

---

**Biochemische und zellbiologische  
Charakterisierung der  
Podin-Proteinfamilie als  
Adapterproteine des Aktinzytoskeletts  
in Muskelzellen**

---

D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Anja Linnemann

aus

Halberstadt

Bonn, September 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dieter O. Fürst

2. Gutachter: Herr PD Dr. Gregor Kirfel

Tag der Promotion: 31.01.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2005 bis August 2010 in der Arbeitsgruppe molekulare Zellbiologie am Institut für Zellbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Anleitung von Prof. Dr. Dieter O. Fürst erstellt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln, persönlich, selbständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe.

Diese Arbeit hat bisher noch keiner anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegen.

Anja Linnemann

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab  
veröffentlicht:

### **Publikationen**

Linnemann, A.; van der Ven, P. F. M.; Vakeel, P.; Albinus, B.; Simonis, D.; Bendas, G.; Schenk, J. A.; Micheel, B.; Kley, R. A. and Fürst, D. O. (2010). The sarcomeric Z-disc component myopodin is a multiadapter protein that interacts with filamin and alpha-actinin.

*European Journal of Cell Biology* (2010), doi:10.1016/j.ejcb.2010.04.004

### **Konferenzbeiträge**

Anja Linnemann, Padmanabhan Vakeel, Ulrike Krüger, Burkhard Micheel, Lukas Heukamp, Peter F. M. van der Ven, Dieter O. Fürst (2007). Expression, isoform complexity and binding partners of the muscle actin-associated protein myopodin.

*Posterbeitrag zum Jahrestreffen des Bonner Forum Biomedizin*

Anja Linnemann, Britta Albinus, Burkhard Micheel, Peter F. M. van der Ven, Dieter O. Fürst (2008). Characterization of the family of podin proteins.

*Posterbeitrag zum Jahrestreffen des Bonner Forum Biomedizin*

Anja Linnemann, Sabine Gläsker, Sarah Rieck, Peter F. M. van der Ven, Dieter O. Fürst (2010). Characterization of the binding properties of the podin protein family members to filamin C and alpha-actinin.

*Posterbeitrag zum Jahrestreffen des Bonner Forum Biomedizin*

# Abstract

The formation of contractile myofibrils is a complex event that requires the ordered assembly of numerous proteins. Many still unknown protein-protein interactions contribute to this process. While searching for new proteins participating in the assembly of the Z-disc and its dynamic state, the proteins of the podin family were found as interesting candidates involved in these processes. Therefore the aim of this study was the detailed characterization of the podin protein family, consisting of synaptopodin, myopodin and tritopodin, in terms of their expression patterns, splice variants and binding partners.

The analysis of the gene structure and the resulting putative isoforms of myopodin and tritopodin revealed a much more complex situation than anticipated. The generation of antibodies against specific parts of myopodin and tritopodin allowed the study of the expression and subcellular localization of the individual isoforms in different cell types and tissues. The expression analysis on mRNA and protein levels indicated that the long myopodin isoform a is expressed in smooth muscle-containing tissues like prostate, whereas the short isoform e is mainly expressed in skeletal muscle tissue. By contrast, the expression of tritopodin seems to be restricted to cross striated muscle cells. Immunofluorescence studies showed for the first time, that all podin proteins are located at the adult sarcomeric Z-disc. While myopodin and tritopodin are expressed in the very early stages of myofibrillogenesis and myotube differentiation, where they colocalize with  $\alpha$ -actinin, synaptopodin is exclusively expressed in terminally differentiated skeletal muscle cells.

The high degree of sequence similarity between the three members of the podin family in defined