250 g, 5 min.) mit BAPTA-AM behandelt ($10\mu\text{M}$, 10 min., 37°C). Die adhären Plättchen wurden anschließend fixiert und das F-Aktin und CLP-36 durch Fluoreszenzdoppelfärbung sichtbar gemacht. Die Ca^{2+} -depletierten adhären Plättchen breiteten sich nicht aus und bildeten keine radiären Filamentbündel und keinen kortikalen Aktinfilamentring (Abb. 4.6; vgl. Abb. 4.5C). CLP-36 kolokalisierte zwar teilweise mit dem Aktinzytoskelett, doch schien diese Kolokalisation eher zufällig und nicht mehr durch eine spezifische Assoziation von CLP-36 mit F-Aktin zustande zu kommen. Die Assoziation von CLP-36 mit dem F-Aktinzytoskelett scheint also teilweise Ca^{2+} -abhängig zu sein. Es besteht daher die Möglichkeit, daß CLP-36 an der Ca^{2+} -abhängigen Bildung des Lamellipodiums beteiligt ist.

Durch Sequenzierung des *CLP-36*-PCR-Produkts aus einer Endothelzell-cDNA-Bank konnte gezeigt werden, daß CLP-36 auch in Endothelzellen exprimiert ist. Endothelzellen kleiden die Innenseite der Gefäßwände aus. Sie regulieren die Gefäßfunktionen und tragen pathophysiologisch zur Artherosklerose bei. Sie wurden in dieser Arbeit aus Nabelschnurvenen isoliert (HUVEC). (s. 3.4.1).

In subkonfluenten Endothelzellen war CLP-36 punktiert auf den Stressfasern lokalisiert (Abb. 4.7). In konfluenten Endothelzellen assoziierte es mit den F-aktin-reichen Zellkontakten und war im Zytosol verteilt (Abb. 4.7B). Stimuliert man konfluente Endothelzellen mit Thrombin, so kommt es zur Aktinpolymerisation, Stressfaserbildung (Thurston und Turner, 1994;

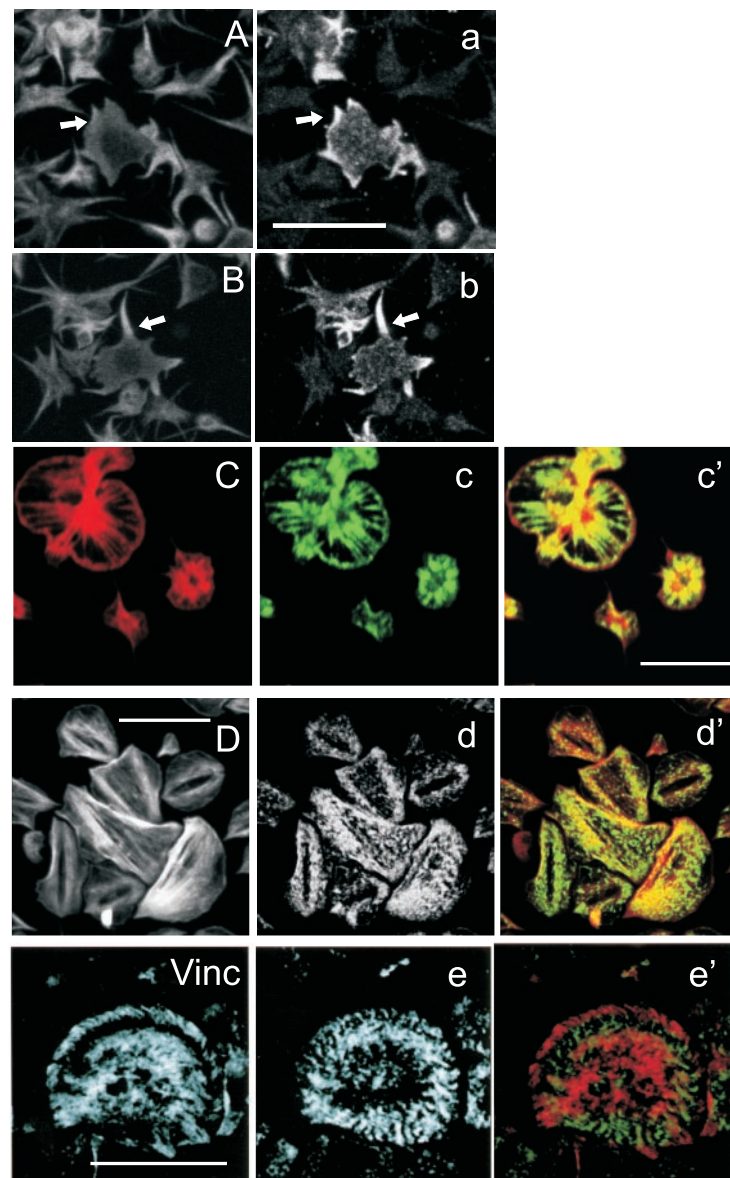


Abbildung 4.5: Vergleich der subzellulären Lokalisation von CLP-36 und Aktin in fixierten Plättchen während verschiedener Stadien der Plättchen-Adhäsion und -Ausbreitung. Mit Rhodaminphalloidin markiertes F-Aktin (rot, A-D) und FITC-immunodetektiertes CLP-36 (grün, a-e) kolo-kalisieren in frühen (A,a; B,b) und späteren Stadien (C,c,D,d) der Plättchenadhäsion, gezeigt durch Doppel-Fluoreszenzdetektion; die Überlappung der FITC- und Rhodamin-Emission erscheint gelb (c',d'). Die Anti-CLP-36 Immunfluoreszenz in den Filopodien (Pfeile in a,b) ist homogen, während CLP-36 in den Aktinfilamenten späterer Stadien fleckenartig (c) bzw. punkt- und bandenförmig (d,e) auftritt. CLP-36 (e) kolokalisiert nicht mit der Vinkulin-Immunfluoreszenz (Vinc), einem Marker für fokale Adhäsionen (e', Überlagerung von (Vinc) und (e)). Zweit-Antikörper: FITC-markiertes anti-Kaninchen IgG für CLP-36, Alexa 568-markiertes anti-Maus IgG für Vinkulin. Die Bilder A,a-C,c wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen, während D,d und Vinc,e mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie erzeugt wurden; Skalierbalken 10 μm .; $\times 1000$

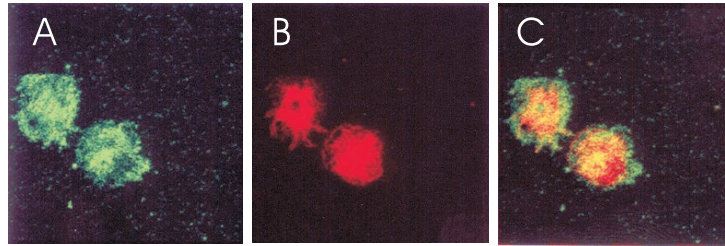


Abbildung 4.6: Vergleich der Lokalisation von F-Aktin (Phalloidin-Rhodamin-markiert, B) und CLP-36 (FITC-Fluoreszenz), A) in Plättchen, die mit $10\ \mu\text{M}$ BAPTA-AM inkubiert (10 min., 37°C) und anschließend auf Poly-L-Lysin beschichtetes Glas zentrifugiert (250 g, 5 min.) wurden. Nichtadhärente Plättchen wurden mit Puffer C (s.3.6) ab gespült, die adhären Plättchen wurden fixiert; Überlagerung der Fluoreszenz (gelb in C), Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie, $\times 1000$.)

Essler et al., 1998) und Kontraktion des Aktinzytoskeletts (Galdal et al., 1984). Dies führt zur Lückenbildung im Endothel und zur Transmigration von Entzündungszellen. Nach Stimulierung mit Thrombin translozierte CLP-36 an das kontraktile Aktinzytoskelett (Abb. 4.7C). In den mit Vinkulin markierten fokalen Kontakten ließ sich wie in Plättchen kein CLP-36 nachweisen.

Da andere LIM-Domäne-Proteine wie CRP1 (Pomies et al., 1997) und ALPs (Pomies et al., 1999) stark in glatten Muskelzellen exprimiert werden, wurde auch die Expression und Lokalisation von CLP-36 in glatten Muskelzellen untersucht. In Lysaten aus glatten Muskelzellen der *Vena saphena magna* ließ sich im Western-Blot kein CLP-36 finden, jedoch konnte CLP-36 mittels Immunfluoreszenz auf den Aktinfilamenten glatter Muskelzellen nachgewiesen werden. Es war dort ebenfalls klar abgegrenzt von Vinkulin, das im Gegensatz zu Plättchen und Endothelzellen an den Filament/Matrix-Kontakten weniger fokal organisiert war, sondern sich auf den Filamenttermini punktiert über einen weiteren Bereich erstreckte (Abb.4.8).

4.4 Elektronenmikroskopische Lokalisierung von CLP-36 in ruhenden und aktivierten Plättchen

Räumliche Zuordnungen sowie die Konservierung und Erkennung von Feinstrukturen bzw. Zellorganellen sind durch Immunfluoreszenzmikroskopie nur eingeschränkt möglich. Daher wurde die Lokalisation von CLP-36 in Plättchen auch elektronenmikroskopisch durch indirekte Immunogoldmarkierung untersucht (Die Präparation der Plättchen, die elektronenmikroskopische Untersuchung und die Auswertung erfolgten durch Eberhard Morgenstern, Bad Homburg / Saar, s. 3.13.4). Durch das Schneiden der Präparate für die Elektronenmikroskopie kann die Lokalisation von CLP-36 auch in aggregierten Plättchen untersucht werden. Außerdem ist das Antigen für den Antikörper an Schnitten von Zellen besser zugänglich als in permeabilisierten Zellen. Dies ist an kritischen Stellen, z.B. den fokalen Adhäsionen, besonders wichtig. In ultragefriergetrockneten Schnitten ruhender Plättchen, war CLP-36 v.a. in der Plättchenperipherie lokalisiert. Einige Markierungen fanden sich auch im Zytosol. Ak-

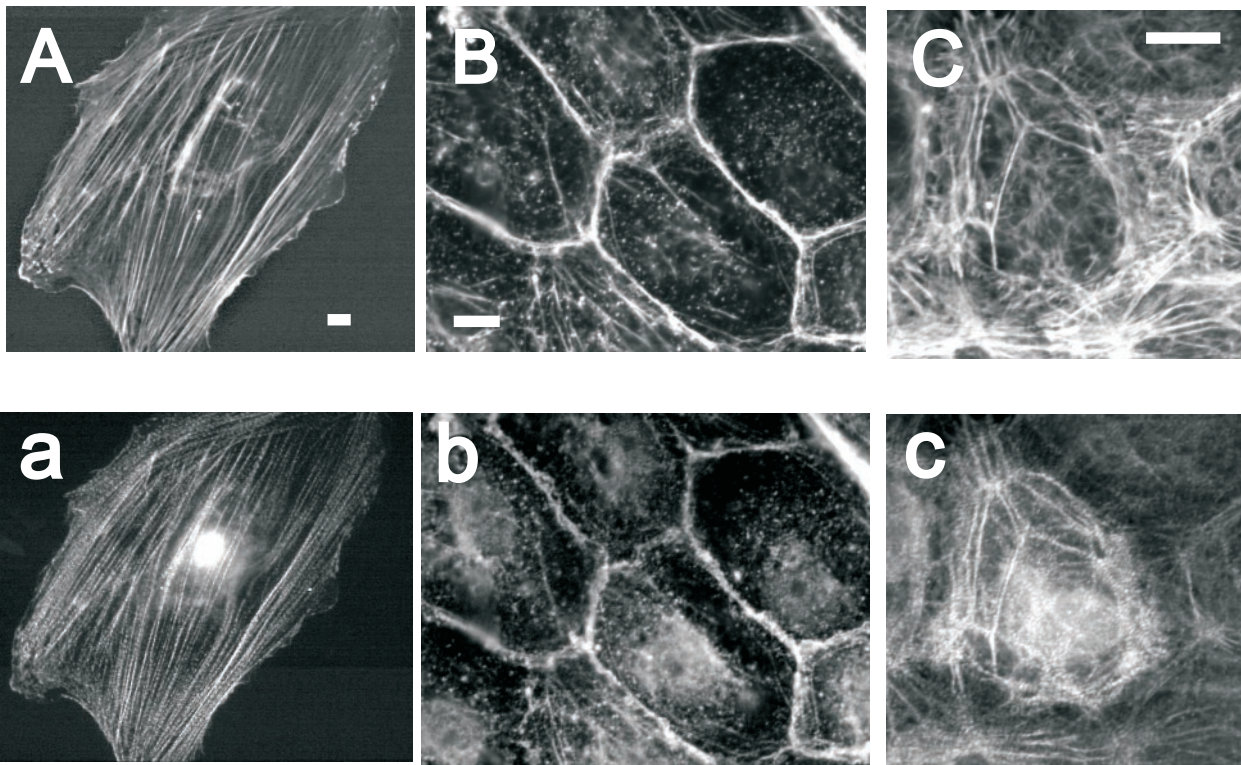


Abbildung 4.7: Indirekte Fluoreszenzdetektion von F-Aktin (Rodamin-phalloidin, A-C) und CLP-36 (FITC, a-c) in subkonfluenten (A), konfluenten (B) und mit Thrombin (1U/ml, 5 min.) aktivierten, fixierten Endothelzellen (1000 \times); Skalierbalken 5 μ m.

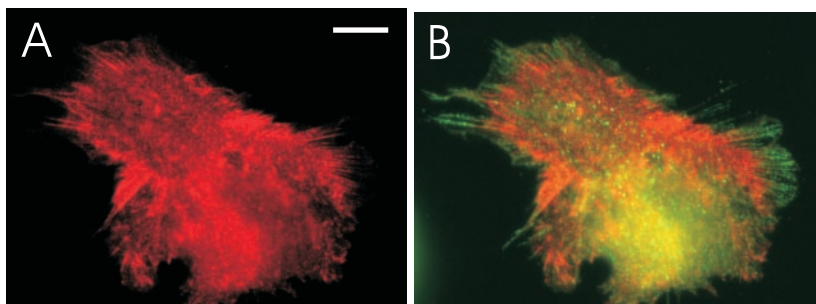


Abbildung 4.8: Immunfluoreszenz-Doppeldetektion von CLP-36 (A, Alexa 568 (rot); in B überlappend mit Vinkulin) und Vinkulin (B, Alexa 488 (grün)) in glatten Muskelzellen aus der *Vena saphena magna*, CLP-36 zeigte keine Kolo-kalisation mit den fokalen Adhäsionen (Vinkulin, grün), fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme, 1000 \times ; Skalierbalken 30 μ m.

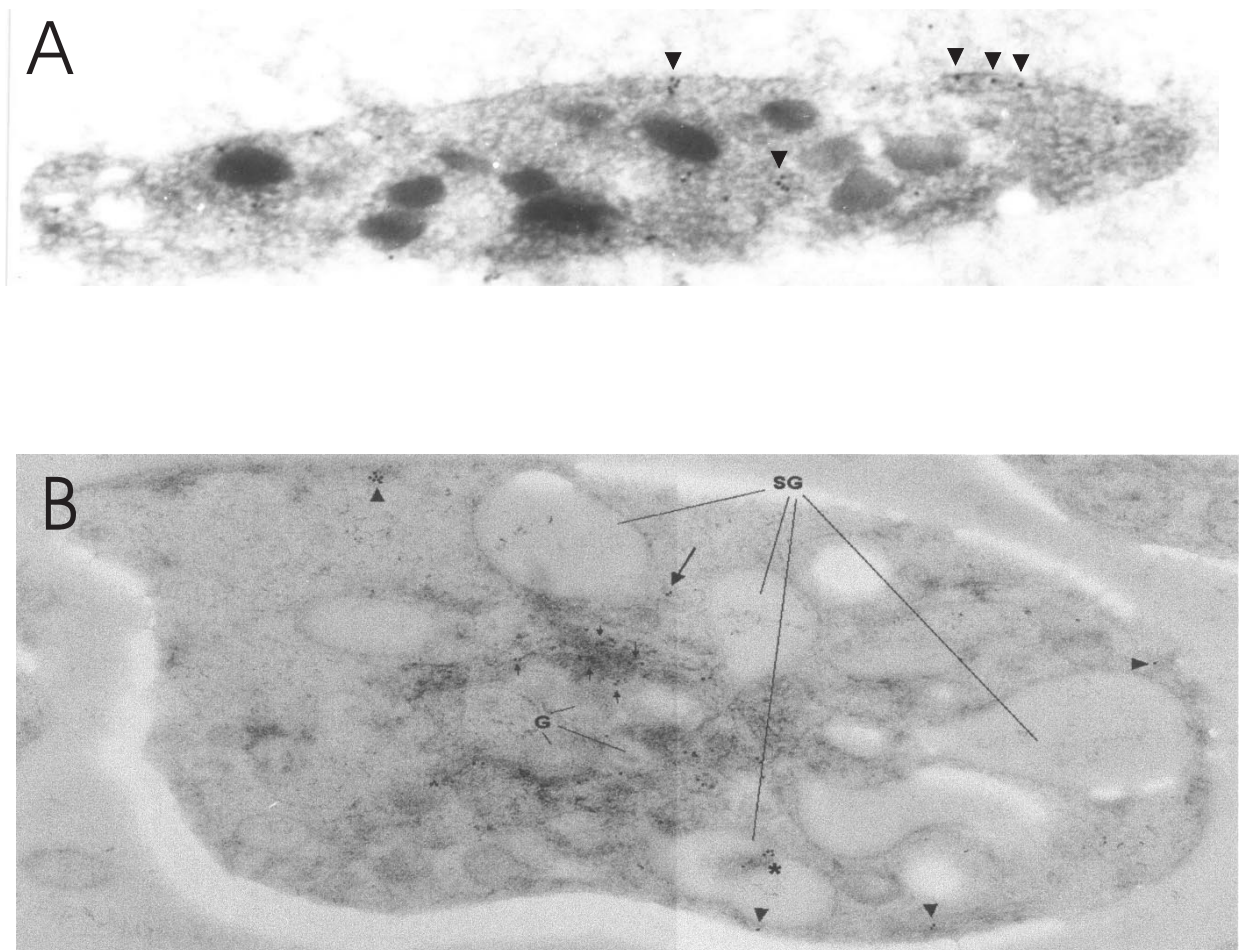


Abbildung 4.9: Immunogold-elektronenmikroskopische Detektion von CLP-36 in ruhenden (A, 58000 \times) und schwach aktivierten (B, 60000 \times) Plättchen. Die mit einem Sternchen indizierten Markierungen in (B) konnten im Folgeschnitt dem Zytoskelett zugeordnet werden. G = α -Granula, SG = α -Granula in Exocytose (CLP-36 Markierungen an der SG: langer Pfeil).

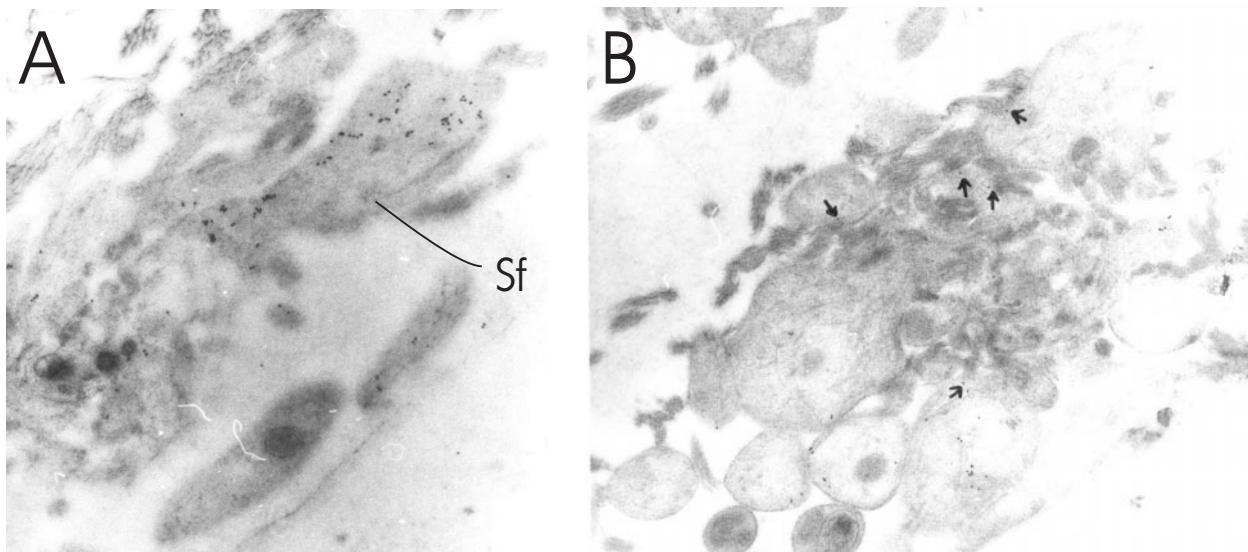


Abbildung 4.10: Immunogold-elektronenmikroskopische Detektion von CLP-36 in mit Thrombin (30 min.) stimulierten Plättchen innerhalb eines Klots (30000 \times). In (A) sind Markierungen an den Stressfasern (sf) dargestellt, die Pfeile in (B) zeigen CLP-36 Markierungen an den Fibrin/Plättchen-Kontakten.

tierte Plättchen (Abb. 4.9B) zeigen in frühen Stadien ein zentralisiertes Aktin-Myosin-Gel, Sekretion der Granula und Gestaltwandel. Hier fand sich CLP-36 auf dem zentralisierten, kontraktiven Zytoskelett (kleine Pfeile) und an membran-nahen elektronendichten Strukturen (Pfeilspitzen). Außerdem waren in der Serie häufig Markierungen in der Nähe der α -Granula (G) oder der α -Granula in Exocytose (SG) (langer Pfeil) zu sehen. In Thrombin-aktivierten Plättchen in einem fibrinreichen Gerinnsel (Abb. 4.10) war CLP-36 auf den Stressfasern (sf) verteilt (A) und an Plättchen/Fibrin-Kontakten lokalisiert (B). Eine dreidimensionale Rekonstruktion aus dreizehn seriellen Schnitten eines aktivierten Plättchens verdeutlichte die Lokalisation von CLP-36 auf dem kontraktiven Aktinzytoskelett sowie an membran-nahen Aktinfilamenten, während auf den Mikrotubuli kein CLP-36 zu finden war (Abb. 4.11).

4.5 Kolokalisation von α -Aktinin und CLP-36 in Endothelzellen und Thrombozyten

CLP-36 ist auf Aktin-Stressfasern gepunktet bzw. gebändert angeordnet. Da α -Aktinin, ein Protein, das Aktinfilamente bündelt bzw. quervernetzt, ebenfalls periodisch auf Stressfasern auftritt, wurde in Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen untersucht, ob CLP-36 und α -Aktinin in Endothelzellen kolokalisieren. Zur Detektion von α -Aktinin wurde der monoklonale Antikörper BM-75.2 eingesetzt. Dieser erkennt α -Aktinin-1 und evt. andere Isoformen von α -Aktinin, nicht jedoch α -Aktinin-4. In konfluenten, ruhenden Zellen (Abb. 4.12A,a) waren CLP-36 und α -Aktinin mit den F-Aktin-reichen Zellrändern assoziiert. In subkon-

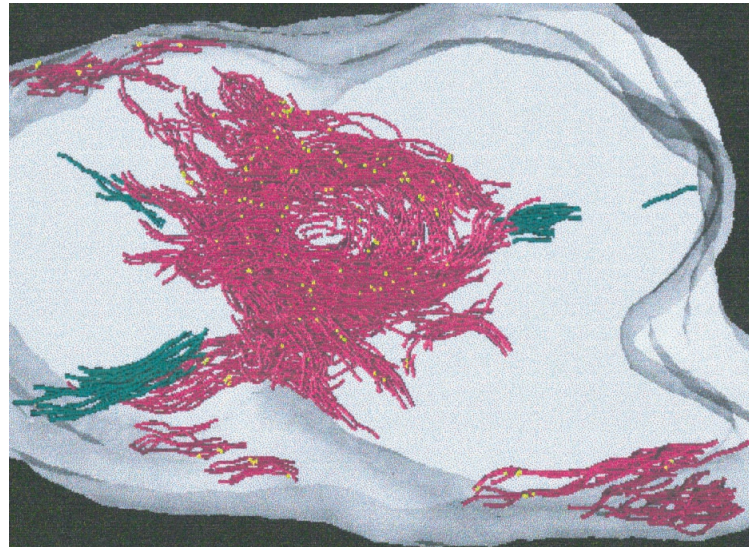


Abbildung 4.11: Computer-animierte 3D-Rekonstruktion aus 13 Schnitten eines kontaktaktivierten Plättchens; dargestellt ist das Aktomyosinskelett (rot), Mikrotubuli (grün) und immunogold-markiertes CLP-36 (gelb). Schnitt 2 ist in B, Abb. 4.9 dargestellt.

fluenten, migrierenden Zellen waren beide Proteine periodisch auf den Stressfasern verteilt (B,b) und zeigten überlappende Lokalisation (gelb in b'). An den fokalen Adhäsionen, dargestellt durch Vinkulin-Immunfluoreszenz (C), war CLP-36 ausgeschlossen (c).

In ausgebreiteten Plättchen detektierte der monoklonale Antikörper α -Aktinin nur schwach am kortikalen F-Aktinsaum sowie an den Enden der radialen Aktinfilamente, die wahrscheinlich fokale Kontakte darstellen (Abb.4.13). α -Aktinin konnte auf den radial verlaufenden Filamentbündeln nicht nachgewiesen werden. Dies könnte an dem verwendeten α -Aktinin-Antikörper liegen, der α -Aktinin in manchen Strukturen nicht erkennt (Pavalko et al., 1995b).

Außerdem wurde untersucht, ob in Plättchen und Endothelzellen eine unlängst entdeckte Isoform von α -Aktinin, das α -Aktinin-4 exprimiert ist. α -Aktinin-4 wird mit Zellbewegung und Krebsinvasion in Zusammenhang gebracht (Honda et al. 1998). Für den immunchemischen Nachweis wurde der monoklonale Antikörper NCC-Lu-632 verwendet, der freundlicherweise von Dr. Tesshi Yamada zur Verfügung gestellt wurde (Honda et al, 1998). Im Western-Blot von Thrombozyten konnte α -Aktinin-4 spezifisch detektiert werden; die Expression in HUVEC-Zellen war jedoch sehr schwach (nicht gezeigt). In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen war α -Aktinin-4 in ausgebreiteten Plättchen vor allem zentral und dort eher fokal konzentriert (Abb.4.14B). Es könnte mit der zentralisierten Granula in diesen Plättchen assoziieren. Im Vergleich zu α -Aktinin-1 zeigte α -Aktinin-4 keine ausgeprägte Kolokalisation mit CLP-36.

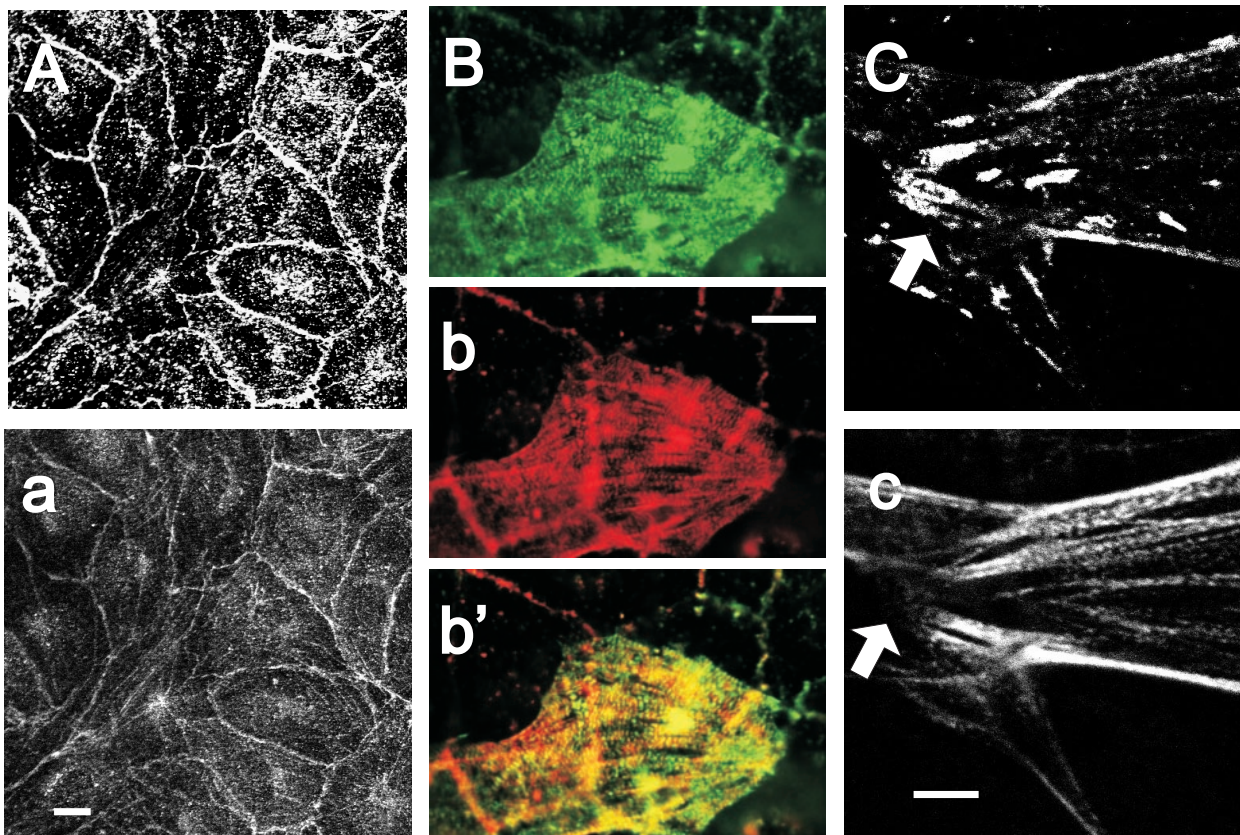


Abbildung 4.12: Vergleichende Immunfluoreszenz-Markierung von CLP-36 (a,B) und α -Aktinin (A,b) sowie CLP-36 (c) und Vinkulin (C) in konfluenten (A,a) und subkonfluenten (B,b,C,c,) HUVEC-Zellen; Alexa 568-markiertes α -Aktinin kolokalisiert mit FITC-markiertem CLP-36 an den Zellkontakten konfluenter Zellen (A,a) sowie auf den Stressfasern sich ausbreitender Zellen (B,b; Überlagerung in b') (konfokale Laser-Scanning mikroskopische Aufnahme; (A) $\times 630$, (B,C) $\times 1000$; Skalierbalken $5\ \mu\text{m}$ (A,B), $3\ \mu\text{m}$ (C).

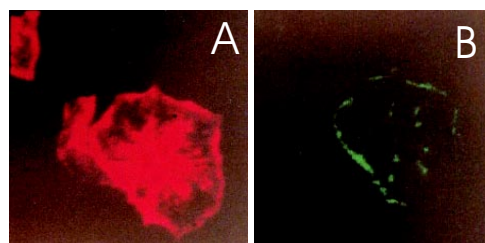


Abbildung 4.13: Immunfluoreszenz-Doppeldetektion von CLP-36 (A, Alexa 568 dye) und α -Aktinin (B, monoklonaler Anti- α -Aktinin BM-75.2, Alexa 488 dye) in fixierten ausgebreiteten Plättchen, konfokale Laser-Scanning Mikroskopie, $1000\times$.

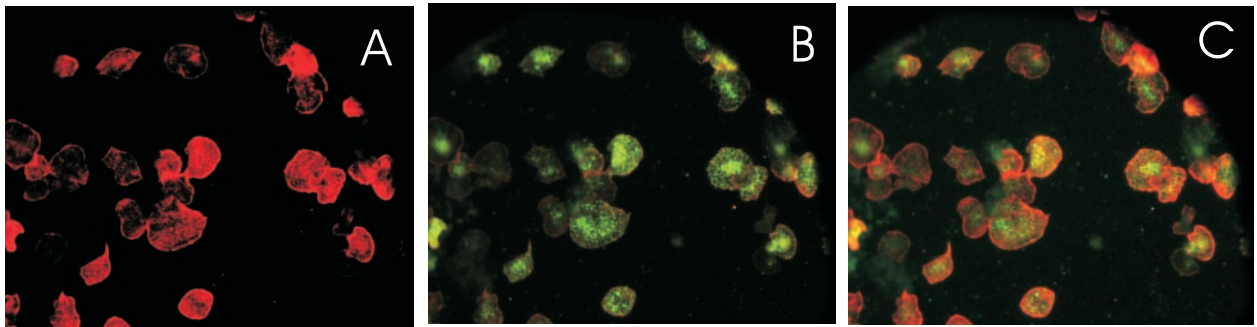


Abbildung 4.14: Immunfluoreszenzdetektion von CLP-36 (A, Alexa 568 dye) und α -Aktinin 4 (B, Alexa 488 dye) in ausgebreiteten Plättchen mit Anti-CLP-36 Ig und monoklonalem Anti- α -Aktinin 4 (NCC-Lu-632, Maus Ig M, *T. Yamada*), Überlagerung (C), konfokale Laser-Scanning Mikroskopie, 1000 \times

4.6 Koimmunpräzipitation des thrombozytären α -Aktinins mit endogenem und exogenem CLP-36

Zur Auffindung der an CLP-36 bindenden Proteine und zur Untersuchung der Phosphorylierung von CLP-36 (s. 4.12) wurde CLP-36 aus Triton-X lysierten Plättchen immunpräzipitiert (3.13.2). Die Immunpräzipitate wurden im Western-Blot untersucht. CLP-36 konnte mit dem 17-Peptid- und dem CLP-36-Antikörper (s.3.7.1) immunpräzipitiert werden, während der gegen das 14-Peptid gerichtete Antikörper kein CLP-36 präzipitierte. Durch Präinkubation des Antikörpers mit His-CLP-36 oder dem 17 AS-Peptid konnte die Präzipitation von endogenem CLP-36 kompetitiv gehemmt werden. Beide Antikörper erkennen also CLP-36 in Plättchenlysaten mit hoher Spezifität. (s. Abb.4.15)

Da CLP-36 und α -Aktinin auf Stressfasern kolokalisieren, wurde durch Immunpräzipitationen untersucht, ob die beiden Proteine physikalisch assoziiert sind. Tatsächlich konnte α -Aktinin aus Plättchenlysaten spezifisch mit CLP-36 koimmunpräzipitieren (s. Abb. 4.16A). α -Aktinin assoziierte mit CLP-36 in ruhenden und mit Thrombin (1U/ml, 1 min.) aktivierten Plättchen. Das Mengenverhältnis α -Aktinin/CLP-36 in den Immunpräzipitaten, das über eine densitometrische Auswertung der Proteinbanden in silbergefärbeten SDS-PA-Gelen oder über eine Antikörperdetektion im Western-Blot bestimmt wurde, ist für ruhende und aktivierte Plättchen gleich (verifiziert in acht unabhängigen Versuchen, Variation des Mengenverhältnisses jeweils unter 10%). Die CLP-36/ α -Aktinin Assoziation ist daher wahrscheinlich konstitutiv und unabhängig von der Zellaktivierung.

Die Serin/Threonin-Kinase PKN bindet an die "EF-hands" am C-terminus des nichtmuskulären α -Aktinin in Abhängigkeit von Ca^{2+} (Mukai et al., 1996)(s.S.8). Daher wurde überprüft, ob auch die CLP-36/ α -Aktinin Assoziation über die Ca^{2+} -bindenden EF-hands am C-terminus von α -Aktinin reguliert wird: in Plättchen, die mit dem zytosolischen Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM (60 μM) + EGTA (2 mM) inkubiert wurden (37°C, 20 min., vier unabhängige Versuche) zeigte sich jedoch kein Unterschied im Mengenverhältnis CLP-36/ α -Aktinin im Vergleich zur Kontrolle (Variation jeweils unter 5%), d.h. die Assoziation zwischen den bei-

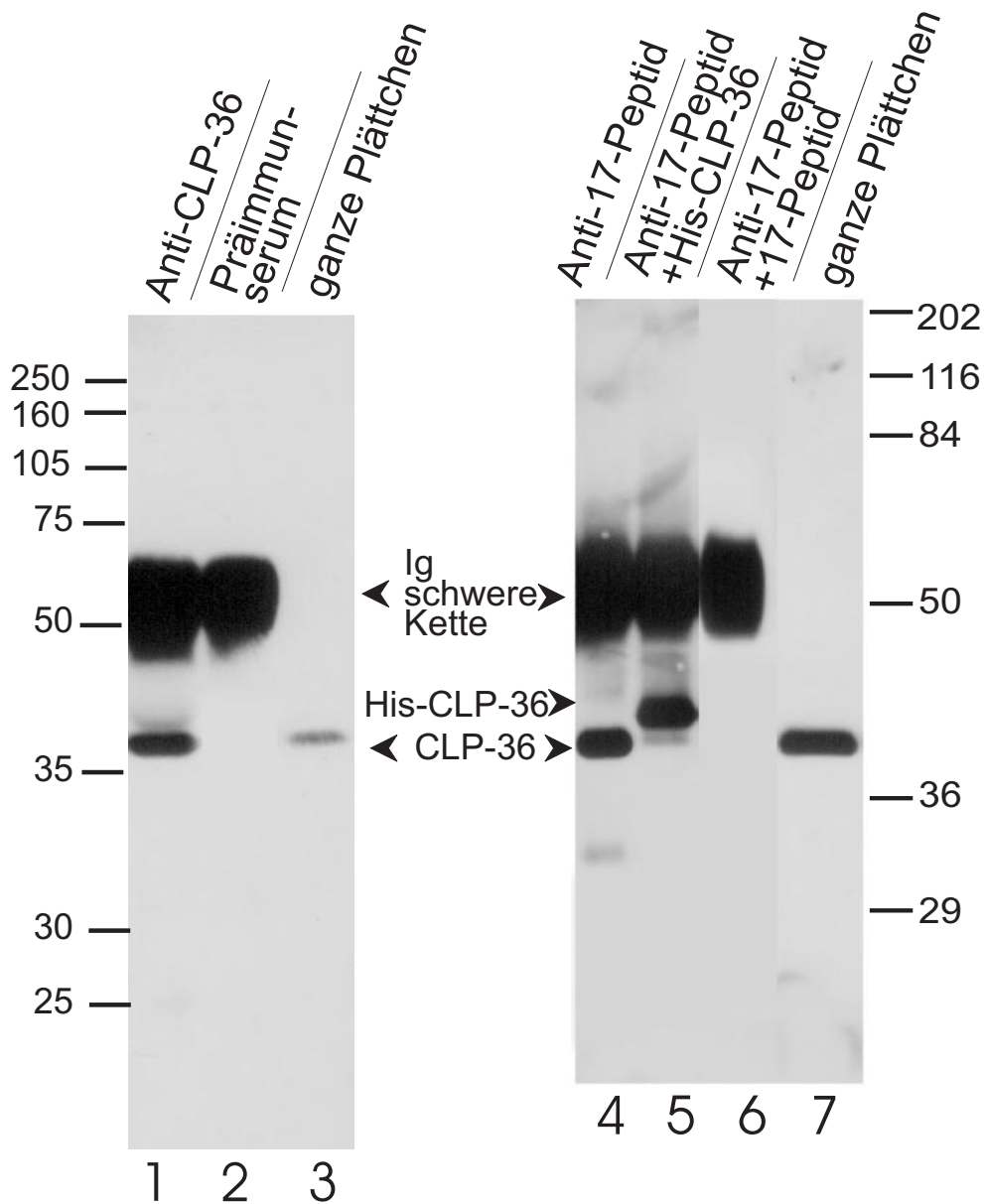


Abbildung 4.15: Western-Blot Detektion von CLP-36 in Anti-CLP-36 und Anti-17-Peptid Immunpräzipitaten aus Plättchenlysaten (1,4,5,6) und Detektion von CLP-36 in ganzen Plättchen, die direkt in Laemmli-Puffer aufgenommen wurden (3,7). Als Kontrolle wurde Präimmuns- serum verwendet (2), oder der 17-Peptid Antikörper wurde für 1 h mit 160 μ g 17-Peptid (6) bzw. 50 μ g His-CLP-36 (5) präinkubiert.

den Proteinen findet Ca^{2+} -unabhängig statt.

Außerdem wurde untersucht, ob die Assoziation von CLP-36 mit α -Aktinin auch im Zytosol besteht. Das Alkaloid Cytochalasin D inhibiert die Aktinpolymerisation und induziert eine Depolymerisation von Aktinfilamenten in Plättchen (Casella et al., 1981). Aus Plättchen, die mit Cytochalasin D inkubiert wurden ($2 \mu\text{M}$, Zugabe 1-2 min. vor Lyse, sechs unabhängige Versuche), konnte dieselbe Menge α -Aktinin kopräzipitiert werden. Da α -Aktinin nicht mehr an Cytochalasin-D aggregiertes F-Aktin bindet (Khoory und Svoboda, 1993), läßt sich folgern, daß die Assoziation von CLP-36 mit α -Aktinin von dessen Bindung an F-Aktin unabhängig ist. CLP-36 und α -Aktinin scheinen also auch im Zytosol als Komplex vorzuliegen.

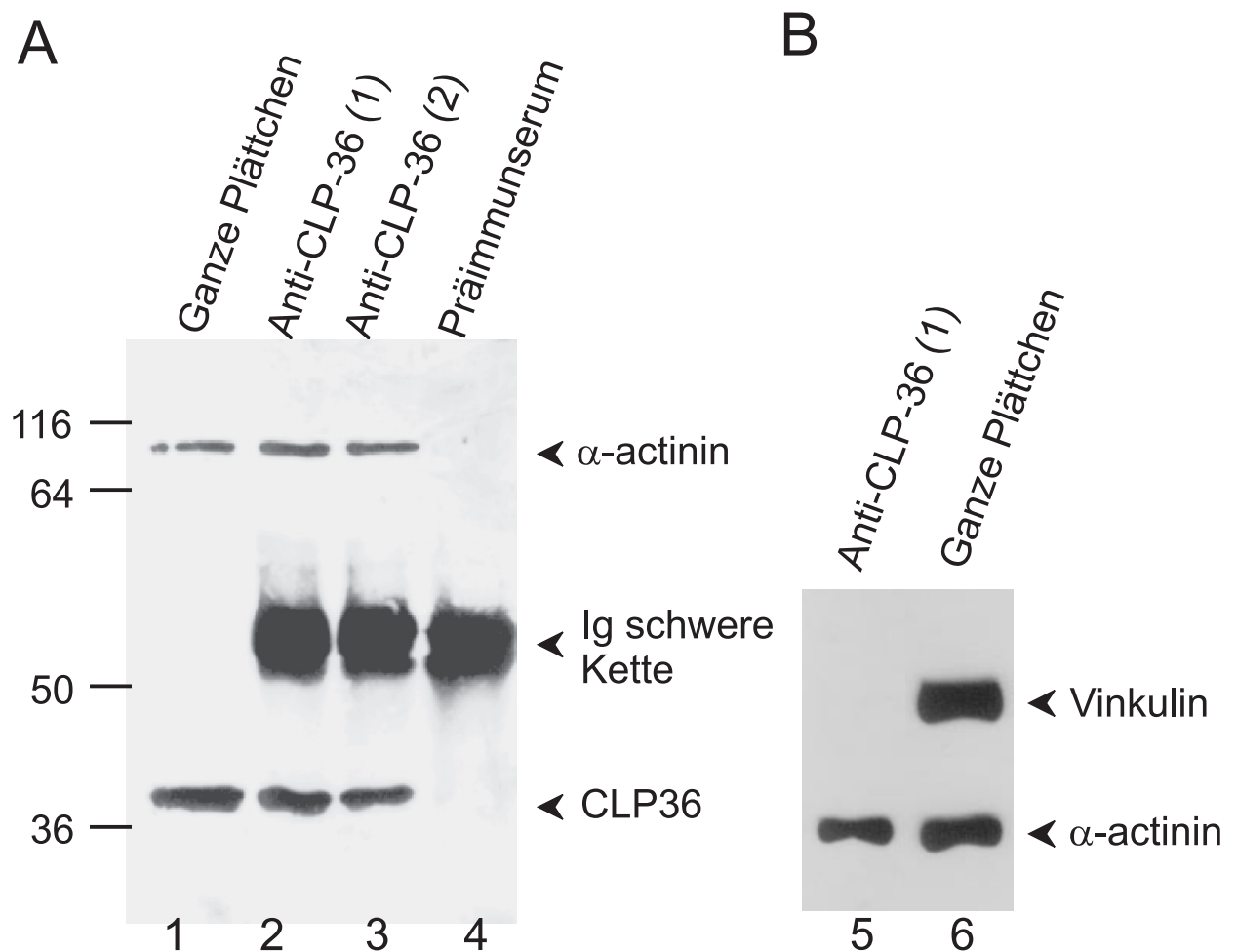


Abbildung 4.16: Western-Blot Detektion von CLP-36 (1-4), α -Aktinin (1-6) und Vinkulin (5,6) in Anti-CLP-36 Immunpräzipitaten (2,3,5) aus Plättchenlysaten. In der Kontrolle mit unspezifischem Präimmenserum (4) wurde kein CLP-36 oder α -Aktinin präzipitiert. In CLP-36 Immunkomplexen findet sich kein Vinkulin (5); für die Immunpräzipitation wurden zwei verschiedene Antiseren benutzt (bezeichnet als (1) und (2)) und für die Detektion von α -Aktinin der monoklonale Antikörper aus Klon BM-75.2.

Um weitere mit CLP-36 kopräzipitierende Proteine zu finden, wurden CLP-36-Immunpräzipitate aus Plättchenlysate über ein SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine silbergefärbt. Ein Vergleich des Anti-CLP-36 Immunpräzipitats mit der Präimmenserumkontrolle zeigte, daß außer einem 105 kDa Protein, das wahrscheinlich α -Aktinin darstellt (s. oben), noch ein weiteres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 27 kDa (Pfeilspitze) spezifisch mit CLP-36 kopräzipitierte (Abb.4.17, Spur 3,4).

In Immuno-*pull-down* assays wurden Plättchenlysate mit den *His-tag*-Fusionsproteinen His₆-CLP-36, His₆-CLP-36 Δ LIM (AS 1-257) und His₆-LIM (AS 258-329) inkubiert, die relativ zum endogenem CLP-36 in einem ca. 5-fachem Überschuß zugegeben wurden; die Fusionsproteine wurden mit dem gegen den His-tag gerichteten polyklonalen Antikörper Anti-RGSHHHH präzipitiert. Hierdurch sollten ebenfalls mit CLP-36 kopräzipitierende Proteine entdeckt werden und ermittelt werden, welche Proteindomänen aus CLP-36 an der Interaktion mit α -Aktinin beteiligt sind; da der für die Präzipitation verwendete Antikörper nur gegen den *his-tag* gerichtet ist, können auch Proteine, die evt. bei Verwendung des polyklonalen Anti-CLP-36 Antikörpers (s.o.) aus ihrer Bindung an CLP-36 verdrängt werden, assoziiert bleiben und daher kopräzipitieren.

In den *pull-down* Immunpräzipitaten war außer CLP-36 auch die deletierte Form von CLP-36, die keine C-terminale LIM-Domäne besitzt (CLP-36 Δ LIM), in der Lage, mit α -Aktinin zu assoziieren, während mit der LIM-Domäne allein (His₆-LIM) kein α -Aktinin kopräzipitiert wurde (Abb.4.17; A,B). Eine quantitative Auswertung des Verhältnisses *His-tag*-Fusionsprotein/ α -Aktinin durch densitometrische Ausmessung der silbergefärbten Proteinbanden ergab, daß die Deletionsmutante CLP-36 Δ LIM nur 52 % der α -Aktinin Menge kopräzipitierte, die durch die entsprechende molare Menge des CLP-36 präzipitiert wurde. Ein Grund dafür könnte sein, daß das CLP-36 *in vitro* eine höhere Affinität zu α -Aktinin aufweist als die deletierte Form CLP-36 Δ LIM. Das *His-tag*-LIM-Domäne Fusionsprotein His₆-LIM scheint keine Affinität zu α -Aktinin zu besitzen, allerdings konnte ein Protein von ca. 20 kDa gefunden werden, das spezifisch mit His₆-LIM kopräzipitiert (Sternchen in Abb.4.17B). Hierbei könnte es sich um ein mit der LIM-Domäne assoziiertes Polypeptid handeln.

His₆-CLP-36 und His₆-CLP-36 Δ LIM waren in den Immuno-*pull-down* Versuchen neben α -Aktinin auch mit Aktin (42 kDa) und höhermolekularen Proteinen assoziiert (Abb.4.17, Spuren 5,6). Aktin war im Anti-His₆-CLP-36 Präzipitat überproportional stark angereichert. CLP-36 könnte also eventuell auch eine Affinität zu F-Aktin besitzen. In den Immunpräzipitaten mit dem Anti-CLP-36-Antikörper (Abb.4.17,Spur 3) fand sich kein spezifisch assoziiertes Aktin. Ein Grund hierfür könnte sein, daß der CLP-36 Antikörper eine genügend hohe Avidität besitzt, um Aktin aus seiner Bindung an CLP-36 zu verdrängen.

4.7 Koordinierte Translokation von CLP-36 und α -Aktinin an das Zytoskelett aktivierter Thrombozyten

Aus praktischen Erwägungen wurde das Zytoskelett definiert als Komponente, die in detergent-lysierten Zellen bei physiologischer Ionenkonzentration unlöslich ist. Das bei 15000 g pelletierbare filamentöse F-Aktin enthält das zytosolische Zytoskelett bestehend aus den

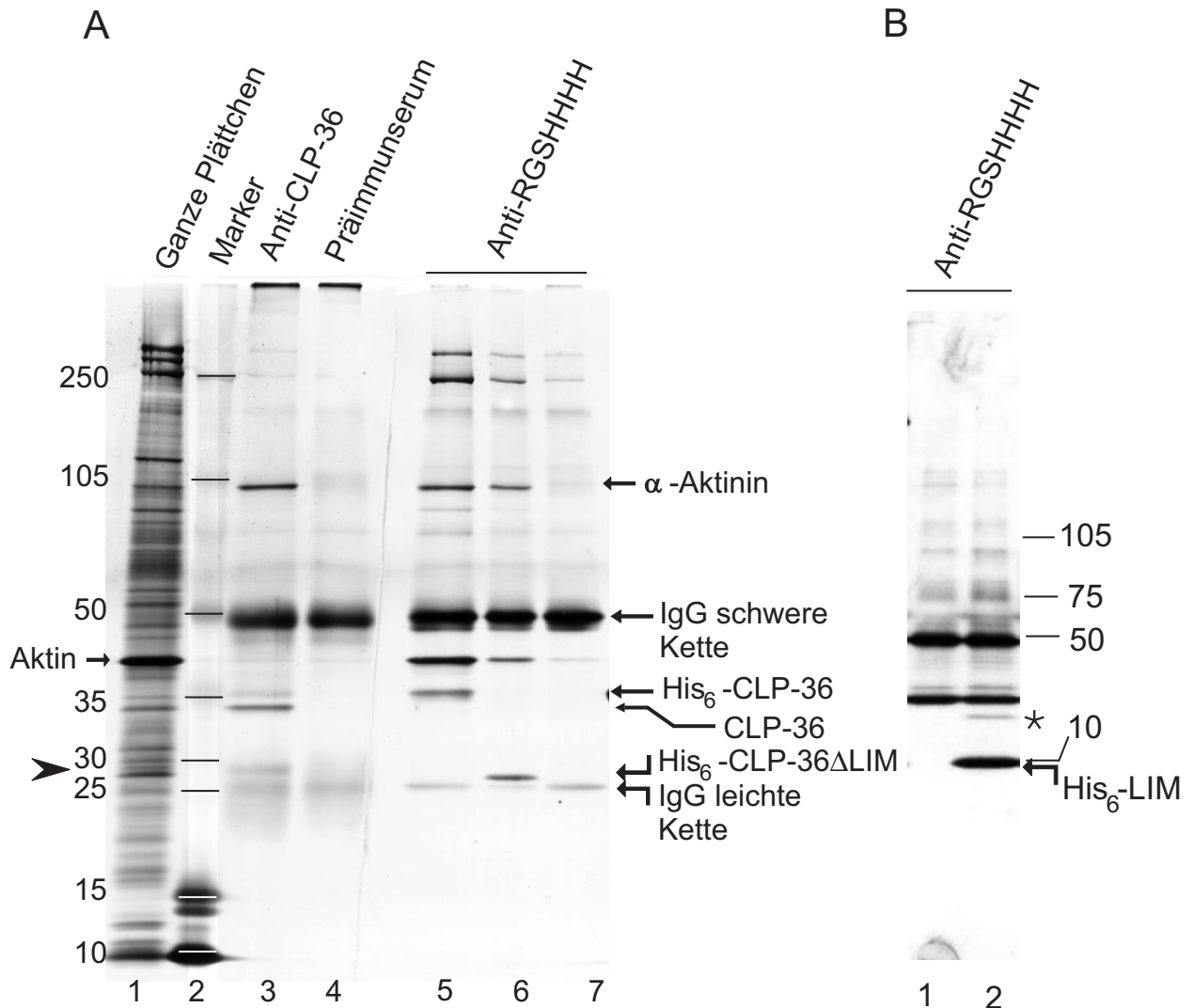


Abbildung 4.17: Protein-Silberfärbung im SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (5%-20%T) zur Detektion von Proteinen, die mit CLP-36 kopräzipitieren. Es wurde ein Anti-CLP-36 Immunpräzipitat (Spur 3) mit Spezifitätskontrolle (Spur 4) sowie Anti-RGSHHHH Immunpräzipitate (A: Spur 5,6,7; B) und Plättchen-Gesamtprotein ("ganze Plättchen", Spur 1) aufgetragen; für Immuno-*pull-down* Experimente wurden die Lysate ruhender Plättchen vor Zugabe des Anti-RGSHHHH (Maus IgG₁) 1 h mit je 10 μ g His₆-CLP-36 (Spur 5), His₆CLP-36 Δ LIM (AS 1-257, Spur 6) oder His₆LIM (AS 258-329, B: Spur 2) inkubiert. Zu den Kontrollen wurde kein *His-tag* Protein zugegeben (A: Spur 7, B: Spur 1); full-range Marker (Amersham), Spur 2; alle Proteine in A sind aus demselben Lysat unter identischen Versuchsbedingungen präzipitiert worden.

langen, kreuzvernetzten Aktomyosinfilamenten mit den assoziierten Proteinen. Das formstabilisierende Membranskelett (Fox et al., 1988) verläuft unterhalb der Plasmamembran, enthält kürzere, schwächer kreuzvernetzte Aktinfilamente, und kann durch Zentrifugation des 15000 g-Überstandes bei 100000 g pelletiert werden. In aktivierten Plättchen ist es mit Glykoproteinen der Plasmamembran, Proteinkinasen und anderen für die Signaltransduktion bedeutsamen Proteinen assoziiert (s.S.5). Als löslich, vollständig durch Triton X-100 extrahierbar werden Bestandteile angesehen, die nach Ultrazentrifugation bei hoher G-Zahl (100000 g, 2.5 h) nicht sedimentieren. Dazu zählt das monomere G-Aktin sowie die im Zytosol gelöste Subpopulation der Zytoskelettproteine.

Es wurde untersucht, mit welchen Zytoskelettfractionen CLP-36 assoziiert ist. Eine Analyse der Proteinfractionen im Western-Blot zeigte, daß CLP-36 in den Triton X-100 Lysaten ruhender Plättchen im Zytoskelett und im Membranskelett zu finden ist (Zeitpunkt 0 in 4.18, Abb.3.8). Anteilsmäßig ist es dort entsprechend dem Aktin Gehalt in den einzelnen Fractionen vertreten. Außerdem besteht eine Korrelation zu dem Gehalt an α -Aktinin.

In Plättchen, in denen durch Stimulation mit dem Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptid SFLLRNP (TRAP) die Aktinpolymerisation zunahm, wurden CLP-36 und α -Aktinin koordiniert an den wachsenden 15000 g F-Aktin-Pool rekrutiert (Abb.3.8). Die TRAP-induzierte Aktinpolymerisation ist reversibel und beide Proteine dissoziierten wieder von dem depolymerisierenden, fragmentierenden Aktinfilamentsystem. Dieser Verlauf ließ sich in 7 unabhängigen Experimenten wiederholen. CLP-36 gelangte wahrscheinlich aus dem Triton X-100 löslichen Zytosol an das 15000 g Zytoskelett, da die CLP-36 Menge am 100000 g Membranskelett unverändert blieb. Die Menge des translozierten CLP-36 war jedoch gering, so daß in der zytosolischen Fraction (100000 g Überstand) keine Abnahme des CLP-36-Signals gezeigt werden konnte. Auch bei max. Aktivierung durch TRAP nach 90 sec. finden sich nur weniger als 5 % des gesamten CLP-36 im 15000 g Zytoskelett. Aufgrund der relativ geringen CLP-36 Konzentration im 15000 g Pellet war es notwendig, auszuschließen, daß CLP-36 artifiziell im pelletierten Zytoskelett eingeschlossen wurde. Dafür wurden die 15000 g Aktinzytoskelette in einem KI-haltigen Puffer kontrolliert depolymerisiert und durch Zentrifugation bei 40000 g die keratinhaltigen Intermediärfilamente abgetrennt. Der Überstand mit dem gelösten Aktin und den Aktin-assoziierten Proteinen wurde gegen ein Mg^{2+} -haltiges Puffersystem, das eine Repolymerisierung erlaubt, dialysiert. Das repolymerisierte F-Aktin mit den assoziierten Proteinen wurde zentrifugiert. CLP-36 und α -Aktinin waren im Sediment angereichert, sind also spezifisch mit dem Zytoskelett in aktivierten Plättchen assoziiert (Abb. 4.18B). Auf eine quantitative Auswertung des Aktin- bzw. CLP-36-Gehalts in den Fractionen wird hier verzichtet, da es unter den Lysebedingungen zu verschiedenartigen Artefakten in der Löslichkeit der Zytoskelettkomponenten kommen kann und deshalb nur unzureichend die *in vivo* Situation wiedergeben werden kann. Der geringe Anteil des zytoskelettassoziierten CLP-36 in den Lysaten aktivierter Plättchen steht nicht im Einklang mit der Lokalisation von CLP-36 *in situ* in aktivierten Plättchen (vgl. Abb. 4.11, S.75), denn dort konnte CLP-36 nur am Aktinzytoskelett, nicht aber im Zytosol detektiert werden. Es ist daher wahrscheinlich, daß durch die Lyse die Assoziation von CLP-36 mit dem Zytoskelett gestört wird.

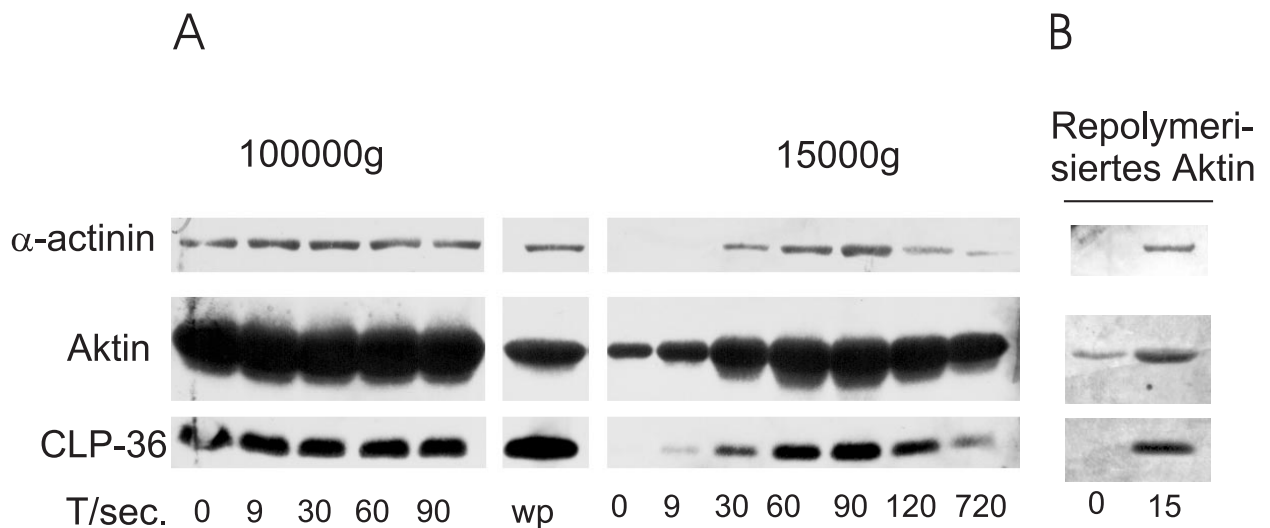


Abbildung 4.18: Immunoblot-Analyse des zytosolischen Zytoskeletts (15000 g Sediment) und des Membranskeletts (100000 g Sediment) nach verschiedenen Zeitpunkten der Aktivierung durch TRAP (A); die Aktivierung wurde abgestoppt durch Zugabe von Triton X-100/EGTA haltigem 2×Lysepuffer II (s.3.8)(30 min., 4°C). CLP-36 assoziiert mit beiden Fraktionen und korreliert quantitativ mit dem Gehalt an Aktin und α -Aktinin. CLP-36 und α -Aktinin assoziieren spezifisch mit *in vitro* repolymerisiertem Aktin aus der 15000 g Fraktion (B). Anti-Aktin- und anti- α -Aktinin Antikörper wurden je 1:5000 verdünnt.

4.8 Kartierung der α -Aktinin-1 / CLP-36 Interaktion mit dem *Yeast two-hybrid* System

Die vorher beschriebenen immunochemischen Versuche wiesen darauf hin, daß CLP-36 und α -Aktinin assoziiert sind. Ob die beiden Proteine direkt aneinander binden und welche Regionen diese Interaktion ermöglichen, sollte mit Hilfe eines gerichteten *Yeast two-hybrid* Ansatzes geklärt werden. Verschiedene Domänen aus α -Aktinin-1, das aus einer Endothelzell-cDNA-Bank kloniert wurde, dienten als Vorlage zur Konstruktion der AD(Aktivierende Domäne)-Fusionsproteine ("prey"). Die DBD(DNA-Bindende Domäne) wurde mit Domänen aus CLP-36 fusioniert ("bait")(Abb.4.20A). Um zu überprüfen, ob die Hefezellen das transfizierte Fusionsprotein exprimieren, wurden Proteinextrakte hergestellt und diese im Western-Blot analysiert. Die Fusionsproteine DBD-CLP-36 Δ LIM, DBD-CLP-36_(AS 1-82) und DBD-CLP-36_(AS 1-104) konnten im Immunoblot nachgewiesen werden, während DBD-CLP-36, AD- α -Aktinin-1 und DBD-CLP-36_(AS 1-127) nicht detektiert werden konnten (Abb. 4.21).⁴

⁴Die Expression des "bait"-Vektor-kodierten Fusionsproteins DBD-LIM_(AS 258-329) in Y190 wurde von Dr. Marcus Otte untersucht. Auf Höhe des zu erwartenden Molekulargewichts von etwa 25 kDa konnte er im Western-Blot mit dem Anti-CLP-36 Antikörper und den Anti-Peptid Antikörpern (s. 3.7.1) in fünf unabhängigen Versuchen kein DBD-LIM nachweisen. Der DBD-LIM kodierenden "bait"-Vektor wurde von Marcus Otte dazu verwendet, eine humane HeLa *Matchmaker* cDNA-Bank (Clontech) durchzumustern, um Proteine zu fischen, die an die LIM-Domäne binden. Dieser Screen erbrachte aber keine Klone mit positiven

Die "bait"- und "prey"-Konstrukte wurden in verschiedenen Kombinationen simultan in Stamm Y190 transformiert und auf LEU⁻TRP⁻SD Agar ausplattiert, auf dem nur Klone mit beiden *two-hybrid* Plasmiden wachsen können. Positive *two-hybrid* Interaktionen wurden durch Bestimmung der *LacZ*-Reportergenaktivität im β -Galaktosidase Assay detektiert (Abb.4.20B). Hierdurch ließ sich der für die Interaktion verantwortliche Bereich im α -Aktinin-1 Molekül eingrenzen auf die *spectrin-like repeats* 2 und 3 (AS 364-599); dieser Abschnitt im Mittelteil des Moleküls war hinreichend für eine Interaktion mit CLP-36. Die Interaktion wird nicht über die LIM-Domäne von CLP-36 vermittelt, da das trunkierte CLP-36 Δ LIM (AS 1-256) ebenfalls zur Interaktion fähig war; der für die Interaktion verantwortliche Bereich in CLP-36 ließ sich weiter eingrenzen auf den Mittelteil des Moleküls (AS 81-256), der weder die LIM- noch die PDZ-Domäne enthielt. Obwohl kein direkter Zusammenhang zwischen der β -Galaktosidase-Aktivität und der Dissoziationskonstante einer Interaktion besteht (Estojak et al., 1995), so läßt sich dennoch annehmen, daß die CLP-36_{AS81-256}/Spec 2-3 Interaktion hochaffin ist, da die Geschwindigkeit und Intensität der Blaufärbung z.T. die der positiven Kontrollinteraktion p53/SV40-large-T-Antigen übertraf (markiert durch "+++", Abb.4.19). Auf eine genauere Quantifizierung der β -Galaktosidase Aktivität in Flüssigkulturen wurde verzichtet, da im Western-Blot nicht nachgewiesen werden konnte (s.o.), daß die Hybrid-Proteine in vergleichbarer Menge in der Zelle exprimiert wurden. Die schwache Reportergen-Expression in den α -Aktinin-1/CLP-36 bzw. α -Aktinin-1/CLP-36_{AS1-256} Klonen könnte auf die geringe, im Western-Blot nicht detektierbare Expression von α -Aktinin-1-AD zurückzuführen sein. α -Aktinin ist ein stabförmiges Molekül, das über die *spectrin-like repeats* 2 und 3 dimerisiert (Dijinović-Carugo et al., 1999). Es ist daher unwahrscheinlich, daß die *spectrin-like repeats* 2 und 3 im α -Aktinin-Molekül maskiert sind und aus diesem Grunde α -Aktinin schwächer mit dem Mittelteil von CLP-36 interagiert als die isolierten *spectrin-like repeats* 2 und 3.

Das *Yeast two-hybrid*-System konnte in diesem Fall nicht zur Abschätzung der relativen Bindeaffinitäten herangezogen werden, da das CLP-36 Δ LIM-BD Hybridprotein offenbar stärker exprimiert wurde als CLP-36-BD. Außerdem konnte die Expression der spektrin-artigen Wiederholungen durch den monoklonalen Antikörper nicht überprüft werden, da nicht bekannt ist, welches Epitop dieser Antikörper in α -Aktinin erkennt. Zur Kontrolle wurde auch die Expression des zweiten Reportergens HIS3 überprüft. Die im β -Galaktosidase-Assay getesteten Klone wurden dazu auf SD(Leu⁻, Trp⁻, His⁻)-Medium + 30 mM 3-AT überimpft, auf dem nur Klone mit positiver *two-hybrid*-Interaktion wachsen können. Nur die Klone, die eine *lacZ* Reportergenaktivität zeigten, wuchsen auf dem His⁻-SD-Agar innerhalb von 2-3 Tagen, wobei hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit und Koloniegröße keine Unterschiede auftraten. Die α -Aktinin-Transformanten, die eine grenzwertige β -Galaktosidase Aktivität zeigten (Abb.4.20), wuchsen nicht auf dem Selektivmedium.

Die Aktivität beider Reportergene war also vergleichbar. Die Abgrenzung negativer von positiven *two-hybrid*-Interaktionen war mit beiden Assays eindeutig möglich, denn die mit "-" bezeichneten negativen Interaktionen zeigten nach einer ÜN-Inkubation mit dem X-Gal Substrat keinerlei Blaufärbung und wuchsen auch nach verlängerter Inkubation (mehr als 3 Tage) nicht auf dem selektivem SD-Medium.

two-hybrid Interaktionen.

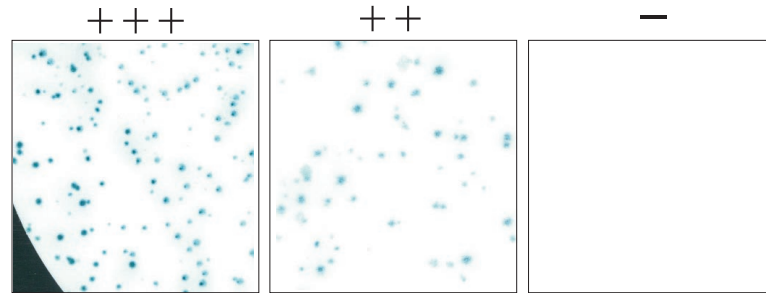


Abbildung 4.19: β -Galaktosidase Filter-Assay. Beispielhafte Darstellung von “+++“ (CLP-36_{AS1–256}/Spec 2-3), “++“ (CLP-36/Spec 2-3) und “-“ (CLP-36_{AS257–329}/Spec 1-3) Interaktionen; Aufnahme nach 10 h Inkubation mit X-Gal.

4.9 Affinitätsblotting mit biotinyliertem CLP-36 (*Blot-overlay assay*)

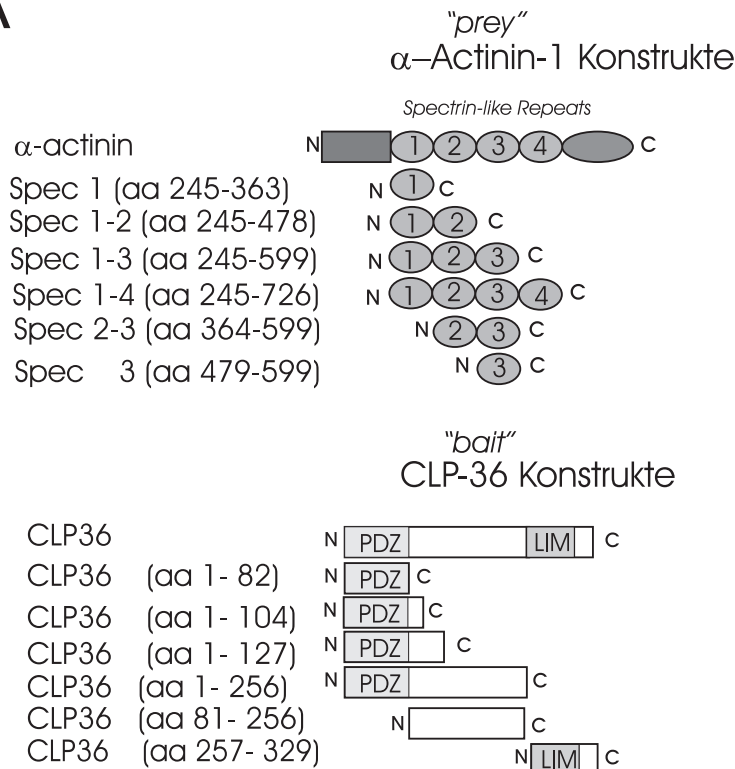
Für den *Blot-overlay assay* wurde rekombinantes Polyhistidin-CLP-36-Fusionsprotein (His₆-CLP-36) exprimiert und dieses über eine Ni-NTA Affinitätsmatrix angereichert und durch Gelfiltration und Anionenaustausch-Chromatographie (s.3.15) bis zur Homogenität gereinigt. Aus 1 l Bakterienkultur konnte 1 mg His₆-CLP-36 gewonnen werden. Die Präparation enthielt neben dem His₆-CLP-36 ein N-terminales His₆-CLP-36-Fragment von etwa 30 kDa, das aufgrund seiner ähnlichen chemischen und physikalischen Natur nicht vollständig abgetrennt werden konnte (Abb.4.22 *links*).

Da CLP-36 die Proteininteraktions-Domänen LIM und PDZ enthält, für die noch kein Interaktionspartner gefunden wurde, wurde das gereinigte His₆-CLP-36 biotinyliert und im *Blot-overlay assay* (s.3.17) als Sonde eingesetzt, um auf geblottetem Thrombozytenprotein neben α -Aktinin weitere interagierende Proteine zu finden. Es wurde gefunden, daß biotinyliertes His₆-CLP-36 spezifisch mit einer 105 kDa Proteinbande interagiert. Diese Bande komigrierte mit α -Aktinin (Abb.4.23). Da gezeigt werden konnte, daß CLP-36 eine positive *two-hybrid* Interaktion mit α -Aktinin eingeht (s.oben), ist anzunehmen, daß es sich bei der 105 kDa Bande um α -Aktinin handelt. Es kann also auch rekombinantes CLP-36 an α -Aktinin binden, d.h. es sind für die Interaktion keine posttranslationalen Modifikationen von CLP-36 nötig. Für die LIM-Domäne konnte mit biotinyliertem GST-LIM-Domäne-Fusionsprotein keine spezifische Interaktion gefunden werden.

Die unterhalb von 105 kDa auftretenden Banden wurden unspezifisch von allen biotinylierten Proteinen erkannt, was wahrscheinlich auf Wechselwirkungen der geblotteten Proteine mit der Biotinmarkierung zurückzuführen ist. Weniger stringente Versuchsbedingungen, d.h. höhere Konzentrationen an biotinyliertem Protein in der *Overlay*-Lösung, die Inkubation der Membran mit biotinyliertem CLP-36 ohne Verwendung von DTT oder eine längere Exposition des ECL-Films, führten zu einer Verstärkung des unspezifischen Hintergrunds, aber nicht zur Auffindung anderer spezifisch interagierender Proteine.

CLP-36 band im *Blot-overlay assay* mit gleicher Affinität an das α -Aktinin aus ruhenden

A



B

	α-actinin	Spec 1	Spec 1-2	Spec 1-3	Spec 1-4	Spec 2-3	Spec 3
CLP36	(+)	-	-	++	n.t.	++	n.t.
CLP36 (aa 1-82)	-	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.
CLP36 (aa 1-104)	n.t.	n.t.	n.t.	-	n.t.	n.t.	n.t.
CLP36 (aa 1-127)	n.t.	n.t.	n.t.	-	n.t.	n.t.	n.t.
CLP36 (aa 1-256)	(+)	-	-	+++	++	+++	-
CLP36 (aa 81-256)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+++	n.t.
CLP36 (aa 257- 329)	-	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.

Abbildung 4.20: (A) Schematische Darstellung der *yeast two-hybrid* "bait" und "prey" -Proteine CLP-36 bzw. α-Aktinin-1 sowie deren Teilsequenzen. (B) Test der LacZ-Reportergenexpression der *two-hybrid* Transformanten über einen β-Galaktosidase Filter-Assay; "-" keine blauen Klone, "(+)" Klone werden erst nach über 8 h Inkubation blau, "++" und "+++" beginnende Blaufärbung nach etwa 30 min., Färbung bei "+++" intensiver als mit der positiven Kontrollinteraktion p53/SV40-large T-Antigen.

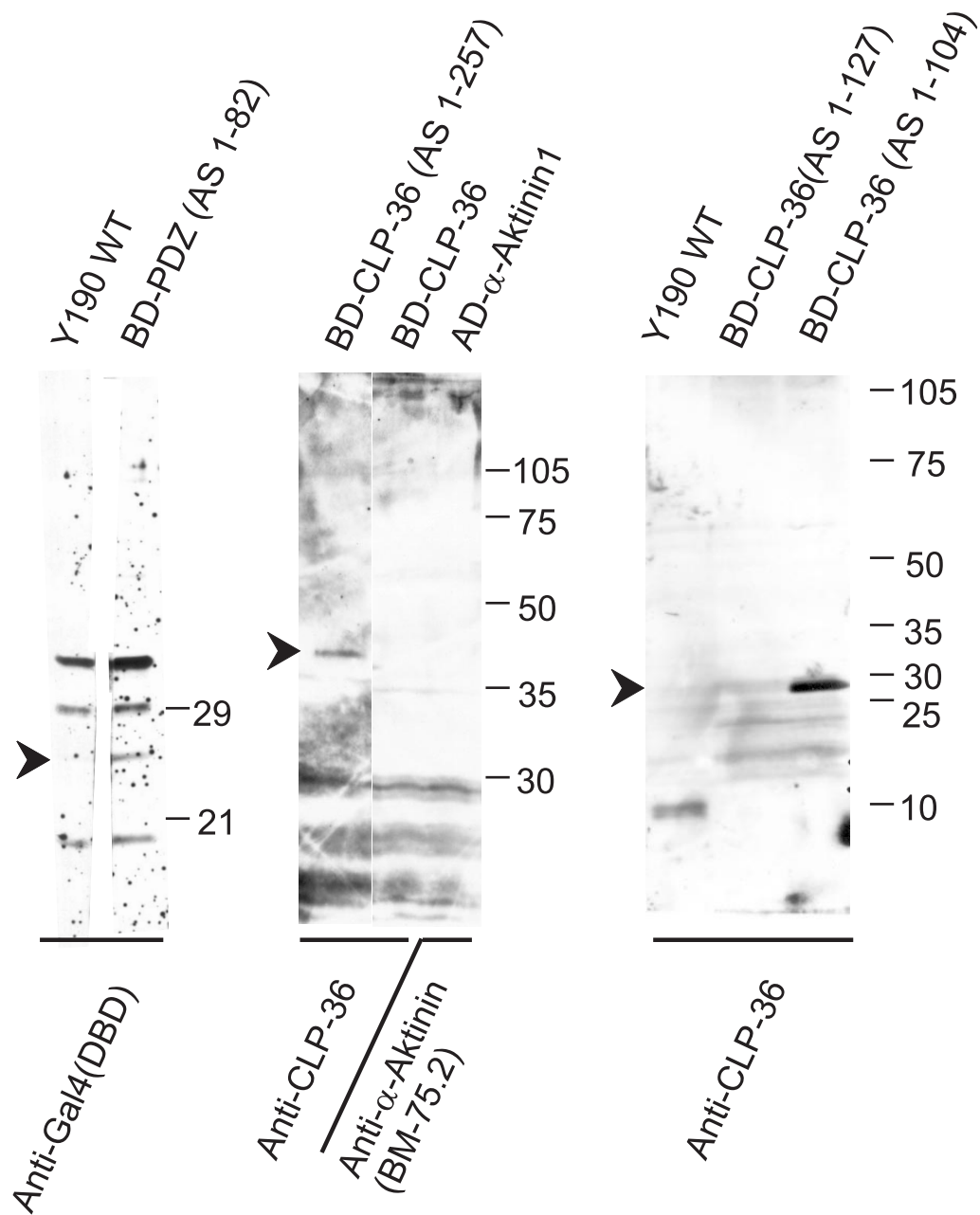


Abbildung 4.21: Expression der Fusionsproteine, die für einen gerichteten yeast two-hybrid Screen eingesetzt wurden. Verglichen wurden die Proteinextrakte aus Y190 Wildtyp (WT) Zellen mit plasmidhaltigen Zellen gleicher Zellzahl. Angegeben sind die DBD- und AD-Fusionsproteine, die zur Expression gebracht werden sollten (oben), sowie die Antikörper, die für die Detektion dieser Proteine im Western-Blot eingesetzt wurden (unten). Theoretisches Molekulargewicht der Fusionsproteine: DBD-PDZ: 26 kDa, DBD-CLP-36_(AS 1-104): 29 kDa, DBD-CLP-36_(AS 1-127): 31 kDa, DBD-CLP-36: 53 kDa, AD- α -Aktinin-1: 121 kDa.

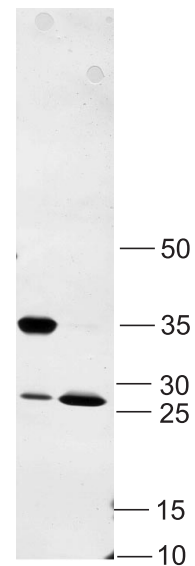


Abbildung 4.22: Pool der Polyhistidin-Fusionsproteine His₆-CLP-36 (links) und His₆-CLP-36 Δ LIM (rechts) nach Reinigung über Ni-NTA-Agarose, Gelfiltration und Anionenaustausch-Chromatographie; Protein-Silberfärbung im SDS-PA-Gel, full-range Marker (Amersham).

und aktivierten Plättchen (1 U/ml Thrombin, 30 Sek.) (Abb.4.23, Spur 3,4). Es ist daher unwahrscheinlich, daß die Bindung von α -Aktinin an CLP-36 aktivierungsabhängig durch eine kovalente Modifikation der CLP-36-bindenden spectrin-like repeats (s.4.8) reguliert wird.

Um zu untersuchen, ob das rekombinante CLP-36 mit sich selbst dimerisieren kann, wurde His₆-CLP-36 und His₆-CLP-36 Δ LIM, das analog zu His₆-CLP-36 gereinigt wurde (Abb.4.22), direkt auf eine Nitrocellulose-Membran getropft und mit biotinyliertem His₆-CLP-36 überlagert. Biotinyliertes CLP-36 konnte an keinem der beiden Protein-*Spots* detektiert werden, das rekombinante CLP-36 scheint also keine Homodimere ausbilden zu können (Abb.4.23).

4.10 Mikroinjektion von Anti-CLP-36 Antikörper in Endothelzellen

Mit dem Ziel, CLP-36 *in vivo* durch spezifische Antikörper zu blockieren, d.h. das an Stressfasern gebundene CLP-36 von diesen abzulösen und damit funktionslos zu machen, wurde der affinitätsgereinigte polyklonale Anti-CLP-36 Antikörper in subkonfluente Endothelzellen mikroinjiziert und die Zellen 2-5 h mit dem Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, und das Aktinzytoskelett sowie der injizierte Antikörper fluoreszentmarkiert, um die Auswirkungen der Antikörperinjektion auf das Aktinzytoskelett zu untersuchen. Der Anti-CLP-36 Antikörper war meistens diffus, manchmal aggregiert in den fixierten, injizierten Zellen lokalisiert (ca. 40 Zellen in 2 unabhängigen Experimenten wurden untersucht). In Zellen, die weniger Antikörper enthielten, war Antikörper entlang der Stressfasern nachweisbar in der für CLP-36 typischen Perlschnur-artigen Anordnung. Die CLP-36/ α -Aktinin Assoziation konnte offenbar nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß gehemmt werden. Das Phalloidin-Aktin-Zytoskelett der mit Anti-CLP-36 injizierter Zellen unterschied sich nicht von dem nichtinjizierter Zellen (nicht gezeigt).

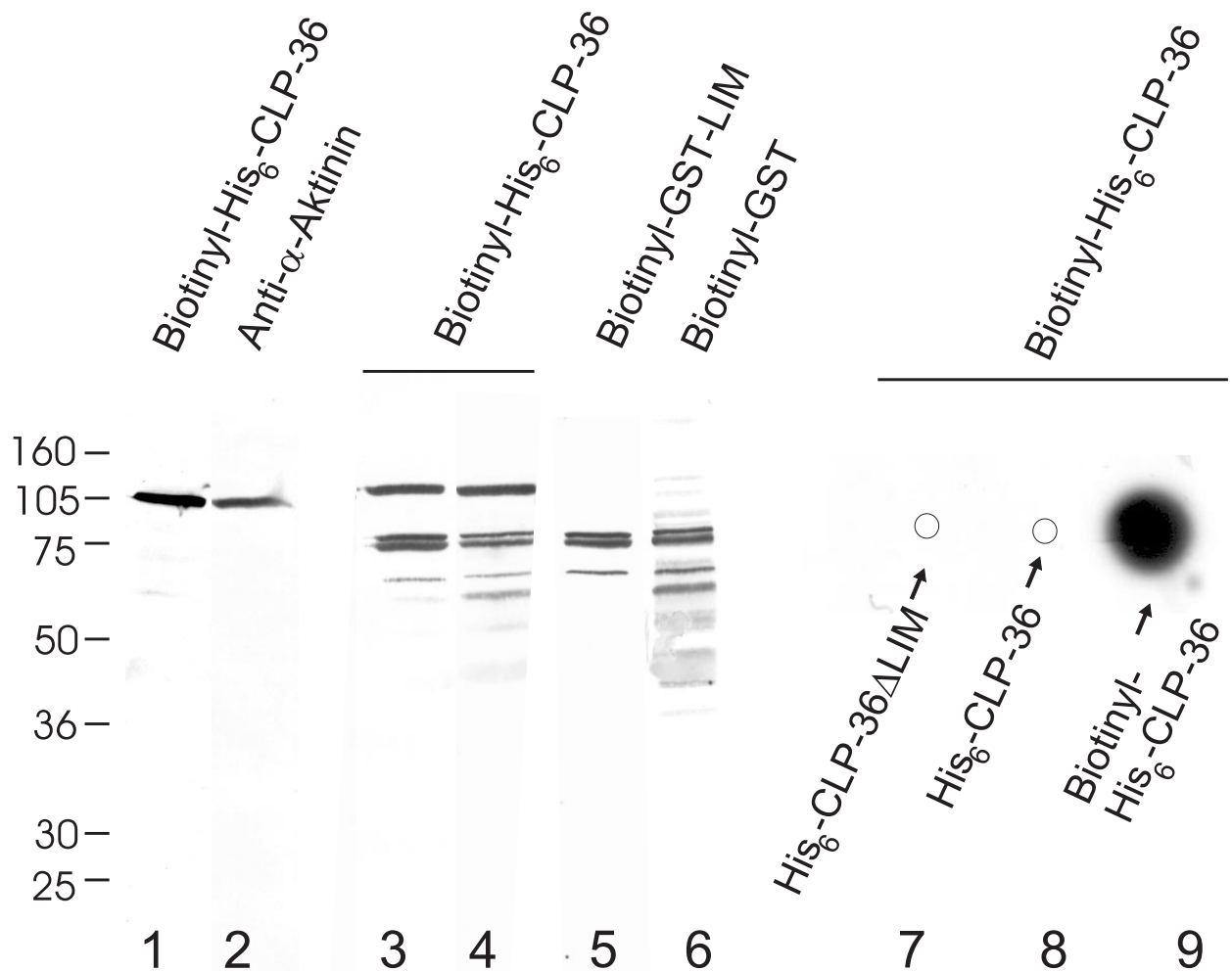


Abbildung 4.23: *Blot-overlay assay* mit biotinyliertem His₆-CLP-36 (Spur 1,3,4,7,8), biotinyliertem GST-LIM (Spur 5) und biotinyliertem GST als Kontrolle (Spur 6). Es wurde über SDS-PAGE aufgetrenntes Gesamtprotein ruhender (Spur 1-3,5,6) und mit Thrombin aktivierter (Spur 4; 1U/ml, 30 Sek., nicht gerührt) Plättchen geblotet; in Dot-Blots (Spur 7-9) wurden je 2 μ l His₆-CLP-36 Δ LIM (0.4 mg; Spur 7) und His₆-CLP-36 (0.6 mg; Spur 8) sowie Biotinyl-His₆-CLP-36 (0.2 mg; Spur 9), das als Detektionskontrolle diente, direkt auf eine NC-Membran getropft und der *Blot-overlay Assay* mit Biotinyl-His₆-CLP-36 analog durchgeführt (s.3.17). α -Aktinin wurde mit dem Antikörper BM-75.2 nachgewiesen. Exposition des ECL-Films: 1 Min. (Spur 1), 10 Min. (Spur 3-6), \ddot{U} N (Dot-Blot).

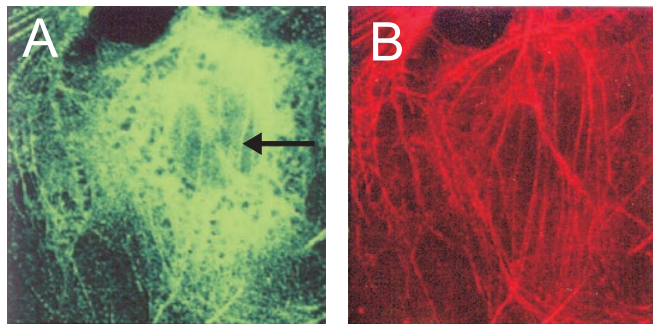


Abbildung 4.24: Endothelzelle, die für 3.5 h mit dem mikroinjizierten affinitätsgereinigtem Anti-CLP-36 (2.5 mg/ml) inkubiert und anschließend fixiert wurde; eine nachträgliche Detektion von CLP-36 mit Anti-CLP-36 Antikörper detektierte CLP-36 auf den Stressfasern. Die Doppel-Fluoreszenzmarkierung goat anti-rabbit-FITC (A) und mit Rhodamin-Phalloidin (B) machte sowohl das Aktinzytoskelett als auch den mikroinjizierten Antikörper sowie das endogene CLP-36 sichtbar. Das FITC-Signal zeigt, daß nach Mikroinjektion des Antikörpers das auf den Stressfasern lokalisierte CLP-36 nicht abgelöst werden konnte (Pfeil), konfokale Laser-Scanning Mikroskopie, $\times 1000$.

4.11 Untersuchung der *in vivo* Dynamik von fluoreszenzmarkiertem CLP-36 in PtK2-Zellen

Um die *in vivo*-Lokalisation und Dynamik von CLP-36, CLP-36_(AS 1–257) und der LIM-Domäne (AS 258–329) untersuchen zu können, wurden die C-termini dieser Polypeptide durch Klonierung in den Vektor p β actinEGFP mit dem grün fluoreszierendem Protein EGFP fusioniert. Die Plasmide wurden durch Elektroporation in Endothelzellen transformiert und 16 h nach der Aussaat fixiert, um die Proteinexpression und -Lokalisation zu überprüfen (s. Abb.4.25). CLP-36-EGFP lokalisierte an die Stressfasern in gepunkteter bzw. gebänderter Anordnung. CLP-36_(AS 1–257)-EGFP war hauptsächlich zytosolisch und band schwächer an Stressfasern. Außerdem war CLP-36_(AS 1–257)-EGFP weniger deutlich punktförmig auf den Stressfasern angeordnet (B). CLP-36_{LIM}-EGFP konnte nicht an F-Aktinstrukturen binden (C,C''), sondern verhielt sich wie EGFP (nicht gezeigt): beide Proteine waren ausschließlich im Zytosol und unspezifisch im Kern angereichert (C).

Endothelzellen gehen bereits etwa 3 h nach der Aussaat von einem ausgebreiteten, stark adhärenenten Zustand in einen polarisierten Phänotyp über, der mit einer gerichteten Migration der Zelle verbunden ist ("Fischzug"). Migrierende Endothelzellen bilden an ihren Zellpolen Lamellipodien aus, an die in Abhängigkeit vom verwendeten Matrixpolymer verschiedene Struktur- und Signalproteine translozieren, die für die Funktion des Lamellipodiums benötigt werden. Aus Abb.4.25A geht hervor, daß CLP-36 auch an den Lamellipodien konzentriert ist (Pfeil).

Die Transformation der Plasmide in die Endothelzellen durch Elektroporation verlief mit geringer Effizienz. Auch durch Verwendung kationischer Lipide (Lipofect, Lipofectamin, Superfect) und durch Mikroinjektion konnte die Effizienz nicht wesentlich gesteigert werden. Damit konnten Endothelzellen nicht für eine *in vivo*-Beobachtung herangezogen werden.

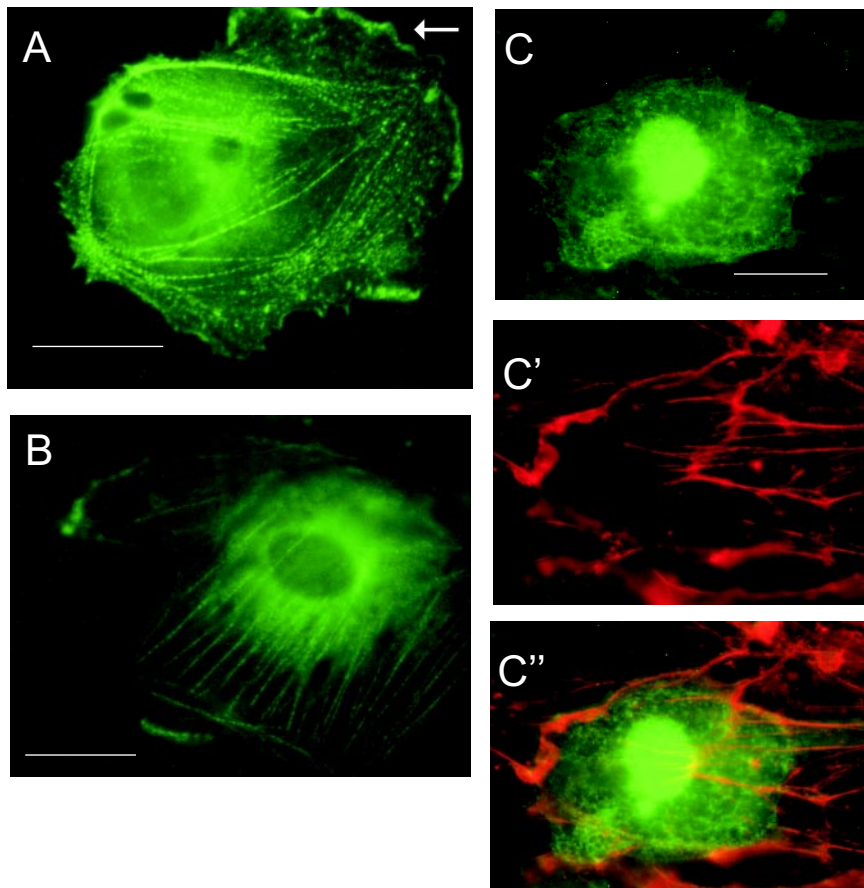


Abbildung 4.25: Subkonfluente, fixierte Endothelzellen, die die EGFP-Fusionsproteine CLP-36-EGFP (A), CLP-36_(AS1-257)-EGFP (B) und CLP-36_{LIM}-EGFP (C) exprimieren; (C') Färbung des F-Aktin mit Rhodamin-Phalloidin in (C); (C'') Überlagerung von C und C'; CLP-36-EGFP an den Lamellipodien ist in A zu sehen (Pfeil); Fluoreszenzmikroskopie, $\times 1000$; Balken $20 \mu\text{m}$.

Stattdessen wurden die Plasmide mithilfe der Calciumphosphat-Methode in eine Epithelzelllinie (PtK2) transformiert. Diese Transformationen verliefen mit hoher Effizienz. PtK2-Zellen besitzen den Vorteil, daß sie extrem flach sind und daher fast alle Vorgänge am Zytosklett in einer einzigen fokalen Ebene ablaufen. Das exprimierte Fusionsprotein wurde in der lebenden Zelle unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Patrick Keller am EMBL Heidelberg durchgeführt.

CLP-36-EGFP lokalisierte an die Stressfasern in periodischer Anordnung (s. Abb.4.26A). Es konnte auch an den Zellkontakten lokalisiert werden (G, Film 1603/cell4). CLP-36-EGFP war an den membrannahen Aktinfilamentabschnitten teilweise verdichtet (Pfeilspitze in A). Das Fluoreszenzsignal auf den Stressfasern reichte nicht bis an die Membran, was darauf hinweist, daß CLP-36-EGFP an den fokalen Kontakten ausgeschlossen war (F). Das auf den Stressfasern lokalisierte CLP-36-EGFP zeigte keine sichtbare Dynamik, sondern schien eher statisch mit den Stressfasern assoziiert zu sein. Dynamisches CLP-36-EGFP war in hochmotilen Spots an den lamellipodiären Zellausläufern (Pfeil in B; Filme 1603/cell3, 1603/cell2 und 30034/36.7) sowie an Stellen, an denen ein Auf- oder Umbau von Stressfasern stattfand (Pfeil in A, Film 29032/36_5; Pfeil in D, Film 1603/cell1), konzentriert⁵. An Membrankräuselungen⁶ akkumulierte CLP-36-EGFP in einer sich zentrifugal bewegenden Front, die die motilen CLP-36-Spots enthielt (H, Film 30034/36_8, hoher Zeitraffer). Einige hochmotilen Spots wurden bei besserer zeitlicher Auflösung (Belichtung alle 200 msek, 3× Zeitraffer in der Abspielung mit dem media-player) als schweifähnliche Strukturen sichtbar, die an Nukleationspunkten entstehen, polymerisieren und sich nach wenigen Sekunden wieder auflösen (Kreis in I, Film 29031/36_1). CLP-36-EGFP fand sich auch fokal an der Peripherie von Vesikeln, um die es eine rotierende Bewegung auszuführen schien (E, Film 1603/cell5). Dieses Phänomen war transient und spezifisch für CLP-36. LIM-EGFP war homogen und bewegungslos in dem das Vesikel umgebendem Zytosol verteilt (Film 29031/LIM.1). Das trunkierte CLP-36_(AS 1-257)-EGFP band wie in HUVEC-Zellen schwächer an das Aktinzytoskelett (4.26C, Film 2903/N_1).

Vaccinia Viren bilden zur Fortbewegung innerhalb der Zelle Aktinschweife aus. Diese liefern die propulsive Kraft zur Infektion von Nachbarzellen durch Ausbildung infektiöser Membranprojektionen. Die Proteine zur Ausbildung des Schweifs werden von der Wirtszelle rekrutiert (Cudmore et al., 1995). Der Aktinschweif besteht aus orthogonal angeordneten Aktinfilamenten, die über α -Aktinin quervernetzt werden. Aktinschweife ohne α -Aktinin sind weniger dicht und zeigen ein verändertes Bewegungsmuster. Der Aktinschweif von Vaccinia sollte daher als Modell dienen, um die Wirkung von CLP-36 auf α -Aktinin *in vivo* zu untersuchen. Um die Bedeutung der LIM-Domäne in CLP-36 für die Form und Dynamik des Schweifes zu untersuchen, wurden PtK2-Zellen mit CLP-36-EGFP und mit dem trunkierten CLP-36 ohne LIM-Domäne (CLP-36_(AS 1-257)-EGFP) transformiert und anschließend mit Vaccinia infiziert. Eventuelle Veränderungen der Form und Dynamik des Schweifes in den transformierten Zellen würden eine Möglichkeit bieten, den Effekt der LIM-Domäne quantitativ zu

⁵Die beigelegten Videos sind komprimierte Versionen der Originalfilme. Die Kompression war nötig, um die Filme auf Standard-Computern abspielen zu können. Die Originalfilme, an denen sich der Ergebnisteil orientiert, geben jedoch einige Details deutlicher wieder, z.B. die Bewegung der Spots in A

⁶engl. "ruffles"

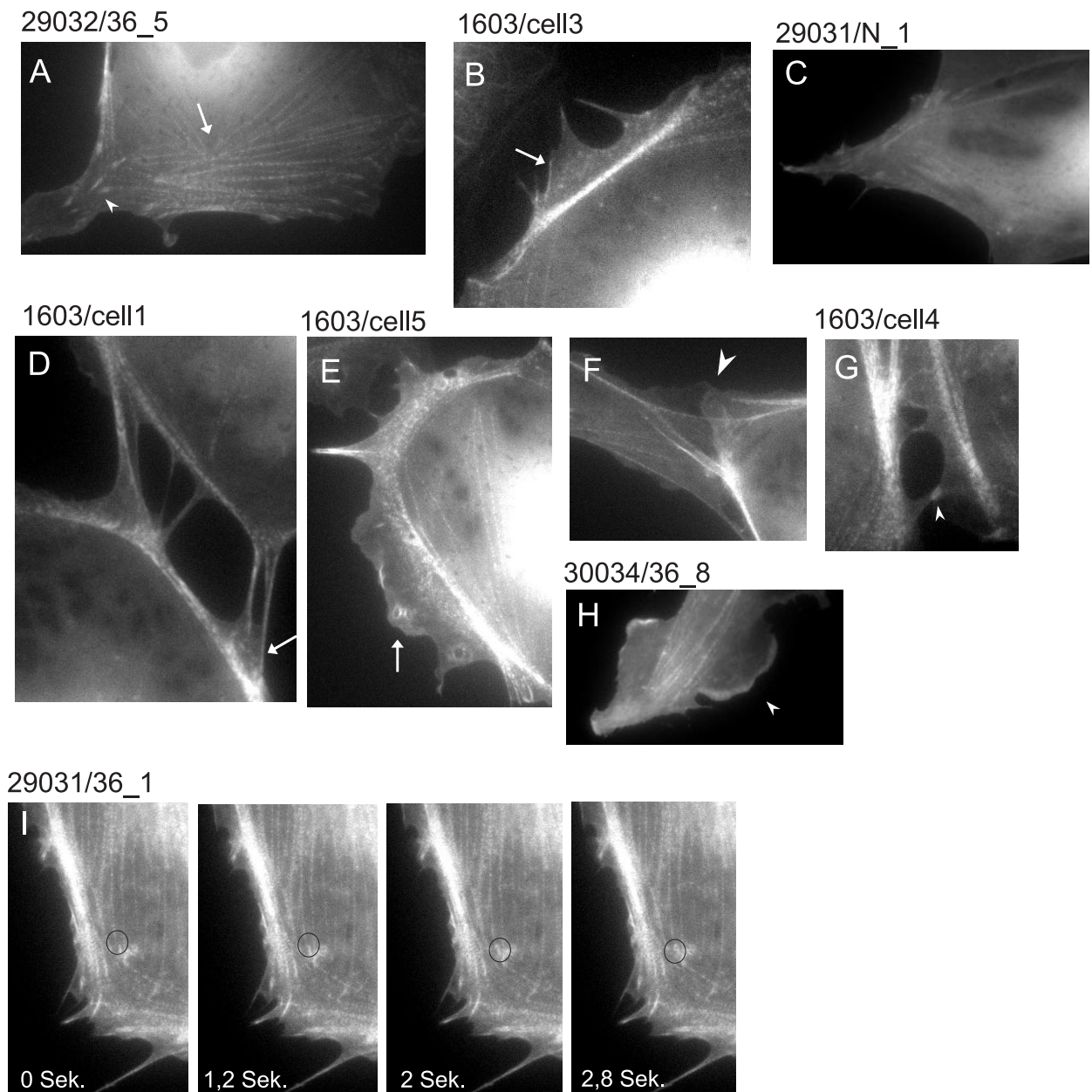


Abbildung 4.26: *In vivo* Lokalisation und Dynamik der EGFP-Fusionsproteine CLP-36-EGFP (A,B,D-I) und CLP-36 Δ LIM-EGFP (C) in PtK2-Zellen; angegeben sind die entsprechenden videofiles (jeweils oben) sowie die zeitliche Abfolge der ausgewählten Einzelsequenzen in I, in denen CLP-36-EGFP eine gekrümmte Schweifstruktur ausbildet; motile spots an einem spitz zulaufendem Lamellipodium (B), membrannahen Stressfasern (D), sowie kräuselnden Lamellipodien mit hohem Zeitraffer, in denen sich CLP-36-EGFP wellenförmig ausbreitet (H); fokale Konzentration von CLP-36-EGFP an Vesikeln (E) und adhärennten Zellkontakten (G); Abwesenheit von CLP-36-EGFP an den Filamentenden (F); schwächere Bindung des trunkierten Proteins CLP-36 Δ LIM an das Aktinzytoskelett (C); lokale Ausbildung CLP-36-reicher Schweifstrukturen; inverse Fluoreszenzmikroskopie, $\times 1000$, Zeitraffer der Videos: 3- bis 15-fach; für (A): 150-fach.

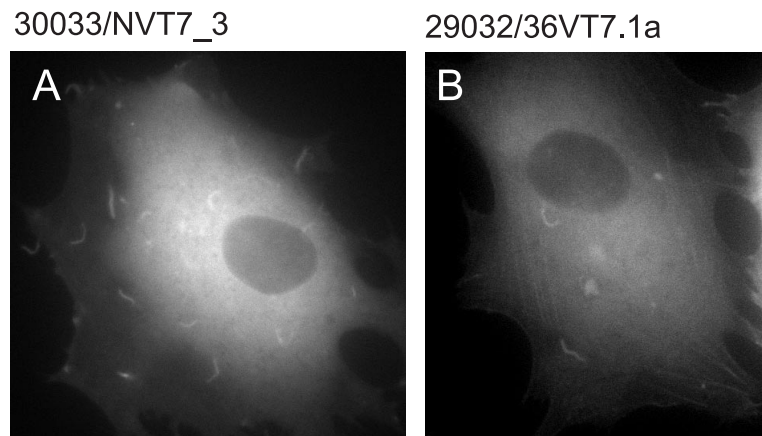


Abbildung 4.27: Mit Vaccinia-Virus infizierte PtK2-Zellen, die CLP-36 Δ LIM-EGFP (A) und CLP-36-EGFP (B) exprimieren; inverse Fluoreszenzmikroskopie, $\times 1000$

erfassen.

Die beiden Fusionsproteine CLP-36-EGFP und CLP-36_(AS 1–257)-EGFP lokalisierten beide homogen an das Aktinnetzwerk des Vaccinienschweifs. Die CLP-36-EGFP und CLP-36_(AS 1–257)-EGFP exprimierenden Zellen zeigten jedoch hinsichtlich der Morphologie und Dynamik des Schweifs keine signifikanten Unterschiede, der Einbau des trunkierten CLP-36 ohne LIM-Domäne in den Aktinschweif schien sich also nicht auf dessen Funktion auszuwirken (4.27, Filme 30033/NVT7_3 und 29032/36VT7.1a).

4.12 Phosphorylierung von CLP-36

Die Funktion vieler Proteine wird über ihre Phosphorylierung gesteuert. Diese wird innerhalb eines Stimulus-abhängigen Signalweges durch spezifische Kinasen und Phosphatasen reguliert. Die Phosphorylierung wurde

- (1) *in vivo* durch Immunpräzipitation von CLP-36 aus ruhenden und aktivierten Plättchen (4.12.1 u. 4.12.3) oder
- (2) *in vitro* durch Inkubation von Zellysaten, die eine Kinase überexprimieren, mit rekombinantem CLP-36 (4.12.2) analysiert.

4.12.1 Untersuchung der Proteinkinase A abhängigen Phosphorylierung von CLP-36 in [³²P]-Orthophosphat-markierten Plättchen

CLP-36 wurde ursprünglich als potentielles Substrat der Proteinkinase A aus Plättchen isoliert (s.S.3). Daher wurde untersucht, ob CLP-36 während einer cAMP-vermittelten Plättcheninhibition phosphoryliert wird. Dafür wurden Plättchen mit [³²P]-Orthophosphat markiert und anschließend mit Iloprost behandelt. Das Prostacyclin-Analog Iloprost erhöht die

intrazelluläre cAMP-Konzentration und führt zu einer Proteinkinase A-vermittelten Phosphorylierung spezifischer Zielproteine (s.S.3). Die Plättchen wurden nach Inkubation mit Iloprost lysiert und CLP-36 spezifisch immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Autoradiographien der Western-Blots zeigten, daß nach Inkubation mit Iloprost die Proteinkinase A-Substrate P22, p39 und p50 (Siess und Lapetina, 1990) phosphoryliert wurden, nicht jedoch das immunpräzipitierte CLP-36 (4.28). CLP-36 scheint also kein Substrat der Proteinkinase A zu sein und kann deshalb nicht mit einer Hemmung der Plättchenfunktion in Zusammenhang gebracht werden.

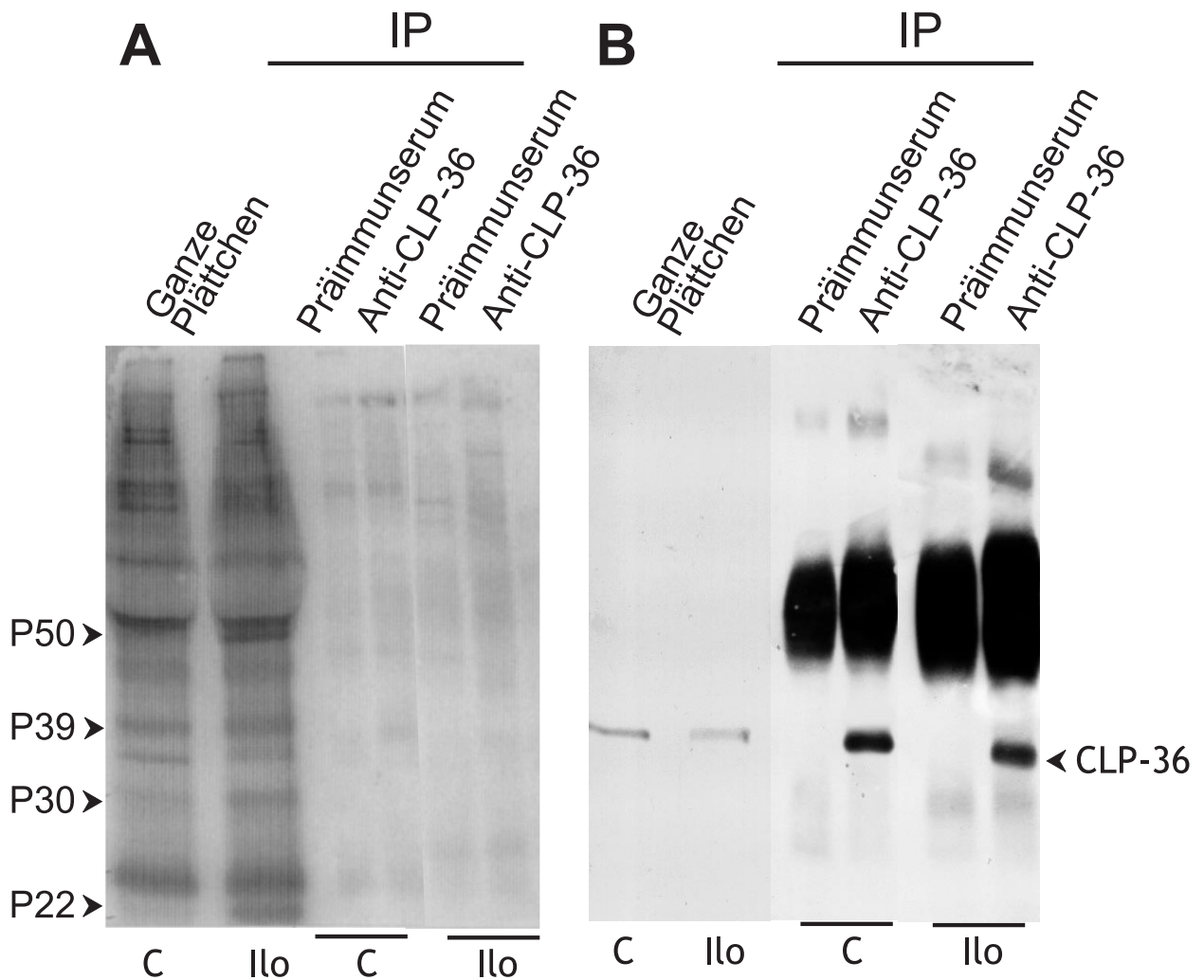


Abbildung 4.28: Untersuchung der Proteinkinase A-vermittelten Phosphorylierung von CLP-36 in Thrombozyten. Plättchen wurden nach Markierung mit [32 P]-Orthophosphat ohne (control, c) oder mit $1\mu\text{M}$ Iloprost (Ilo) für 5 min. inkubiert. CLP-36 wurde immunpräzipitiert und die Immunpräzipitate geblottet. In den Negativkontrollen wurde Präimmunserum verwendet. (A) Autoradiographie nach 5d Exposition im Phospho Imager, (B) Anti-CLP-36 Western-Blot.

4.12.2 Untersuchung der Phosphorylierung von CLP-36 durch die LIM-Kinasen I und II *in vitro*

Das Motiv ASGV an Position 169-172 in CLP-36 tritt auch in der ADF/Cofilin Konsensussequenz ASGVVXD auf (Agnew et al., 1995). Die Funktion der ADFs (Aktin depolymerisierende Faktoren), zu denen auch Cofilin gehört, wird über die Phosphorylierung dieser Sequenz am Serinrest durch die LIM-Kinase I reguliert (Yang et al., 1998). Es wurden daher *in vitro* Phosphorylierungs-Experimente mit [γ - 32 P] ATP durchgeführt, um zu untersuchen, ob CLP-36 ein Substrat der LIM-Kinase I oder LIM-Kinase II ist. Die Experimente wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Kensaku Mizuno durchgeführt (Kyushu Universität, Japan). In den Assays konnte allerdings nur das Kontrollprotein Cofilin phosphoryliert werden, rekombinant exprimiertes 6 \times His-CLP-36 und das trunkierte 6 \times His-CLP-36 Δ LIM (AS 1-256 aus CLP-36) waren kein Substrat der LIM-Kinasen I und II (s. Abb. 4.29 und Abb. 4.30). In Plättchenlysats konnte allerdings ein Protein im unteren Molekulargewichtsbereich identifiziert werden, das spezifisch von LIM-Kinase I phosphoryliert wurde (s. Abb. 4.30A). Hierbei könnte es sich um das endogene Cofilin (21 kDa) aus Plättchen handeln. Ein anderes Substrat der LIM-Kinase I konnte in Plättchenlysats nicht gefunden werden.

4.12.3 Immundetektion der Serinphosphorylierung von CLP-36

Um die Serinphosphorylierung von CLP-36 zu untersuchen, wurden monoklonale Phosphoserin(P-Ser)- Antikörper zur Untersuchung des immunpräzipitierten CLP-36 im Western-Blot eingesetzt. In ruhenden Plättchen konnte bereits eine basale Serinphosphorylierung von CLP-36 detektiert werden (s. Abb. 4.31). Die Serinphosphorylierung von CLP-36 war nach Aktivierung der Plättchen mit Thrombin oder Inaktivierung der Plättchen mit Iloprost quantitativ unverändert (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß die Serinphosphorylierung von CLP-36 keiner aktivierungs- oder inaktivierungsabhängigen Regulation unterliegt. Allerdings ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß eine gleichzeitige Phosphorylierung und Dephosphorylierung von CLP-36 in der Zelle stattfindet, so daß die detektierbare Nettophosphorylierung gleich bleibt.

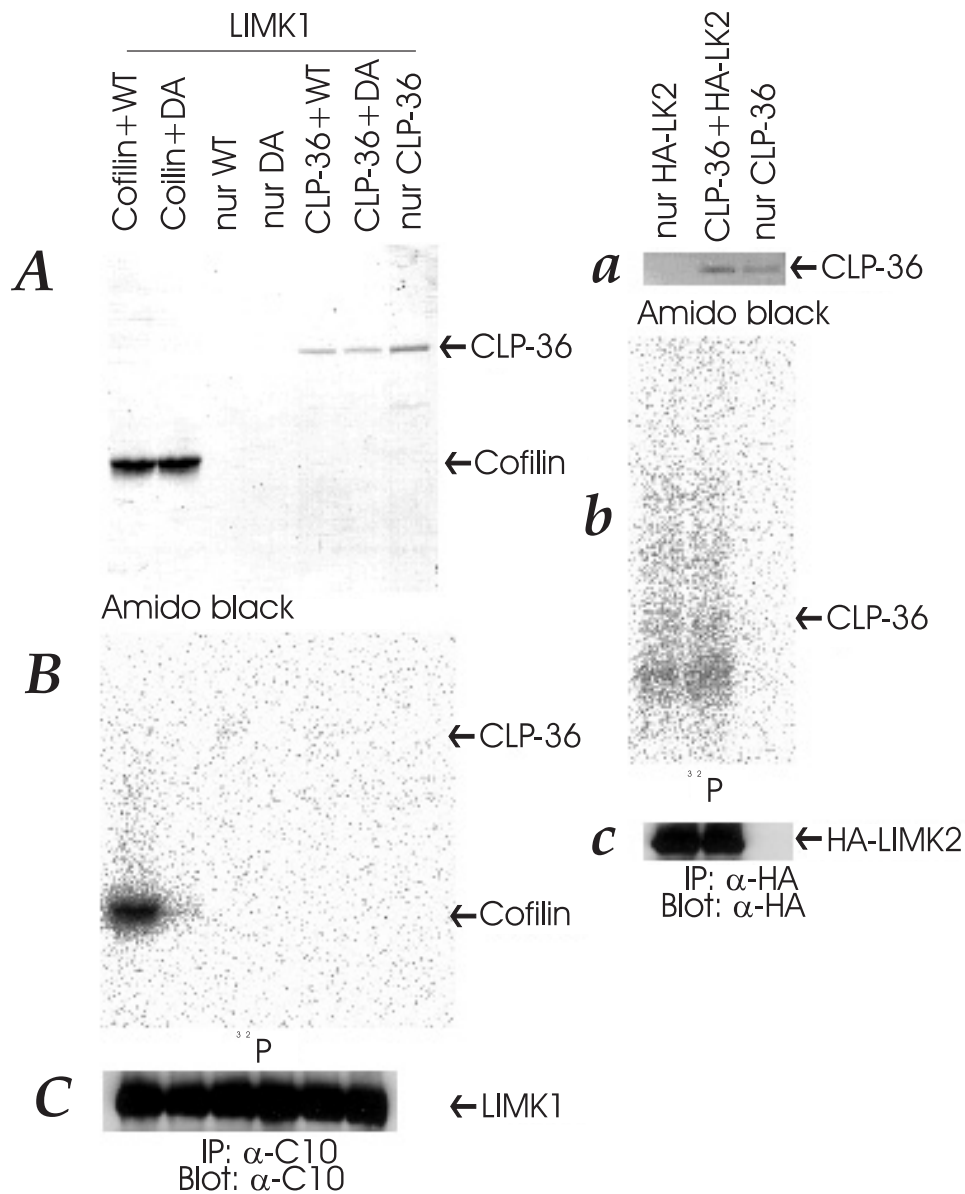


Abbildung 4.29: *In vitro* LIM-Kinase Assay mit CLP-36. Lysate von COS-7 Zellen, die mit Expressionsplasmiden transfiziert wurden, die C10-LIM-Kinase I Fusionsprotein (A,B,C) und HA(Hämagglutinin)-LIM-Kinase II Fusionsprotein (a,b,c) exprimierten, wurden mit Anti-C10 bzw. Anti-HA Antikörper immunpräzipitiert, und einer *in vitro* Kinase Reaktion mit [γ -³²P] ATP unterzogen in Anwesenheit von Cofilin, das als Positivkontrolle eingesetzt wurde, oder CLP-36. Als Negativkontrolle wurde die kinaseinaktive Mutante DA oder Substrat ohne Kinase verwendet. Der Reaktionsansatz wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (A,a) Proteinfärbung mit Amido black (Okano I., J. Biol. Chem. **270**, 31321-31330 (1995)). (B,b) Autoradiographie. (C,c) Die Expression der LIM-Kinasen wurde durch Western-Blotting bestätigt. Abkürzungen: WT = Wildtyp-LIM-Kinase I, LIMK1 = LIM-Kinase I, LIMK2 = LIM-Kinase II.

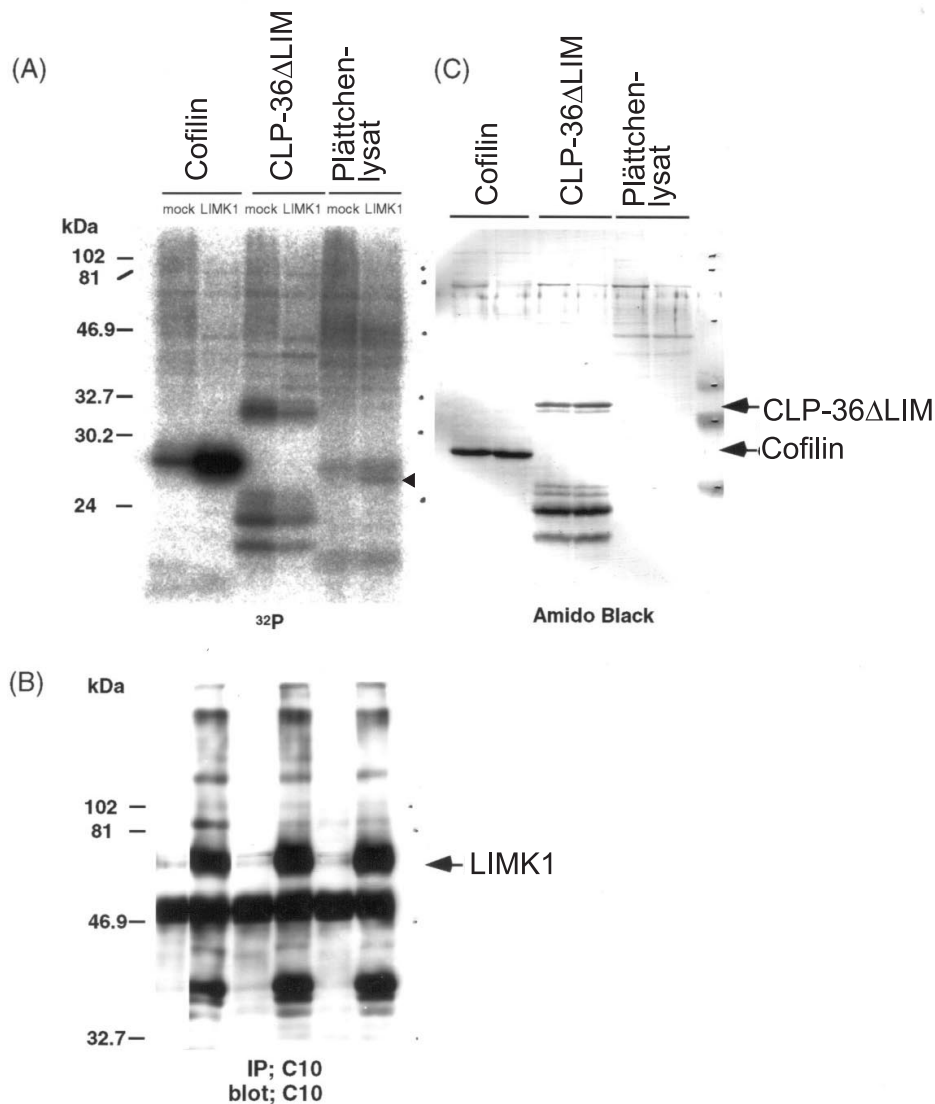


Abbildung 4.30: *In vitro* LIM-Kinase Assay mit dem trunkierten Protein CLP-36ΔLIM. Lysate von COS-7 Zellen, die Expressionsplasmide mit LIMK1 cDNA enthielten, wurden mit Anti-LIMK1 Antikörper immunpräzipitiert, und einer *in vitro* Kinase Reaktion mit [γ - 32 P] ATP unterzogen in Anwesenheit von Cofilin (0,2 mg/ml), das als Positivkontrolle eingesetzt wurde, CLP-36ΔLIM (0,2 mg/ml) oder Plättchenlysat (0,1 mg/ml). Als Negativkontrolle wurde der pUCD2 Vektor (mock) eingesetzt. (A) Nach 30 Min. Inkubation wurde der Reaktionsansatz über SDS-PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes Protein autoradiographisch visualisiert. In Plättchen wurde ein Protein spezifisch phosphoryliert (Pfeilspitze in (A)). Der Molekulargewichtsmarker zeigt offenbar das falsche Molekulargewicht an, denn His-CLP-36ΔLIM besitzt ein theoretisches und experimentelles Molekulargewicht von etwa 27 kDa anstatt 31 kDa. (B,b) Die Expression der LIM-Kinase I wurde durch Western-Blotting bestätigt. (C,c) Proteinfärbung mit Amido black. LIMK1 = LIM-Kinase I.

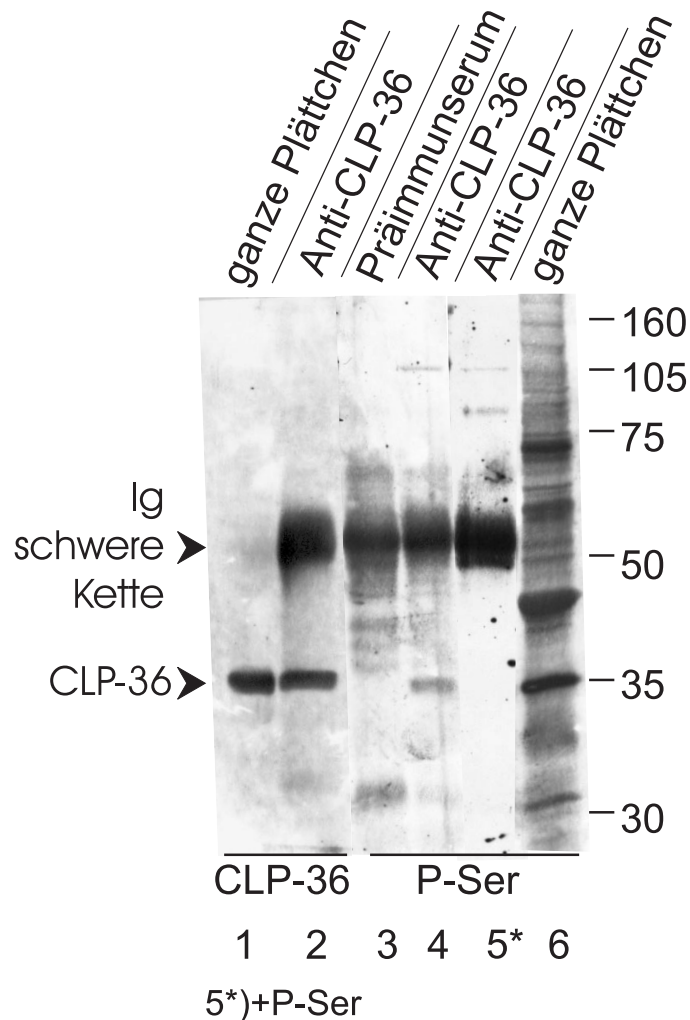


Abbildung 4.31: Anti-CLP-36 (1,2) und Anti-P-Ser (3-6) Western-Blot von CLP-36 Immunpräzipitaten (s. 3.13.2) (2,4,5), Kontrollpräzipitat mit Präimmunserum (3), ganze Plättchen (1,6). Serinphosphorylierung konnte in präzipitiertem CLP-36 (Spur 4) detektiert werden, aber nicht in der Kontrolle mit Präimmunserum (Spur 3). Die Detektion von Phosphoserin konnte kompetitiv gehemmt werden, wenn der Anti-P-Ser Antikörper (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 1 h mit Phosphoserin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) präinkubiert wurde (Spur 5). Anti-P-Ser IgM (Klon 16.B.4), Zweit-Antikörper: Anti-Maus-IgM (1:1000), s.S.19.

5

Diskussion

5.1 Sequenzhomologien und Primärstruktur

Phylogenetische Konservierung

Eine Analyse des offenen Leserahmens des *CLP-36*-Gens zeigte, daß das Protein eine C-terminale LIM-Domäne und eine N-terminale PDZ-Domäne enthält, zwei Motive für Protein-Protein-Interaktionen (s. Abb.4.1). Das Protein wurde aufgrund seiner 86%igen Aminosäuresequenz-Identität zu CLP-36 aus *Rattus norvegicus* (Wang et al., 1995) als humanes CLP-36 bezeichnet. Zu dem als CLIM bezeichnetem homologen Protein aus *Mus musculus* (AF053367) besteht eine Sequenzidentität von 88 % . Weiterhin wurde kürzlich das humane CLIM1 aus einer Adenocarcinom-cDNA-Bank kloniert wurde (AA065047; Kotaka et al., 1999). Dieses ist identisch mit der CLP-36-Sequenz, mit Ausnahme der Position 21, an der ein Glycin gegen Arginin ausgetauscht ist. Die DNA zeigt an dieser Region eine Abfolge vier abweichender Nukleotide in den für die Positionen 20 und 21 kodierenden Nukleotidtripletts (Austausch GGC GGC gegen GGG CGA). Interessanterweise ist in der CLP-36-Sequenz aus *Mus musculus* das gesamte kodierende Nukleotidtriplett für die Aminosäure 21 deletiert. Diese Region könnte also ein bevorzugter Ort für Mutationen sein. Daß es sich bei *CLP-36* und *CLIM1* um zwei eng verwandte Gene handelt, ist unwahrscheinlich, denn die gefundenen Expressed Sequence Tags (ESTs) sind in dem kritischen Bereich alle mit der CLP-36-Sequenz identisch, nicht aber mit CLIM1. Das Gen *CLIM1* könnte daher als mutiertes *CLP-36* betrachtet werden.

In einer Hefechromosom-Datenbank konnte ein offener Leserahmen gefunden werden, der für ein hypothetisches 44kDa-Protein kodiert. Dieses weist im Mittelteil 22%ige Identität mit CLP-36 auf. Interessanterweise sind ein Großteil der identischen Aminosäuren Serin und Prolin (s. Abb.4.4). Der phylogenetisch hohe Grad der Konservierung weist auf eine wichtige Rolle dieser Aminosäuren für die Funktion beider Proteine hin. Dieselben Aminosäuren sind auch in CLP-36 aus Ratte und Maus konserviert. Eine Analyse der Proteindatenbanken des National Center of Biotechnology Information (NCBI) zeigte, daß die mit CLP-36 verwandten Proteine generell einzelne konservierte Serin- und Prolinreste im Mittelteil aufweisen (nicht gezeigt). Diese sind jedoch nicht durchgehend konserviert und auch nur teilweise identisch mit den konservierten Prolin- und Serinreste, die sich in dem hypothetischen 44kDa

Protein aus Hefe (s.o.) finden. Sie könnten zu einer phylogenetischen Klassifizierung der zu CLP-36 verwandten Proteine herangezogen werden (s. hierzu auch Abb.4.3).

Die PDZ/LIM-Domäne Proteinfamilie

CLP-36 gehört zur Familie der PDZ/LIM-Domäne-Proteine, die eine N-terminale PDZ-Domäne und eine oder drei C-terminale LIM-Domänen enthalten. Dazu zählen ALP (Aktinin-assoziiertes LIM-Protein; Xia et al., 1997) und RIL ("Reversion-Induced" LIM-Protein; Kiess et al., 1995), die jeweils eine LIM-Domäne enthalten, sowie Enigma (Wu und Gill, 1994), ENH (Enigma Homolog, Kuroda et al., 1996) und die zu ENH homologen Proteine Cypher (Zhou et al., 1999) ZASP (Faulkner et al., 1999) und Oracle (Passier et al., 2000), die je drei LIM-Domänen besitzen. (s. Abb.4.2 und 5.1). ALP und RIL zeigen die höchste Homologie zu CLP-36, v.a. innerhalb der LIM- und PDZ-Domänen. Im Mittelteil sind einige kurze Sequenzabschnitte und Prolinreste konserviert (s. Abb.4.3). Prolin ist eine Iminosäure und häufig an den Knicken gefalteter Proteinketten zu finden. Die konservierten Prolinreste könnten also für die Ausbildung bestimmter Sekundärstrukturelemente benötigt werden.

ALP, *ENH* und *Cypher/Oracle/ZASP* werden spezifisch in Herz- und Skelettmuskel exprimiert, interagieren über ihre PDZ-Domäne mit α -Aktinin-2 und lokalisieren an die Z-Scheibe des Muskelsarkomers. *ENH* wird in frühen embryonalen Entwicklungsstadien im Herz verstärkt exprimiert. Die LIM-Domäne von *ENH* interagiert mit Isoformen der Proteinkinase C *in vitro* und möglicherweise *in vivo* (Kuroda et al., 1996). Die Proteinkinase C phosphoryliert *ENH in vitro*; nach Aktivierung der Proteinkinase C transloziert *ENH* aus der Membran in das Zytosol. Diese Daten sprechen dafür, daß eine Phosphorylierung von *ENH* dessen zelluläre Verteilung reguliert. Die Proteinkinase C wird während der hypertrophen Entwicklung der Herzmuskelzellen aktiviert. Daher wird für *ENH* eine Bedeutung für die Herzentwicklung postuliert (Nakagawa et al., 2000).

Enigma bindet über die LIM-Domäne 2 und 3 *in vitro* an Isoformen der Proteinkinase C und über die PDZ-Domäne an das aktinfilamentassoziierte Tropomyosin β . Enigma und Tropomyosin kolokalisieren an der Z-Scheibe des Muskelsarkomers (Guy et al., 1999). *Enigma* wird im Gegensatz zu *ENH* auch in nichtmuskulären Zellen exprimiert und bindet dort an Aktinfilamente über ein noch nicht identifiziertes filamentassoziiertes Protein (Durick et al., 1998). Die zweite LIM-Domäne aus Enigma interagiert mit einem tyrosinhaltigen Motiv der onkogenen Rezeptor-Tyrosinkinase-Chimäre Ret/*ptc2* (Durick et al., 1996). Diese Assoziation ist essentiell für die mitogene Signaltransduktion durch Ret. Die dritte LIM-Domäne von Enigma bindet spezifisch an ein tyrosinhaltiges "tight turn" Motiv im Insulinrezeptor (InsR). Tyrosinhaltige "tight turn" Motive stellen endozytotische Codes dar. Enigma könnte somit an der Endozytose des Insulinrezeptors beteiligt sein (Wu et al., 1996).

Ril wurde ursprünglich identifiziert als ein Gen, dessen Transkription in H-Ras-transformierten Rattenfibroblasten reprimiert wird und in transformierten Zellen, die zu ihrem ursprünglichen Phänotyp zurückgekehrt sind, induziert wird ("reversion-induced"; Kiess et al., 1995). Das Expressionsmuster von *RIL* weist auf eine physiologische Funktion des Proteins in epithelialen Zellen und den postmitotischen Neuronen des Gehirns hin. *Ril* assoziiert mit den F-aktinreichen Zellkontakten in Zellkulturzellen und apikalen Membrandomänen in polarisierten Epithelzellen. Es komplexiert über LIM- und PDZ-Interaktionen mit sich selbst, der

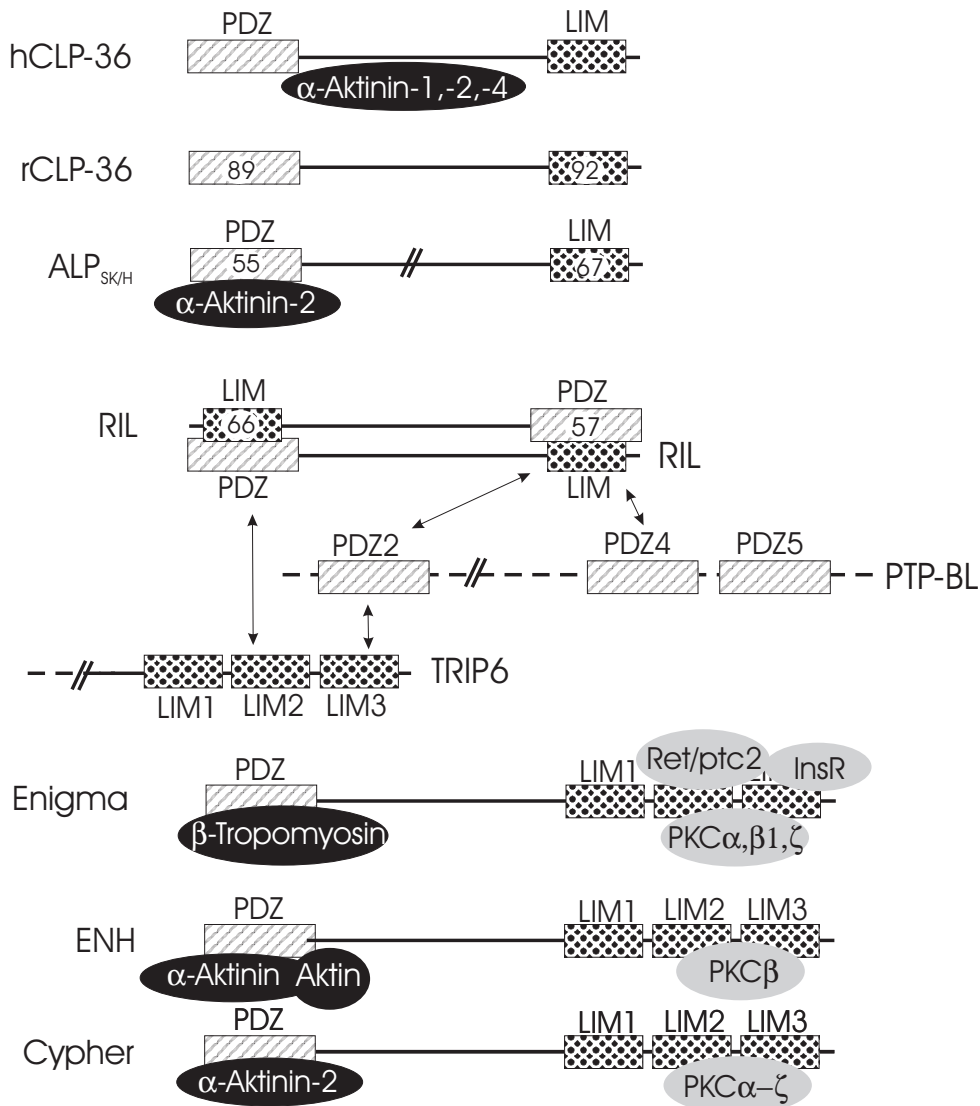


Abbildung 5.1: Proteine der PDZ/LIM-Domäne Familie und ihre Interaktionspartner. Schematische Darstellung von CLP-36 aus Mensch (hCLP-36) und Ratte (rCLP-36), ALP_{SK}, von dem eine verkürzte Spleißvariante im Herz existiert (ALP_H), RIL, Enigma, ENH und Cypher. Die Zahlen geben die Sequenzidentität der jeweiligen Domäne zu hCLP-36 in % an. Die Zytoskelettproteine sind schwarz, die Signalproteine hellgrau markiert. Abkürzungen: CLP-36, C-terminales LIM-Domäne Protein; ALP, Aktininassoziertes LIM-Domäne Protein; RIL, "Reversion-Induced" LIM-Protein; ENH, Enigma Homolog; Ret, Rezeptor-Tyrosinkinase; ptc, Papilläres Schilddrüsenkarzinom (engl. "papillary thyroid carcinoma").

Phosphotyrosin-Phosphatase PTP-BL (“BAS-like“) und dem zu Zyxin verwandtem TRIP6 (Thyroidrezeptor Interagierendes Protein-6), wobei PTP-BL und TRIP-6 ebenfalls über eine LIM/PDZ-Interaktion verknüpft sind. Das humane Homolog von PTP-BL interagiert über seine PDZ-Domänen mit Fas, einem Zelloberflächenrezeptor für die Vermittlung der Apoptose, und mit PARG-1, einem GTPase(Rho)-aktivierenden Protein (Cuppen et al., 2000). Ril kann wie InaD (s.S.13) Homodimere ausbilden. Dies läßt vermuten, daß es ähnlich wie das große Adaptermolekül InaD Proteinkomplexe zu multimeren Einheiten verbinden kann. Das mit Ril assoziierte TRIP6 ist wahrscheinlich an der räumlichen Organisation von Aktinfilamenten beteiligt (Beckerle, 1997) und bindet das äußere Membranprotein OpaP, das die Adärenz und Invasion von *Neisseria gonorrhoeae* vermittelt (Williams et al., 1998). Da die bakterielle Invasion ein zytoskelettabhängiger Prozeß ist, sollte herausgestellt werden, daß *CLP-36* in Epithelien des Dünndarms sowie der Mukosa des Verdauungstrakts exprimiert (Vallénus et al., 2000) ist und somit ebenfalls an potentiellen Eintrittspforten von Pathogenen vorliegt.

In dem durch Ril vermittelten Proteinkomplex verdeutlicht sich die Adapterfunktion der LIM- und PDZ-Domäne-Proteine und ihre Fähigkeit, signalregulierte Proteinkomplexe auszubilden. Proteine dieser Familie interagieren meist mit der PDZ-Domäne mit einem Zytoskelettprotein und binden mit der LIM-Domäne an Signalproteine. Die Proteine der PDZ/LIM-Domäne-Proteinfamilie könnten also durch Rekrutierung von Signalproteinen an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt zu sein, wobei eine selektive Interaktion mit bestimmten Isoformen der PKC besonders häufig ist. Auch die LIM-Domäne der LIM-Kinase I (s.5.9) interagiert *in vivo* und *in vitro* mit PKC (Kuroda et al., 1996). Die insgesamt 11 Isoformen der PKC regulieren eine Vielzahl zellulärer Funktionen. Durch LIM/PKC-Interaktionen könnte die unterschiedliche Lokalisation und Funktion der PKC-Isoformen reguliert werden. Von vielen PDZ/LIM-Proteinen (ENH, Cypher, ALP) existieren Varianten, die durch alternatives *splicing* entstehen. Einige davon werden abhängig vom Entwicklungsstadium exprimiert. Ein aus der glatten Muskulatur isoliertes 36 kDa PDZ/LIM-Protein wird während der Muskeldifferenzierung stark herunterreguliert (Pomies et al., 1999). Die Expression von ENH, das homolog zu ALP ist, korreliert mit der hypertrophen Entwicklung des Herzmuskels. Dies zeigt, daß PDZ/LIM-Proteine auch in die Zelldifferenzierung involviert sind und daß die Kommunikation zwischen Transmembranproteinen und dem Zytoskelett nicht nur für die Zellfunktion im adulten Organismus, sondern auch für die Zelldifferenzierung bedeutsam ist. Nachdem für viele Proteine mit PDZ und/oder LIM-Domänen bereits zahlreiche Interaktionspartner bekannt sind (z.B. für Ril, Paxillin, Hic-5), stellt sich die Frage, wie die Zusammensetzung und Architektur dieser Proteinkomplexe reguliert werden und wie sie zur Zellbewegung und Zelldifferenzierung beitragen. Die Antworten darauf werden zu einem erweiterten Verständnis spezifischer Membran- und Zytoskelettdomänen an apikalen Epithelzellmembranen, den fokalen Adhäsionen oder den elektronendichten Banden der Stressfasern führen.

5.2 Expression von CLP-36

Über Western-Blot bzw. indirekte Immunfluoreszenz konnte CLP-36 in Plättchen, Endo-

thelzellen, HeLa-Zellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden. Die annähernd 200 (Stand August 2000) CLP-36-Teilsequenzen aus einer EST-Datenbank stammen aus 25 verschiedenen Geweben und Zelltypen (venöse und arteriellen Endothelzellen, Fibroblasts, Jurkat T-Zellen, Colocarcinom-Zellen). CLP-36 könnte also ubiquitär exprimiert sein. In Northern-Blots konnte CLP-36 in Herz, Skelettmuskel, Milz, Dünndarm, Kolon, Placenta, Lunge, Leber, Thymus, Niere, Prostata und Pankreas nachgewiesen werden, wobei die Expression in Herz und Skelettmuskel besonders stark war (Kotaka et al., 1999). Auch konnten EST-Sequenzen von CLP-36 aus Herz- und Skelettmuskel gefunden werden. Im Gegensatz dazu konnte CLP-36 in Ratte und Maus nicht im Skelettmuskel nachgewiesen werden (Wang et al., 1995; Vallenius et al., 2000). Es könnten also speziesspezifische Unterschiede in der Expression von *CLP-36* bestehen. *In situ* Hybridisierungen an embryonalen und adulten Mäusen zeigen eine starke Expression von CLP-36 in den Epithelien der Haut und des Darms, die bereits in frühen Stadien der Entwicklung einsetzt (Vallenius et al., 2000). CLP-36 könnte also eine Rolle für die Differenzierung der Epithelien während der Embryogenese spielen. CLP-36 ist im Gegensatz zu den verwandten Proteinen ALP, EH (Enigma-homolog), Cypher, Oracle und ZASP (s.u.) nicht auf Skelettmuskel und Herz beschränkt und ähnelt darin dem homologen PDZ/LIM-Domäne Protein Ril, dessen Gen ebenfalls in mehreren Gewebetypen exprimiert wird. *RIL* wird wie *CLP-36* stark in embryonalen und adulten Epithelien exprimiert (Kiess et al., 1995; Vallenius et al., 2000); es ist jedoch in Epithelien aus Hirn, Testis, mittelgroßen Bronchien, uterinären Tuben und Magen konzentriert, während *CLP-36* in diesen Geweben nur schwach exprimiert ist oder fehlt. Die nichtüberlappende Expression von *CLP-36* und *RIL* weist auf eine gewebsspezifische, nicht redundante Funktion beider Proteine hin.

5.3 Assoziation von CLP-36 mit dem Aktinzytoskelett

Durch Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, daß CLP-36 in Plättchen, Endothelzellen, Epithelzellen und venösen glatten Muskelzellen mit dem Aktinzytoskelett assoziiert. In ruhenden, konfluenten Endothelzellen war CLP-36 zytosolisch und mit dem submembranärem Aktinsaum assoziiert. Es translozierte an die kontraktile Stressfasern nach Aktivierung der Endothelzellen. In aktivierten Plättchen translozierte CLP-36 an die filopodiale Aktinfilamente und Stressfasern sowie an das kortikale Aktinnetzwerk. Das kortikale Aktinnetzwerk ermöglicht die radiäre Ausbreitung des Plättchens nach Aktivierung und bildet einen stark lichtbrechenden Wulst mit einer hohen Konzentration an quervernetzten Aktinfilamenten. Dort können sich Proteine unspezifisch ansammeln. Durch Konfokalmikroskopie wurde gezeigt, daß CLP-36 spezifisch (d.h. in einer konfokalen Ebene) mit dem kortikalen Aktinsaum assoziiert.

Die Assoziation von CLP-36 mit dem Aktinzytoskelett konnte sowohl an permeabilisierten Zellen, als auch elektronenmikroskopisch an kryosubstituierten Ultradünnschnitten von Plättchen gezeigt werden. Darüberhinaus lokalisierte fluoreszierendes CLP-36-EGFP *in vivo* an das Aktinzytoskelett in Endothelzellen und Epithelzellen. Auch durch Zellfraktionie-

rung und anschließende Isolierung des F-Aktins wurde gezeigt, daß CLP-36 in den F-Aktinhaltigen Zellfraktionen aus Plättchenlysaten spezifisch mit F-Aktin assoziiert. Zusammengekommen zeigen diese Ergebnisse, daß CLP-36 und F-Aktin physikalisch assoziiert sind und daß diese Assoziation spezifisch ist und *in vivo* stattfindet. Die Lokalisation von CLP-36 legt nahe, daß es eine Rolle bei der Ausbildung, Funktion oder Regulation filamentöser Aktinstrukturen spielt. Diese ermöglichen den Gestaltwandel, die Kontraktion und Ausbreitung der Plättchen sowie die Kontraktion aktivierter Endothelzellen. Da CLP-36 in lysierten Plättchen auch in der membranskelettären Fraktion angereichert war, ist es wahrscheinlich auch mit dem Membranskelett assoziiert. Das Membranskelett besteht aus Aktinfilamenten, die die Zellform stabilisieren und ein Netzwerk für die Integration von Signalproteinen ausbilden. An dieser Stelle könnte CLP-36 auch in die Signaltransduktion zwischen Transmembranproteinen und dem Zytoskelett involviert sein.

Durch Elektronenmikroskopie konnte CLP-36 an den Fibrin/Plättchen-Kontakten im Plättchen-Klot detektiert werden. Fibrin/Plättchen-Kontakte sind spezielle fokale Adhäsionen (s. Einleitung), die sich spät nach der Thrombin-induzierten Fibrinbildung und Plättchenaggregation ausbilden. Das $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin wird durch Bindung an das multivalente Fibrin zu Klustern vereinigt und physikalisch mit dem Zytoskelett verknüpft. Dies geschieht über die cytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit, die durch Rekrutierung fokaler Adhäsionsproteine wie Vinkulin, Talin, Filamin und α -Aktinin mit dem kontraktile Aktomyosin verbunden wird. Die Kolokalisation von CLP-36 mit den Fibrin/Plättchen-Kontakten läßt darauf schließen, daß CLP-36 eine weitere Komponente dieser fokalen Adhäsionen darstellt. Als solche könnte es an der fibrinvermittelten Plättchenseparation und der sich anschließenden Retraktion des Plättchenklots, die mit einer Internalisierung der Fibrinbündel verbunden ist, beteiligt sein kann (Morgenstern et al., 1990).

5.4 Interaktion von CLP-36 mit α -Aktinin-1

Auf den Stressfasern war CLP-36 periodisch angeordnet und kolokalisierte mit dem filamentbündelnden α -Aktinin (s. 2.3.1). An dem lamellipodiärem Aktinsaum adhärenter Plättchen und dem kortikalen Aktinnetzwerk konfluenter Endothelzellen quervernetzt α -Aktinin Aktinfilamente. Dort kolokalisierte α -Aktinin ebenfalls mit CLP-36. An den α -Aktinreichen fokalen Adhäsionen in adhärenten Plättchen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen konnte allerdings kein CLP-36 detektiert werden. Entweder ist CLP-36 an den fokalen Adhäsionen nicht zugänglich für den Antikörper, oder es ist dort abwesend. Der Ausschluß von CLP-36 an den fokalen Adhäsionen in diesen Zellen könnte durch Maskierung der mit CLP-36 interagierenden Domäne von α -Aktinin oder durch kompetitive Bindung eines anderen Proteins verursacht werden.

Im *Yeast two-hybrid* System konnte CLP-36 direkt mit der nichtmuskulären Isoform α -Aktinin-1 interagieren. Durch Koimmunpräzipitation von CLP-36 und α -Aktinin aus Plättchenlysaten wurde gezeigt, daß die Interaktion beider Proteine spezifisch ist und *in vivo* stattfindet. In Affinitätsblots interagierte auch rekombinantes CLP-36 spezifisch mit α -Aktinin. Dies spricht dafür, daß eine posttranslationale Modifikation von CLP-36 für die Interaktion nicht nötig ist.

In unstimulierten Plättchen liegt zwar ca. 40% des Aktin Gehalts filamentös vor, aber nur ein Bruchteil sedimentiert aus Plättchenlysaten bei 15000g (Fox, 1993). Das erklärt sich daraus, daß die Filamente in ruhenden Plättchen kürzer und schwächer quervernetzt sind. Dies würde bedeuten, daß die Quervernetzung ein während der Aktivierung aktiv gesteuerter Prozeß ist und somit aktinfilament-quervernetzende Proteine wie α -Aktinin Zielproteine einer aktivierungsabhängigen Signalkaskade sind. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die Aktin-gelatierende Aktivität von α -Aktinin durch Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hand I und durch Bindung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat an die Aktin-bindende Domäne gesteuert wird (Fukami et al., 1992). Auch die Interaktion von α -Aktinin mit der Protein-kinase N, einem Effektor von Rho, wird direkt durch Ca^{2+} und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat reguliert (Mukai et al., 1997)(s. Einleitung). In diesem Zusammenhang wurde an Immunpräzipitaten untersucht, ob die Interaktion von CLP-36 mit α -Aktinin durch Aktivierung der Plättchen beeinflusst wird. Dazu wurden Plättchen mit Thrombin aktiviert, das zur vollständigen Plättchenaktivierung, verbunden mit Gestaltwandel, Sekretion und Aggregation, führt. Thrombin aktiviert die kleine GTPase Rho, die die Bildung von Phosphoinositiden induziert. Über eine Aktivierung der Phospholipase C bewirkt Thrombin auch die Mobilisierung von Ca^{2+} . Die CLP-36-bindende Aktivität von α -Aktinin blieb nach der Aktivierung mit Thrombin jedoch unverändert. Die Bindung von CLP-36 an α -Aktinin wurde auch durch Chelatierung des intrazellulären Ca^{2+} mit BAPTA-AM nicht beeinflusst. Die CLP-36/ α -Aktinin-Interaktion unterliegt also offenbar keiner aktivierungsabhängigen Regulation.

Eine Depolymerisation der Aktinfilamente durch Behandlung der Thrombozyten mit Cytochalasin D war ebenfalls ohne Einfluß auf die CLP-36/ α -Aktinin-Interaktion. Dies bedeutet, daß die Interaktion beider Proteine *in vivo* nicht an die Bindung von α -Aktinin an Aktinfilamente gekoppelt ist.

Durch Zellfraktionierung wurde festgestellt, daß CLP-36 und α -Aktinin während der Plättchenaktivierung koordiniert an das sich ausbildende zytosolische Aktinfilament-Netzwerk translozieren.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß CLP-36 und α -Aktinin konstitutiv interagieren und bereits im Zytosol als Komplex vorliegen, der für eine Aktinfilamentvernetzung nach Aktivierung der Zelle zur Verfügung steht.

5.5 Interaktion von CLP-36 mit Isoformen α -Aktinin-2 und α -Aktinin-4

CLP-36 interagiert nicht nur mit α -Aktinin 1, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, sondern auch mit α -Aktinin 2, das in der quergestreiften Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert wird, und mit α -Aktinin 4, das in nichtmuskulären Zellen exprimiert wird. Im Myokard assoziiert CLP-36 durch Bindung an die EF-Hand-Region von α -Aktinin-2 mit der Z-Scheibe und der interkalierenden Scheibe, die mit Vinkulin kolokalisiert (Kotaka et al., 2000). Der C-terminus von α -Aktinin-2 inhibiert die Verteilung von α -Aktinin entlang der dünnen Filamente des Muskels und hält somit den konstanten Abstand der periodisch angeordneten

Z-Scheiben aufrecht (Lin et al., 1998). Da CLP-36 mit der C-terminalen Region von α -Aktinin-2 interagiert, könnte es in diesen Prozeß involviert sein.

In COS-Zellen assoziierte CLP-36 mit α -Aktinin-4 (Vallénus et al., 2000), das mit Zellbewegung und Krebsinvasion in Zusammenhang gebracht wird (Honda et al., 1998). Das überexprimierte CLP-36 konnte vollständig mit α -Aktinin-4 kolokalisieren. In ausgebreiteten Thrombozyten schien das endogen exprimierte CLP-36 vor allem mit α -Aktinin-1 an dem kortikalen Aktinnetzwerk zu interagieren, während die Assoziation mit α -Aktinin-4, das im Zellzentrum konzentriert war, weniger klar war (s. Abb. 4.14). Es könnte daher sein, daß CLP-36 eine höhere Affinität zu der Isoform α -Aktinin-1 als zu α -Aktinin-4 besitzt.

Während eine verminderte Expression von α -Aktinin-1 gesteigerte Zellmotilität bewirkt und den Tumorphänotyp supprimiert, wurde für α -Aktinin-4 das Gegenteil gefunden (Glück und Ben-Ze'ev, 1994). Die Funktion der CLP-36/ α -Aktinin Interaktion ist somit differenziert zu betrachten. Der breiten Gewebsexpression von CLP-36 steht offenbar eine gewebsspezifische Funktion gegenüber, die durch Interaktion mit zelltyp-spezifischen α -Aktinin-Isoformen bestimmt wird.

In Nierenbiopsien von Patienten mit fokal segmentaler Glomerulosklerose wurde mit Antikörpern gegen α -Aktinin und dem für diese Arbeit hergestellten Antikörper gegen CLP-36 eine koordinierte Abnahme beider Proteine im Vergleich zum gesunden Gewebe festgestellt (Dr. Matthias Kretzler, persönliche Mitteilung). Morphologische Untersuchungen unterstützen die Annahme, daß ein verändertes Zytoskelett in den Podozyten für die insuffiziente Filtrationsbarriere der Glomeruli verantwortlich ist. Außerdem wurden Mutationen im ACTN4-Gen, das für α -Aktinin-4 kodiert, als Ursache für die familiäre Form der fokal segmentalen Glomerulosklerose erkannt (Kaplan et al., 2000). Möglicherweise kann CLP-36 von dem mutierten α -Aktinin-4 nicht mehr gebunden werden und wird in der Zelle zusammen mit α -Aktinin degradiert. Ob die Abnahme von CLP-36 in den sklerotischen Glomeruli nur Begleiterscheinung ist oder in kausalem Zusammenhang mit der Insuffizienz der Glomeruli steht, muß noch geklärt werden.

5.6 Kartierung der interagierenden Domänen

Im Yeast two-hybrid System konnten die interagierenden Regionen innerhalb der CLP-36- und α -Aktinin-Sequenz eingegrenzt werden. Im α -Aktinin-Molekül interagieren die α -helikalen "spectrin-like repeats" 2 und 3, die auf dem stabartigen Mittelteil des Moleküls liegen mit CLP-36. Dieselben "repeats" vermitteln auch die Dimerisierung zweier α -Aktinin Monomere zum funktionellen Dimer (Djinović-Carugo et al., 1999; s. 2.3.1). Der interagierende Bereich in CLP-36 konnte auf den Mittelteil (AS 81-256) zwischen der N-terminalen PDZ-Domäne und der C-terminalen LIM-Domäne eingegrenzt werden. Dieser zeigte die volle Bindungsaktivität. Der N-terminale Teil (AS 1-127) aus CLP-36, der die PDZ-Domäne enthält, und die LIM-Domäne (AS 257-329) konnten nicht an α -Aktinin-1 binden. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Kotaka (2000) erhaltenen *yeast two-hybrid*-Befunden überein, die zeigen, daß nicht die PDZ-Domäne, sondern der C-terminale Teil aus CLP-36, der den

Mittelteil enthält (AS 129-329), mit α -Aktinin-2 interagiert. Im Gegensatz dazu fand Valenius (2000), daß der N-terminale Teil der PDZ-Domäne (AS 1-24) für die Koimmunpräzipitation von CLP-36 und α -Aktinin-1 und -4 aus COS-Zellen benötigt wird. Die homologen Proteine ALP, ENH und Cypher binden ebenfalls über die PDZ-Domäne an α -Aktinin-2 (s. Abb.5.1), was durch Affinitätschromatographie, Koimmunpräzipitation und *yeast two-hybrid assays* gezeigt werden konnte. Methodische Probleme des *Yeast two-hybrid*-Systems scheinen daher nicht dafür verantwortlich zu sein, daß die PDZ-Domäne aus CLP-36 und α -Aktinin keine *yeast two-hybrid*-Interaktion zeigten. Auch die Expression der PDZ-Domäne in der Hefezelle wurde in der vorliegenden Arbeit kontrolliert und es wurde gefunden, daß das Hybridprotein DBD-CLP-36_{AS 1-104} exprimiert wird. Die PDZ-Domäne von CLP-36 scheint also im *yeast two-hybrid assay* tatsächlich nicht mit α -Aktinin-1 zu interagieren.

Das fluoreszierende EGFP-LIM Fusionsprotein konnte *in vivo* nicht an das Zytoskelett binden, sondern war homogen im Zytosol verteilt und hielt sich im Kern auf (s. Abb.4.26). Die nukleäre Lokalisation war jedoch nicht spezifisch für die LIM-Domäne, denn das Kontrollprotein EGFP gelangte ebenfalls in den Kern. Wahrscheinlich können beide Proteine aufgrund ihrer geringen Größe durch die Kernporen diffundieren. Das trunkierte CLP-36 Δ LIM kopräzipitierte weniger α -Aktinin aus Plättchenlysaten und zeigte *in vivo* eine geringere Affinität zum Aktinzytoskelett. Es könnte daher sein, daß die LIM-Domäne die Affinität zum α -Aktinin erhöht, wenn sie auch selbst nicht an α -Aktinin bindet. Sie könnte an der Stabilisierung und Positionierung bestimmter Aminosäuren beteiligt sein.

Mit dem *Yeast two-hybrid Screen* mit der LIM-Domäne als "bait" (nicht gezeigt) konnte kein Interaktionspartner der LIM-Domäne gefischt werden. Auch mit dem GST-LIM Fusionsprotein, das im *Pull-down-Assay* (nicht gezeigt) und im *Blot-overlay-Assay* (s. 4.9) eingesetzt wurde, konnte in Plättchenlysaten kein interagierendes Protein gefunden werden. Allerdings konnte mit dem His-LIM Fusionsprotein aus Plättchenlysate ein Protein mit einer Masse von ca. 20 kDa spezifisch kopräzipitiert werden (s. Abb.4.17). Hierbei könnte es sich um ein interagierendes Protein handeln. Möglicherweise führten die Fusionen der LIM-Domäne mit den Proteinen GST und EGFP zu einer sterischen Hinderung der LIM-Domäne, die die Interaktion mit anderen Proteinen blockierte. Durch Fusion der LIM-Domäne mit dem relativ kleinen "His-tag" könnte dagegen die Interaktion mit dem 20 kDa-Protein ermöglicht worden sein.

Viele LIM-Domäne-Proteine binden an Transkriptionsfaktoren oder konnten zumindest im Zellkern nachgewiesen werden (s. Einleitung). Die LIM-Domäne von CLP-36 könnte ebenfalls an ein nukleäres Protein binden, das allerdings in Plättchenlysaten nicht gefunden werden kann, denn Plättchen besitzen keinen Zellkern. Das fluoreszierende Fusionsprotein CLP-36-EGFP wurde allerdings in Endothel- und Epithelzellen nicht in den Zellkern importiert, so daß es eher unwahrscheinlich ist, daß die LIM-Domäne an ein nukleäres Protein bindet. Falls die LIM-Domäne von CLP-36 in Analogie zu den LIM-Domänen der verwandten PDZ/LIM-Domäne-Proteine an ein Signalezym bindet, so könnte dieses im Plättchenlysate schwer nachweisbar sein, da Signalezyme in der Zelle meist schwächer exprimiert sind.

Auch die EF-Hand-Region der skelettmuskulären Isoform α -Aktinin-2 (Kotaka et al., 2000) ist in der Lage, CLP-36 zu binden. Im Gegensatz zu α -Aktinin-2 bindet die EF-Hand I aus dem nichtmuskulären α -Aktinin-1 Ca^{2+} und reguliert dadurch die Bindung an

andere Proteine (Mukai et al., 1997). Da die Interaktion von CLP-36 und nichtmuskulärem α -Aktinin scheinbar Ca^{2+} -unabhängig ist (s.o.), ist es unwahrscheinlich, daß CLP-36 auch an die EF-Hand-Region der Isoform α -Aktinin-1 bindet.

5.7 CLP-36 auf Stressfasern

Entlang der Stressfasern und auf den Myofibrillen glatter Muskelzellen war CLP-36 periodisch angeordnet und kolokalisierte mit α -Aktinin-reichen Strukturen, den elektronendichten Banden. An den elektronendichten Banden werden die Aktinfilamente durch α -Aktinin gebündelt (s.2.3.1). Die Kolokalisation von CLP-36 und α -Aktinin beruht wahrscheinlich auf der direkten Interaktion beider Proteine (s.o.). Die elektronendichten Banden grenzen die sarkomerähnlichen Untereinheiten der Stressfasern ab und alternieren mit Tropomyosin, Myosin und Filamin (Sanger et al., 1983; Byers et al., 1984). Andere Proteine an den elektronendichten Banden sind Titin, Palladin, Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) und manchmal Zyxin, und sein Interaktionspartner Cystein-rich Protein (CRP) (Ayoob et al., 2000; Parast und Otey, 2000; Reinhard et al., 1992; Crawford et al., 1992; Pomies et al., 1997). Titin, Palladin, Zyxin und CRP1 interagieren wie CLP-36 direkt mit α -Aktinin. Palladin ist essentiell für die Ausbildung der Stressfasern und fokalen Adhäsionen und existiert in multiplen Isoformen, von denen einige entwicklungsabhängig exprimiert werden. Proteine der CRP-Familie spielen eine wichtige Rolle während der Muskeldifferenzierung (Arber et al., 1997; Pomies et al., 1997). Zyxin und CRP binden an die Aktin-bindende Domäne von α -Aktinin und enthalten Bindungsstellen für SH2- und SH3-Domänen, über die Signalproteine rekrutiert werden können. α -Aktinin kann auch selber Signalproteine rekrutieren: es interagiert über den "spektrin-like repeat" 3 und die EF-Hand-Region mit der Proteinkinase N und einer Serin/Threonin-Kinase des MAP-Kinase Signalweges, MEKK1. Die Proteinkinase N ist ein Effektor der kleinen GTPase Rho und phosphoryliert α -Aktinin *in vitro* (s. Einleitung). MEKK1 vermittelt die mitogeninduzierte Zellmigration und kolokalisiert mit α -Aktinin entlang der elektronendichten Banden (Christerson et al., 1999).

Zusammen sprechen diese Daten dafür, daß α -Aktinin neben seiner filamentquervernetzenden Funktion auch eine Rolle in der Signaltransduktion spielt und als Gerüstprotein die Organisation spezifischer Proteinkomplexe reguliert.

Zellmigration verlangt eine dynamische Regulation der Filamentquervernetzung. Phosphoinositide sind als negative (PI-3,4,5-P_3) und positive Regulatoren (PI-4,5-P_2) der aktinfilamentbindenden Aktivität von α -Aktinin bereits bekannt. Die Funktion α -Aktinin-binder Proteine an den elektronendichten Banden ist jedoch unklar. Die Proteine der CRP-Familie binden an Zyxin und α -Aktinin und zeigen überlappende Gewebsexpression in embryonalen Epithelien und Fibroblasten (Louis et al., 1997). CLP-36 wird ebenfalls in embryonalen Epithelzellen exprimiert. Auch die verschiedenen Isoformen von Palladin werden verstärkt in sich entwickelnden Geweben exprimiert. Aufgrund der überlappenden Gewebsexpression in embryonalen Zellen könnten α -Aktinin, Zyxin, CRP, Palladin und CLP-36 einen Proteinkomplex an den elektronendichten Banden der Stressfasern bilden, der an der Organisation des Zytoskeletts während der strukturellen und funktionellen Differenzierung der Zellen beteiligt ist. Die Proteinkinase N oder die MAP-Kinase-Kinase MEKK1 binden an α -Aktinin

und könnten daher potentielle Regulatoren dieses Komplexes darstellen. Durch Besitz der Protein/Protein-Interaktionsmotive LIM und PDZ ist CLP-36 prädestiniert, eine Rolle als Adapterprotein in diesem hypothetischen Proteinkomplex zu übernehmen. Rekombinantes CLP-36 veränderte die viskoelastischen Eigenschaften eines Aktin/ α -Aktinin-Netzwerkes weder in Zeit- noch in Frequenz-abhängigen Messungen (nicht gezeigt, s. 3.19). CLP-36 scheint also *per se* die filamentquervernetzenden Eigenschaften von α -Aktinin nicht zu beeinflussen. Dies weist ebenfalls auf eine Adapterfunktion von CLP-36 hin. CLP-36 besitzt phylogenetisch hochkonservierte Serinreste im Mittelteil des Proteins und ist in Plättchen an Serinresten phosphoryliert (s. Abb. 4.4 und 4.31). Die Adapterfunktion von CLP-36 könnte somit durch Serinkinasen reguliert werden.

Es wurde erwartet, daß die CLP-36/ α -Aktinin-Assoziation durch Mikroinjektion von affinitätsgereinigtem CLP-36-Antikörper kompetitiv blockiert werden kann. Um die Funktion von CLP-36 *in vivo* zu untersuchen, wurden migrierende Endothelzellen mit CLP-36-Antikörper injiziert. Die Mikroinjektion des Antikörpers führte jedoch zu keiner sichtbaren Veränderung des Phalloidin-F-Aktin-Zytoskletts. Aus der nachträglichen Immunfluoreszenzdetektion von CLP-36 ging hervor, daß CLP-36 noch gut auf den Stressfasern nachweisbar war und daher der Antikörper wahrscheinlich nur unzureichend CLP-36 aus seiner Bindung an α -Aktinin verdrängen konnte.

5.8 *In vivo* Dynamik von CLP-36 in PtK2-Zellen

Die Assoziation von CLP-36 an Aktinstrukturen konnte durch Expression eines fluoreszierenden CLP-36/EGFP-Fusionsproteins in lebenden PtK2-Zellen visualisiert werden. CLP-36 lokalisierte an die Stressfasern in periodischer Anordnung, die der für PtK2-Zellen typischen sarcomeren Perodizität der α -Aktinin-reichen elektronendichten Banden entsprach (Sanger et al., 1983). Darüber hinaus war CLP-36-EGFP an den adhärenen Zellkontakten angereichert. An diesen Regionen inserieren Aktinfilamente in die Membran (Sanger et al., 1983). An Lamellipodien konzentrierte EGFP-markiertes CLP-36 in hochmotilen Spots und konzentrierte sich in einer Front in dem sich ausbreitenden Lamellipodium. In Membrankräuselungen¹ war CLP-36 ebenfalls angereichert. Beides weist auf eine Funktion von CLP-36 bei der Ausbreitung der peripheren Aktinnetzwerke hin.

Die Bildung von Kräuselungen und Lamellipodien (Kotani et al., 1997; Nishiyama et al., 1994) wird in epithelialen Zelllinien (MDCK, KB) auch durch RhoA reguliert. Aktiviertes RhoA assoziiert mit den peripheren Membrankräuselungen und den Lamellipodien an den Zellpolen migrierender Endothelzellen (Menager et al., 1999). Es ist daher denkbar, daß die Motilität von CLP-36 an diesen Regionen über den Signalweg RhoA \rightarrow Proteinkinase N \rightarrow α -Aktinin \rightarrow CLP-36 reguliert wird.

Die Lamellipodien, die elektronendichten Banden auf den Stressfasern und die adhärenen Zellkontakte besitzen die Gemeinsamkeit, daß sie α -Aktinin-reiche Zytoskelettstrukturen darstellen mit einer hohen Konzentration an schnell-wachsenden Filamentenden². An diesen

¹engl. "ruffles"

²engl. "barbed ends"

Filamentenden wird monomeres Aktin inkorporiert (Sanger et al., 1983; Turnacioglu et al., 1998). Zur Quervernetzung der wachsenden Aktinfilamente müssen neue CLP-36/ α -Aktinin-Komplexe aus dem Zytosol rekrutiert werden. Dies könnte die hohe Motilität der CLP-36-Spots an den Lamellipodien und Stressfasern erklären. Die motilen Spots nahe der Stressfasern waren kleiner und weniger als an den Lamellipodien und Membrankräuselungen. Dies könnte die geringere Aktindynamik an den Stressfasern widerspiegeln, an denen der Austausch von monomeres Aktin etwa 10mal langsamer stattfindet als an den Lamellipodien (Theriot und Mitchison, 1991; Amato und Taylor, 1986).

Einige der hochmotilen Punkte wurden bei größerer zeitlicher Auflösung der Videos als schweifartige Strukturen sichtbar. Da CLP-36 an F-Aktinstrukturen assoziiert, dürfte es sich hierbei um polymerisierendes Aktin handeln. Schafer et al. (1998) fanden, daß GFP-markiertes ARP2/3 (Aktin Related Protein 2/3) und Capping Protein, die *in vitro* den Zusammenbau von Aktin regulieren, an den Lamellipodien ebenfalls in motilen Spots konzentriert sind. Die Bildung und Beweglichkeit dieser Spots ist an Aktinpolymerisation geknüpft und abhängig von der Aktivität der kleinen GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 ist. Da diese "spots" eine ähnliche Dynamik und Lokalisation zeigen wie die motilen Punkten, in denen EGFP-markiertes CLP-36 konzentriert, könnten beide identisch sein. F-Aktin wäre dann mit Arp2/3, Capping Protein und CLP-36 in einem transientem Aktinpolymer vereinigt. Es ist wahrscheinlich, daß diese spots auch das mit CLP-36 interagierende α -Aktinin enthalten. Möglicherweise stellen die transienten Aktinfilamente in den Spots ein Gerüst dar, an dem Proteine für die Signaltransduktion rekrutiert werden, allerdings könnten Aktinschweife auch spontan entstehen, wenn lokal die Aktivierungsenergie für eine *de novo* Polymerisation von Aktin erreicht wird.

5.9 Phosphorylierung von CLP-36

Die meisten Proteine der PDZ/LIM-Domäne-Familie binden über ihre PDZ-Domäne an zytoskelettassoziierte Proteine, während die LIM-Domänen spezifisch mit signalübermittelnden Kinasen und Phosphatasen interagieren (s.5.1). CLP-36 ist wahrscheinlich ebenfalls ein Adaptermolekül, das Signaleenzyme an das Aktinzytoskelett lokalisiert. Eine oder mehrere aktivierte Kinasen könnten CLP-36 phosphorylieren und so die Translokation von CLP-36 an die Aktinfilamente regulieren in einem analogen Mechanismus wie für ENH und der interagierenden Kinase PKC gezeigt wurde (s.o.). Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von CLP-36 würde dann wie ein molekularer Schalter wirken, der die Translokation des CLP-36/ α -Aktinin-Komplexes an die Aktinfilamente reguliert.

CLP-36 wurde ursprünglich als potentiell Substrat der Proteinkinase A aus Plättchen isoliert (s.2.1). Die Proteinkinase A wird durch Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle aktiviert. Trotzdem konnte durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Iloprost kein Anstieg der basalen Serinphosphorylierung von CLP-36 induziert werden (s.4.12.1). CLP-36 ist also offenbar kein Substrat der cAMP-abhängigen Proteinkinase

se A, sondern wurde im 2D-Gel als komigrierendes, "kontaminierendes" Protein anstatt des tatsächlichen Substrats isoliert. Außerdem konnten Karin Luber und Christian Eckerskorn (MPI, München) durch Trypsinverdau und anschließende Mikrosequenzanalyse ein phosphoryliertes Heptapeptid in dem Proteinspot ermitteln, das nicht in der Sequenz von CLP-36 gefunden werden konnte. Dies weist ebenfalls darauf hin, daß in Plättchen ein zweites Protein mit einem ähnlichem Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt wie CLP-36 existiert, daß cAMP-abhängig phosphoryliert wird. Die Heptapeptid-Sequenz konnte bisher in keinem anderen Protein gefunden werden (Suche der SWISS-prot Datenbank mit "advanced BLAST" bei NCBI, nach Altschul et al., 1997), so daß das 38 kDa Proteinkinase A - Substrat in Plättchen noch nicht identifiziert werden konnte.

Die LIM-Kinasen I und II werden durch die kleinen GTPase Rho, Rac und CDC42 aktiviert und partizipieren an der durch Rho induzierten Stressfaserbildung, der durch Cdc42 induzierten Filopodienbildung und der durch Rac vermittelten Lamellipodienbildung. Sie phosphorylieren den aktindepolymerisierenden Faktor Cofilin (Yang et al., 1998; Sumi et al., 1999) und regulieren damit den Aktin-*turn-over* (s. Einleitung). CLP-36 wurde von beiden Kinasen nicht phosphoryliert, obwohl es ein 4-Aminosäuren-Peptid (ASGV) enthält, das identisch mit der Konsensussequenz ist, an der die aktindepolymerisierenden Faktoren phosphoryliert werden. CLP-36 scheint also nicht in die LIM-Kinase I/II-vermittelte Umorganisation des Zytoskeletts involviert zu sein, sondern über andere Effektormoleküle an der Zytoskelettdynamik zu partizipieren.

5.10 Schlussbetrachtung

Funktionell können Proteinkomplexe in der Zelle als eine Art Schaltstelle betrachtet werden, auf die positive und negative Signale eintreffen können und von der aus Signale ausgehen. Proteinkomplexe erlauben eine effizientere und spezifischere Signaltransduktion, da Signal- und Zielproteine in räumliche Nachbarschaft gebracht werden. Die Proteininteraktionsmotive PDZ und LIM sind beide phylogenetisch hoch konserviert (s. Einleitung). Trotzdem ließen sich Proteine, die PDZ- und LIM-Domänen besitzen, in den Sequenz-Datenbanken der Hefepilze (*Saccharomyces*) und kollektiven Amöben (*Dictyostelium*) nicht mehr finden. Aus evolutionärer Sicht sind PDZ/LIM-Domäne-Proteine also wahrscheinlich während der Entwicklung höherer Metazoa, durch Vereinigung der sich konvergent entwickelnden Proteinmotive PDZ und LIM in einem Gen, hervorgegangen. Höhere Metazoa zeigen ein komplexeres Maß der zellulären Regulation, da sie auf Zellkommunikation angewiesen sind und Gewebsdifferenzierung und Organogenese programmieren müssen. Es ist leicht nachvollziehbar, daß hierfür auch eine Diversifizierung von Adapterproteinen nötig ist. So sind auch die Adapterproteine CLP-36, ALP, ENH und Ril wahrscheinlich an der Gewebsdifferenzierung beteiligt. Während ALP und ENH mit der Differenzierung des Herz- und Skelettmuskels in Zusammenhang gebracht werden, scheinen CLP-36 und Ril während der Entwicklung der Epithelien benötigt zu werden.

6

Zusammenfassung

CLP-36 war in der Arbeitsgruppe aus humanen Thrombozyten gereinigt und anschließend kloniert worden. In dieser Arbeit wurde CLP-36 mit primär immunchemischen Ansätzen auf molekularer und zellulärer Ebene charakterisiert und funktionell eingeordnet. Dies schloß die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von CLP-36, die Suche nach interagierenden Proteinen, sowie Versuche zur Regulation von CLP-36 ein.

CLP-36 besitzt eine N-terminale PDZ- und eine C-terminale LIM-Domäne und gehört somit zur Gruppe der PDZ/LIM-Domäne-Proteinfamilie. Die meisten Proteine dieser Familie binden mit ihrer PDZ-Domäne Zytoskelettproteine und mit der(den) LIM-Domäne(n) Signalproteine. Sie sind wahrscheinlich an der Ausbildung von Proteinkomplexen an spezialisierten Zytoskelett- und Membranregionen beteiligt.

Außer in Thrombozyten konnte CLP-36 auch in anderen Zelltypen des vaskulären Systems, nämlich in venösen und arteriellen Endothelzellen und in venösen Muskelzellen nachgewiesen werden. Die Analyse von EST-Sequenzen zeigte, daß CLP-36 in über 25 Geweben, Fibroblasten und Jurkat-T-Zellen exprimiert ist. CLP-36 ist also im Gegensatz zu den verwandten PDZ/LIM-Domäne-Proteinen ALP, EH und Cypher nicht auf Herz- und Skelettmuskel restringiert. CLP-36 war in Endothelzellen, Plättchen, glatten Muskelzellen und Epithelzellen mit dem Aktinzytoskelett assoziiert. Dies konnte in permeabilisierten Zellen durch Immunfluoreszenzdetektion und in lebenden Zellen durch videomikroskopische Beobachtung eines heterolog exprimierten CLP-36-EGFP-Fusionsproteins gezeigt werden. CLP-36 war in adhärennten Plättchen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nicht mit den fokalen Adhäsionen assoziiert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen serieller Schnitte an aggregierte Plättchen im Gerinnsel zeigten, daß CLP-36 an speziellen fokalen Kontakten in Plättchen auftreten kann. Diese verankern das kontraktile Zytoskelett über das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit dem extrazellulären Fibrin und besitzen eine wichtige Funktion während der Bildung und Retraktion des Plättchengerinnsels.

CLP-36 lokalisierte in allen Zelltypen an α -Aktinin -reiche Strukturen des Zytoskeletts, nämlich die elektronendichten Banden der Stressfasern, die Zell/Zell-Kontakte, die fokalen Kontakte, die Lamellipodien und Membrankräuselungen sowie die Filopodien und kortikalen Aktinfilamente in aktivierten Plättchen. Diese Kolo-kalisation wurde großteils durch Doppel-Immunfluoreszenz-Detektion von CLP-36 und α -Aktinin gezeigt.

Zusammenfassung

Es wurde gefunden, daß die Kolo-kalisation von CLP-36 und α -Aktinin auf einer direkten und spezifischen Interaktion beider Proteine beruht. Dies konnte *in vitro* durch Affinitätsblotting, *in vivo* durch Koimmunpräzipitation, sowie molekularbiologisch im *Yeast two-hybrid* System gezeigt werden. Im *Yeast two-hybrid* System konnten die für die Interaktion verantwortlichen Regionen eingegrenzt werden: die *spectrin-like repeats* 2 und 3 in α -Aktinin-1 interagierten spezifisch mit dem Mittelteil der CLP-36-Sequenz, der zwischen der N-terminalen PDZ-Domäne und der C-terminalen LIM-Domäne liegt und reich an Serin- und Prolinresten ist. Weder die PDZ- noch die LIM-Domäne konnten an α -Aktinin-1 binden. Die LIM-Domäne allein war weder *in vivo* noch *in vitro* mit Aktin, α -Aktinin oder einem anderen Zytoskelettprotein assoziiert. Allerdings zeigte das komplette Protein *in vivo* und im Immunpräzipitat eine höhere Affinität zu α -Aktinin als das deletierte CLP-36 ohne die LIM-Domäne. Die LIM-Domäne könnte also die Interaktion zwischen CLP-36 und α -Aktinin stabilisieren.

α -Aktinin bündelt, quervernetzt und verankert Aktinfilamente in der Zelle. Eine Depolymerisation der Aktinfilamente in Plättchen durch Cytochalasin D beeinflusste nicht die Bindung von CLP-36 an α -Aktinin. Dies zeigt, daß die CLP-36/ α -Aktinin-Interaktion unabhängig von der Bindung von α -Aktinin an Aktin stattfindet. Auch nach Aktivierung der Plättchen mit Thrombin und Chelatierung des intrazellulären Ca^{2+} durch BAPTA-AM war die Bindung von CLP-36 an α -Aktinin unbeeinflusst. Außerdem wurde durch Zellfraktionierung gezeigt, daß CLP-36 und α -Aktinin nach Aktivierung der Plättchen koordiniert an das zytosolische Aktinzytoskelett translozieren. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß CLP-36 und α -Aktinin konstitutiv interagieren und bereits im Zytosol als Komplex vorliegen, der für eine Aktinfilamentvernetzung nach Aktivierung der Zelle zur Verfügung steht. In Affinitätsblots bindet auch bakteriell exprimiertes CLP-36 an α -Aktinin; dies zeigt, daß für die Interaktion keine posttranslationale Modifikation von CLP-36 nötig ist.

Die intrazelluläre Dynamik von CLP-36 wurde in lebenden Epithelzellen durch Fusion von CLP-36 mit dem grün fluoreszierenden Protein (EGFP) untersucht. Videomikroskopische Aufnahmen zeigten, daß CLP-36 auch in der lebenden Zelle an Aktinfilamente lokalisierte. Es war an den Stressfasern, Lamellipodien und Zell/Zell-Kontakten sowie an membrannahen Vesikeln konzentriert. Es zeigte eine hohe Motilität an dynamischen Zytoskelettregionen, v.a. den Lamellipodien und Membrankräuselungen. In den sich ausbreitenden Lamellipodien und Membrankräuselungen assoziierte es mit sich schnell bewegenden Spots. Diese motilen Spots wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals entdeckt und könnten neue Aspekte der Aktinfilamentdynamik aufdecken. Sie könnten mit der Ausbreitung der kortikalen Aktinnetzwerke in Zusammenhang stehen. Die Funktion von CLP-36 ist also wahrscheinlich an die Umorganisation des Zytoskeletts, insbesondere die Ausbreitung der Lamellipodien und Membrankräuselungen, und die zytoskelettabhängigen Endozytose von Vesikeln geknüpft.

CLP-36 wird in Plättchen an Serin phosphoryliert, ist also möglicherweise Substrat einer signaltransduzierenden Kinase. Eine Phosphorylierung von CLP-36 in Blutplättchen durch die cAMP-abhängigen Proteinkinase A ließ sich nicht bestätigen. CLP-36 kann also nicht mit einer Inhibierung der Plättchenfunktion in Zusammenhang gebracht werden. CLP-36 wurde auch nicht durch die LIM-Kinasen I und-II phosphoryliert, obwohl CLP-36 die typische Erkennungssequenz der LIM-Kinasen, bestehend aus einer Abfolge von 4-6 konservierten

Aminosäuren, enthält. CLP-36 scheint also nicht in die LIM-Kinase I/II-vermittelte Umorganisation des Zytoskeletts involviert zu sein, sondern über andere Effektormoleküle an der Zytoskelettdynamik zu partizipieren.

Das Vorliegen der beiden Protein/Protein-Interaktionsmotive LIM und PDZ in CLP36, und die hohe Sequenzidentität mit dem PDZ/LIM-Domäne Protein Ril deuten darauf hin, daß CLP-36 als Adapterprotein die Bildung und Organisation eines funktionellen Proteinkomplexes vermittelt. Als Komponente dieses Komplexes konnte α -Aktinin identifiziert werden, das über die "spectrin-like repeats" 2 und 3 mit dem Mittelteil von CLP-36 interagiert. Die Interaktion und Kollokalisierung von CLP-36 mit α -Aktinin an den Zellkontakten, den Lamellipodien, den elektronendichten Banden der Stressfasern und der Z-Scheibe des Muskelsarkomers läßt vermuten, daß dieser hypothetische Proteinkomplex die Quervernetzung und Verankerung der Aktinfilamente reguliert. Die breite Gewebsexpression von CLP-36 in nicht-muskulärem, glattmuskulärem und skelettmuskulärem Gewebe sowie die Fähigkeit von CLP-36 mit den typischen Isoformen des α -Aktinins zu interagieren, lassen auf eine ubiquitäre Funktion von CLP-36 schließen. Die hohe Konzentration und Motilität von CLP-36 an dynamischen Zytoskelettregionen wie den Lamellipodien und Membran-Ruffles deuten auf eine Beteiligung dieses Proteins an den dynamischen Vorgängen am Aktinzytoskelett hin. Diese sind letztendlich essentiell für die Lebensfähigkeit und Funktionalität der Zelle.

7

Literatur

Adams MD, Soares MB, Kerlavage AR, Fields C, Venter JC: Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nat Genet* 1993, **4**(4):373-80.

Agnew BJ, Minamide LS, Bamburg JR: Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem* 1995, **270**(29):17582-7.

Allen RD, Zacharski LR, Widirstky ST, Rosenstein R, Zaitlin LM, Burgess DR: Transformation and motility of human platelets. *J Cell Biol* 1979, **83**:126-42.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, zhang Z, Miller W, Lipmann DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. 1997 *Nucleic acids research* 1997, **25**:3389-3402.

Arber S, Caroni P: Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions *in situ*. *Genes Dev* 1996, **10**(3):289-300.

Arber S, Hunter JJ, Ross J, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P: MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organisation, dilated cardiomyopathy and heart failure. *Cell* 1997, **88**:393-403.

Ayoob JC, Turnacioglu KK, Mittal B, Sanger JM, Sanger JW: Targeting of cardiac muscle titin fragments to the Z-bands and dense bodies of living muscle and non-muscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000, **45**(1):67-82.

Bartles JR: Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2000, **12**:72-8.

Bauer K, Kratzer M, Otte M, Lubber K, Hagmann J, Arnold G, Eckerskorn C, Lottspeich F, Siess W: Human CLP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to α -actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. *Blood* 2000, in press.

Beckerle MC: Zyxin: zink fingers at sites of cell adhesion. *Bioessays* 1997, **19**(11):949-57.

- Bogusch G, Dierichs R:** Outgrowing nerves in the foreleg of a mouse embryo as viewed by three-dimensional reconstruction from electron micrographs. *Cell Tissue Res* 1995, **280**(1):197-9.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH:** Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991 **351**:714-8.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS:** Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 1996, **84**(5):757-67.
- Brown MC, Perrotta JA, Turner CE:** Identification of LIM3 as the principal determinant of focal adhesion localisation and charactersiation of a novel motif on paxillin directing and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol* 1996, **135**(4):1109-23.
- Byers HR, Fujiwara K:** Stress fibers in cells *in situ*. Immunofluorescence visualisation with anti-actin, antimyosin, and anti-alpha-actinin. *J Cell Biol* 1982, **93**(3):804-11.
- Byers HR, White GE, Fujiwara K:** Organisation and function of stress fibers in cells *in vitro* and *in situ* A review. *Cell Muscle Motil* 1984, **5**:83-137.
- Casella JF, Flanagan MD, Lin S:** Cytochalasin D inhibits actin polymerisation and induces depolymerisation of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* 1981, **293**:302-5.
- Chen H, Bernstein BW, Bamburg JR:** Regulating actin-filament dynamics *in vivo*. *TIBS* 2000, **25**:19-23.
- Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA:** The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 1994, **79**:507-13.
- Christerson LB, Vanderbilt CA, Cobb MH:** MEKK1 interacts with α -actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. *Cell Motil Cytoskel* 1999, **43**:186-98.
- Cohen NA, Sha Q, Makhina EN, Lopatin AN, Linder ME, Snyder SH, Nichols CG:** Inhibition of an inward rectifier potassium channel (Kir2.3) by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem* 1996, **271**(50):32301-5.
- Combeau C, Carlier MF:** Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF₃ and AlF₄. *J Biol Chem* 1988, **263**(33):17429-36.
- Crawford AW, Michelsen JW, Beckerle MC:** An interaction between zyxin and α -actinin. *J Cell Biol* 1992, **116**(6):1381-93.
- Critchley DR, Flood G:** α -actinins. In *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*, edn 2. Edited by Kreis T, Vale R. Oxford:Oxford University Press; 1999:24-7.
- Critchley DR:** Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* 2000, **12**:133-9.

Cudmore S, Gossart P, Griffiths G, Way M: Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 1995, **378**(6557):636-8.

Cuppen E, Gerrits H, Pepers B, Wieringa B, Hendriks W: PDZ motifs in PTP-BL and RIL bind to internal protein segments in the LIM domain protein RIL. *Mol Biol Cell* 1998, **9**:671-83.

Cuppen E, van Ham M, Wansink DG, de Leeuw A, Wieringa B, Hendriks W: The zyxin-related protein TRIP6 interacts with PDZ motifs in the adapter protein RIL and the protein tyrosine phosphatase PTP-BL. *Eur J Cell Biol* 2000, **79**:283-93.

Dawid IB, Breen JJ, Toyama R: LIM domains: multiple roles as adapters and modifiers in protein interactions. *TIG* 1998, **14**(4):156-61.

Dijinović-Carugo K, Young P, Gautel M, Saraste M: Structure of the α -actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell* 1999, **98**:537-46.

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 1988, **16**(13):6127-45.

Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R: Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 1996, **85**(7):1067-76.

Durick K, Wu R-Y, Gill GN, Taylor SS: Mitogenic signaling by *ret/ptc2* requires association with *enigma* via a LIM domain. *J Biol Chem* 1996, **271**(22):12691-4.

Durick K, Gill GN, Taylor SS: Shc and Enigma are both required for mitogenic signaling by *Ret/ptc2*. *Mol Cell Biol* 1998, **18**(4):2298-308.

Ehringer WD, Wang OL, Haq A, Miller FN: Bradykinin and alpha-thrombin increase human umbilical vein endothelial macromolecular permeability by different mechanisms. *Inflammation* 2000, **24**(2):175-93.

Erl W, Hansson GK, De Martin R, Draude G, Weber KS, Weber C: Nuclear factor-kappaB regulates induction of apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1999, **84**(6):668-77.

Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K: Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1998, **273**:21867-74.

Estojak J, Brent R, Golemis EA: Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol Cell Biol* 1995, **15**(10):5820-9.

Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR: Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 1978, **15**(7):129-36.

Fanning AS, Anderson JM: PDZ domains: fundamental building blocks in the organisation of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 1999, **103**(6):767-2.

- Faulkner G, Pallavicini A, Formentin E, Comelli A, Ievolella C, Travisan S, Bortoletto G, Scannapico P, Salamon M, Mouly V, Valle G, Lanfranchi G:** ZASP: a new Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *J Cell Biol* 1999, **146**(2):465-75.
- Flick JS, Johnston M:** Two systems of glucose repression of the GAL1 promotor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* , **10**(9):4757-4769.
- Fox JE, Boyles JK, Reynolds CC, Phillips DR:** Actin filament content and organisation in unstimulated platelets. *J Cell Biol* 1984, **98**(6):1985-91.
- Fox JE, Boyles JK, Berndt MC, Steffen PK, Anderson LK:** Identification of a membrane skeleton in platelets. *J Cell Biol* 1988, **106**(5):1525-38.
- Fox JE:** The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 1993, **70**(6):884-93.
- Fox JE:** Regulation of platelet function by the cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol* 1993b, **344**:175-85.
- Fox JE:** Regulation of platelet function by the cytoskeleton. In *Mechanisms of platelet activation and control* edited by K.S. Authi et al., *Plenum Press*, New York, 1993:175-185
- Fregien N, Davidson N:** Activating elements in the promotor region of the chicken beta-actin gene. *Gene* 1986, **48**(1):1-11.
- Freyd G, Kim SK, Horvitz HR:** Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene lin-11. *Nature* 1990, **344**:876-9.
- Fukami K, Furuhashi K, Inagaki T, Endo T, Hatano S, Takenawa:** Requirement of phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate for α -actinin function. *Nature* 1992, **359**:150-2.
- Furukawa R, Fechheimer M:** The structure, function, and assembly of actin filament bundles. *Int Rev Cytol* 1997, **175**:29-89.
- Galdal KS, Evensen SA, Hoglund AS, Nilsen E:** Actin pools and actin microfilament organisation in cultured human endothelial cells after exposure to thrombin. *Br J Haematol* 1984, **58**(4):617-25.
- Gill SD, von Hippel PH:** Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 1989, **182**(2):319-26.
- Glück U, Ben-Ze'ev A:** Modulation of α -actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. *J Cell Sci* 1994, **107**:1773-82.
- Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW:** Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J* 1996, **313**:353-68.
- Guy PM, Kenny DA, Gill GN:** The PDZ domain of the LIM protein enigma binds to β -tropomyosin. *Mol Biol Cell* 1999, **10**:1973-1984.
- Halbrügge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Walter U:** Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem* 1990, **265**:3088-3093.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: the p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993, **75**:805-16.

Hartwig JH: Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol* 1992, **118**(6):1421-42.

Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A, Stossel TP: Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 1995, **82**(4):643-53.

Heimer GV, Taylor CE: Improved mountant for immunofluorescence preparations. *J Clin Pathol* 1974, **27**(3):254-6.

Hock B, Böhme B, Karn T, Yamamoto T, Kaibuchi K, Holtrich U, Holland S, Pawson T, Rüksamen-Waigmann H, Strebhardt K: PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**(17):9779-9784.

Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S: Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 1998, **140**(6):1383-1393.

Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burrridge K: Interaction of plasma-membrane fibronectin receptor with talin – a transmembrane linkage. *Nature* 1986, **320**:531-533.

Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobuc K, Nakatauji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T, Alzawa S: Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 1995, **377**:539-544.

Ishino K, Kaneyama Jr, Shibamura M, Nose K: Specific decrease in the level of Hic-5, a focal adhesion protein, during immortalization of mouse embryonic fibroblasts, and its association with focal adhesion kinase. *J Cell Biochem* 2000, **76**(3):411-9.

Ishino M, Aoto H, Sasaki H, Suzuki R, Sasaki T: Phosphorylation of Hic-5 at tyrosine 60 by CAK β and Fyn. *FEBS Lett* 2000, **474**(2-3):179-83.

Ito S, Werth DK, Richert ND, Pastan I: Vinculin phosphorylation by the src kinase. Interaction of vinculin with phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 1983, **258**(23):14626-31.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunological criteria. *J Clin Invest* 1973, **52**(11):2745-56.

Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rudiger M, Schluter K, Stanke G, Winkler J: The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, **11**:379-416.

Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong H-Q, Mathis BJ, Rodriguez-Perez J-C, Allen PG, Beggs AH, Pollack MR: Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genet* 2000, **24**:251-6.

- Karlsson O, Thor S, Njoberg T, Ohlsson H, Edlund T:** Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 1990, **344**:879-82.
- Khoory W, Wu E, Svoboda KK:** Intracellular relationship between actin and alpha-actinin in a whole coreneal epithelial tissue. *J Cell Sci* 1993, **106**:703-17.
- Kiess M, Scharm B, Aguzzi A, Hajnal A, Klemenz R, Schwarte-Waldhoff I, Schäfer R:** Expression of *ril*, a novel LIM domain gene, is down-regulated in *HRAS*-transformed cells and restored in phenotypic revertants. *Oncogene* 1995, **10**:61-68.
- Kincaid RL, Billingsley MC, Vaughan M:** Preparation of fluorescent, cross-linking, and biotinylated calmodulin derivatives and their use in studies of calmodulin-activated phosphodiesterase and protein phosphatase. *Methods Enzymol* 1988, **159**:605-26.
- Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ:** Interaction of α -actinin with cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via α -catenin. *J Cell Biol* 1995, **130**(1):67-77.
- Konrat R, Weiskirchen R, Kräutler B, Bister K:** Solution structure of the carboxy-terminal LIM domain from quail cysteine-rich protein CRP2. *J Biol Chem* 1997, **272**(18):12001-12007.
- Kotaka M, Ngai SM, Garcia-Barcelo M, Tsui SK, Fung KP, Lee CY, Waye MM:** Characterisation of the human 36-kDa carboxyl terminal LIM domain protein (hCLIM1). *J Cell Biochem* 1999, **72**(2):279-85.
- Kotaka M, Li SMY, Kostin S, Ngai S, Chan K, Lau Y, Li H, Ng EKO, Schaper J, Tsui SKW, Fung K, Lee C-Y, Way MMY:** Interaction of hCLIM1, an enigma family protein with α -actinin 2. *J Cell Biochem*, 2000 **78**:558-65.
- Kreis TE, Birchmeier W:** Stress fiber sarcomers of fibroblasts are contractile. *Cell* 1980, **22**:555-61.
- Kuroda S, Tokunaga C, Kiyohara Y, Higuchi O, Konishi H, Mizuno K, Gill GN, Kikawa U:** Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C. *J Biol Chem* 1996, **271**(49):31029-32.
- Kyte J and Doolittle RF:** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982, **157**(1):105-132.
- Laemmli, UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**:680-85.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF:** Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996, **84**:359-69.
- Li L, Elledge SJ, Peterson CA, Bales ES, Legerski RJ:** Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proc Natl Acad Sci* 1994, **91**:5012-16.
- Lin Z, Hijikata T, Zhang Z, Choi J, Holtzer S, Sweeney HL, Holtzer H:** Dispensability of the actin-binding site and spectrin repeats for targeting sarcomeric α -actinin into maturing Z-bands *in vivo*: implications for *in vitro* binding studies. *Dev Biol* 1998, **199**(2):291-308.

- Louis HA, Pino JD, Schmeichel K, Pomies P, Beckerle M:** Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem* 1997, **272**(43):27484-91.
- Luber K und Siess W:** Charakterisierung eines Proteinkinase A-Substrates und Untersuchung Stimulus-induzierter Tyrosinphosphorylierungen in Thrombozyten. *Doktorarbeit* 1994.
- Ludin B, Doll T, Meili R, Kaech S, Matus A:** Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins. *Gene* 1996, **173**:107-111.
- Machesky LM, Way M:** Actin branches out. *Nature* 1998, **394**:125-126.
- Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H:** Ultrastructure of the interaction between human platelets and polymerizing fibrin within the first minutes of clot formation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990, **1**(4-5):543-6.
- Mukai H, Toshimori M, Shibata H, Takanaga H, Kitagawa M, Miyahara M, Shimakawa M, Ono Y:** Interaction of PKN with α -actinin. *J Biol Chem* 1997, **272**(8):4740-6.
- Müller O:** Entwicklung eines Rheometers zur Untersuchung viskoelastischer Eigenschaften membranassoziierter Aktinnetzwerke im verdünnten und halbverdünnten Bereich. *Doktorarbeit*, Technische Universität München.
- Nakagawa N, Hoshijima M, Oyasu M, Saito N, Tanizawa K, Kuroda S:** ENH, containing PDZ and LIM domains, heart/skeletal muscle-specific protein, associates with cytoskeletal proteins through the PDZ domain. *Biochem Biophys Res Com* 2000, **272**:505-12.
- Nishiya N, Iwabuchi Y, Shibamura M, Cote JF, Tremblay ML, Nose K:** Hic-5, a paxillin homologue, binds to the protein-tyrosine phosphatase PEST (PTP-PEST) through its LIM3 domain. *J Biol Chem* 1999, **274**(14):9847-53.
- Nix DA, Beckerle MC:** Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J Cell Biol* 1997, **138**(5):1139-47.
- Nobes CD, Hall A:** Rho, rac, and cdc42 GTPases regulates the assembly of multimolecular focal complexes associated with stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995, **81**:53-62.
- Palecek SP, Loftus MH, Ginsberg DA, Lauffenburger AF:** Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 1997, **385**:537-40.
- Parast MM, Otey CA:** Characterisation of palladin, a novel protein localized to stress fibers and cell adhesions. *J Cell Biol* 2000, **150**(3):643-56.
- Passier R, Richardson JA, Olson EN:** Oracle, a novel PDZ-LIM domain protein expressed in heart and skeletal muscle. *Mech Dev* 2000, **92**(2):277-84.
- Pavalko FM, Otey CA, Simon KO, Burridge K:** Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem Soc Trans* 1991, **19**(4):1065-9.

- Pavalko FM, Burridge K:** Disruption of the actin cytoskeleton after microinjection of proteolytic fragments of α -actinin. *J Cell Biol* 1991, **114**(3):481-91.
- Pavalko FM, Walker DM, Graham L, Goheen M, Doerschuk CM, Kansas GS:** The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via α -actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with α -actinin. *J Cell Biol* 1995, **129**(4):1155-64.
- Pavalko FM, Schneider G, Burridge K, Lim SS:** Immunodetection of alpha-actinin in focal adhesions is limited by antibody inaccessibility. *Exp Cell Res* 1995b, **217**(2):534-40.
- Pawson AJ:** Protein modules in signal transduction. *Springer Verlag Berlin Heidelberg* 1998.
- Payraastre B, van Bergen en Henegouwen PM, Breton M, den Hartigh JC, Plantavid M, Verkleij AJ, Boonstra J:** Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: effect of epidermal growth factor. *J Cell Biol* 1991, **115**(1):121-8.
- Pomies P, Louis HA, Beckerle MC:** CRP1, a LIM domain protein implicated in muscle differentiation, interacts with α -actinin. *J Cell Biol* 1997, **139**(1):157-68.
- Pomies P, Macalma T, Beckerle MC:** Purification and characterisation of an α -actinin-binding PDZ-LIM protein that is up-regulated during muscle differentiation. *J Biol Chem* 1999, **274**(41):29242-50.
- Ponte E, Rivero F, Fehheimer M, Noegel A, Bozzaro S:** Severe developmental defects in Dictyostelium null mutants for actin-binding proteins. *Mech Dev* 2000, **91**(1-2):153-61.
- Priddle H, Hemmings L, Monkley S, Woods A, Patel B, Sutton D, Dunn GA, Zicha D, Critchley DR:** Disruption of the talin gene comprises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *J Cell Biol* 1998, **142**(4):1121-33.
- Ridley AJ, Hall A:** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992, **70**:389-99.
- Ridley AJ, Hall A:** Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO* 1994, **13**:2600-10.
- Sanger JW, Sanger JM, Jockusch BM:** Differences in stress fibers between fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 1983, **96**:961-69.
- Sattler M, Pisick E, Morrison PT, Salgia R:** Role of the cytoskeletal protein paxillin in oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 2000, **11**(1):63-76.
- Schafer DA, Welch MD, Machesky LM, Bridgman PC, Meyer SM, Cooper JA:** Visualisation and molecular analysis of actin assembly in living cells. *J Cell Biol* 1998, **143**(7):1919-30.
- Schmeichel KL, Beckerle MC:** The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* 1994, **79**(2):211-9.
- Schmeichel KL, Beckerle MC:** Molecular dissection of a LIM domain. *Mol Biol Cell* 1997, **8**:219-230.

- Schönwälder SM, Burridge K:** Bidirectional signalling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**:274-86.
- Shieh BH, Zhu MY:** Regulation of the TRP Ca^{2+} channel by INAD in drosophila photoreceptors. *Neuron* 1996, **16**(5):991-8.
- Siess W, Lapetina EG:** Prostacyclin inhibits platelet aggregation induced by phorbol ester or Ca^{2+} -ionophore at steps distal to activation of protein kinase C and Ca^{2+} -dependent protein kinases. *Biochem J* 1989, **258**:57-65.
- Siess W, Winegar DA, Lapetina EG:** Rap1B is phosphorylated by protein kinase A in intact human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, **170**:944-950.
- Siess W, Lapetina EG:** Functional relationship between cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and platelet inhibition. *Biochem J* 1990, **271**:815-9.
- Smolich B, Vo M, Buckley S, Plowman G, Papkoff J:** Cloning and biochemical characterization of LIMK-2, a protein kinase containing two LIM domains. *J Biochem (Tokyo)* 1997, **121**(2):382-8.
- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC:** Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 1997, **275**:73-7.
- Sumi T, Matsumoto K, Takai Y, Nakamura T:** Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J Cell Biol* 1999, **147**(7):1519-23.
- Tang Y, Tang J, Chen Z, Trost C, Flockerzi V, Li M, Ramesh V, Zhu MX:** Association of mammalian Trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ-domain-containing protein, NHERF. *J Biol Chem* 2000 *in press*.
- Tejedor FJ, et al.:** Essential role for dlg in synaptic clustering of Shaker K^+ channels in vivo. *J Neurosci* 1997, **17**:152-9.
- Tempel M:** Aktinbindende Proteine als Membran/Zytoskelett-Koppler und als Modulatoren der Viskoelastizität von Aktinnetzwerken. *Doktorarbeit*, Technische Universität München.
- Thurston G, Turner D:** Thrombin-induced increase of F-actin in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 1994, **47**(1):1-20.
- Tolias KF, Hartwig JH, Ishihara H, Shibasaki Y, Cantley LC, Carpenter CL:** Type I alpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* 2000, **10**(3):153-6.
- Toomre D, Keller J, White J, Olivo JC, Simons K:** Dual-color visualisation of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci* 1999, **112**:21-33.
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications: 1979. *Biotechnology* 1992, **24**:145-9.

- Toxbin H, Staehelin T, Gordon J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1979, **24**:145-9.
- Tsunoda S, Sierralta J, Sun Y, Bodner R, Suzuki E, Becker A, Socolch M, Zuker CS:** A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 1997, **388**:243-9.
- Turnacioglu K, Sanger JW, Sanger JM:** Sites of monomeric actin incorporation in living PTK2 and REF-52 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998, **40**:59-70.
- Vallenius T, Luukko K, Mäkelä TP:** CLP-36 PDZ-LIM protein associates with nonmuscle α -actinin-1 and α -actinin-4. *J Biol Chem* 2000, **275**(15):11100-5.
- Wang Y-L:** Reorganisation of actin filament bundles in living fibroblasts. *J Cell Biol*, 1984 **99**:1478-85.
- Wang H, Harrison-Shostak DC, Lemasters JJ, Herman B:** Cloning of rat cDNA encoding a novel LIM domain protein with high homology to rat RIL. *Gene* 1995, **165**(2):267-71.
- Way JC, Chalfie M:** *Mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* , **54**:5-16.
- Williams JM, Chen GC, Zhu L, Rest RF:** Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. *Mol Microbiol* 1998, **27**(1):171-86.
- Wong AJ, Pollard TD, Hermann IM:** Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells *in vivo*. *Science* 1983, **219**:867-9.
- Wu C:** Integrin-linked kinase and PINCH: partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *J Cell Sci* 1999, **112**:4485-9.
- Wu R-Y, Gill GN:** LIM domain recognition of a tyrosin-containing tight turn. *J Biol Chem* 1994, **269**(40):25085-90.
- Wu R, Durick K, Songyang Z, Cantley LC, Taylor SS, Gill GN:** Specificity of LIM domain interactions with receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996, **271**(27):15934-41.
- Wyszynski M, Lin J, Rao A, Nigh E, Beggs AH, Craig AM, Sheng M:** Competitive binding of α -actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 1997, **385**:439-42.
- Xia H, Winokur ST, Kuo W-L, Altherr MR, Brecht DS:** Actinin-associated LIM protein: identification of a domain interaction between PDZ and spectrin-like repeat motifs. *J Cell Biol* 1997, **139**(2):507-15.

Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kanagawa K, Nishida E, Mizuno K: Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganisation. *Nature* 1998, **393**:809-12.

Yang L, Guerrero J, Hong H, DeFranco DB, Stallcup MR: Interaction of the tau2 transcriptional activation domain of glucocorticoid receptor with a novel steroid receptor coactivator, Hic-5, which localizes to both focal adhesions and the nuclear matrix. *Mol Biol Cell* 2000, **11**(6):2007-18.

Young P, Ferguson C, Banuelos S, Gautel M: Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of α -actinin. *EMBO* 1998, **17**(6):1614-24.

Zamir E, Katz BZ, Aota S, Yamada KM, Geiger B, Kam Z: Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 1999, **112**:1655-69.

Zhou Q, Ruiz-Lozano P, Martone ME, Chen J: Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to α -actinin-2 and protein kinase C. *J Biol Chem* 1999, **274**(28):19807-13.

Danksagung

An dieser Stelle möchte Ich allen Kollegen und Kolleginnen danken, die durch Schaffung eines sehr angenehmen und äußerst hilfsbereiten Arbeitsklimas zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Wolfgang Siess für die Überlassung des interessanten Themas im Rahmen des Graduiertenkollegs „Vaskuläre Biologie“, für die stete Gesprächsbereitschaft und die gute Betreuung

Prof. Dr. P.C. Weber für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes

Prof. Dr. Angelika Vollmar für die Unterstützung dieser Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie

Dr. Marcus Otte für die experimentellen Beiträge zu diesem Thema und die vielen interessanten Anregungen und Hilfestellungen

Prof. Dr. Eberhard Morgenstern für die Anfertigung der elektronmikroskopischen Aufnahmen

Dr. Bernhard Hinner für die Durchführung der vielen rheologischen Messungen und die Einführung in die Visokoelastizitätslehre

Dr. Patrick Keller für die Ermöglichung der videomikroskopischen Aufnahmen

Dr. Klaus-Peter Janssen für die Bereitstellung des chromatographischen Materials

Prof. Dr. Kensaku Mizuno für die Durchführung der LIM-Kinase-Versuche

Marcus Bauer, Petros Arnaoutis und Andi Schröder für ihre Hilfe in computer-technischen Fragen

Carola Meister für ihre Freundschaft und die technische Unterstützung der Arbeit

Georg Ostermann, Christian Johannes und allen anderen, ohne die die Arbeit weniger Spaß gemacht hätte

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, sowie meinen Großeltern für ihre Anteilnahme und kritische Hinterfragung der Arbeit, und meinem Freund Christian dafür, daß er immer für mich da war.

CURRICULUM VITAE KRISTIN BAUER

05.02.1971 geboren in München

Schulbildung

1977-1981 Grundschule in Burghausen

1981-1990 Kurfürst-Maximilian-Gymnasium in Burghausen

Studium

WS 1990 Beginn des Studiums der Biologie an der Technischen Universität München

SS 1992 Diplomvorprüfung

SS 1994 Freie Mitarbeit am Projekt „Messung des Bioabbaus ^{14}C -markierter Herbizide zu $^{14}\text{CO}_2$ “ bei Dr. I. Scheunert, Institut für Bodenökologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GmbH, München

SS 1996 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Immunologie und Pharmakologie

Jan.1996- Nov.1997 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der TU München bei Prof. Dr. W. Staudenbauer

Thema: Reinigung und Kristallisation der Exo-1,4 β -Glucanase (Avicellase II) des thermophilen Organismus *Clostridium stercorarium*

10.3.1997 – 21.12.2000 Promotion an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilian-Universität München unter Betreuung von Prof. Dr. W. Siess, Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten

Thema: Zellbiologische Charakterisierung des aktinzytoskelett-assoziierten LIM- und PDZ-Domäne-Proteins CLP-36

21.12.2000 Promotionsprüfung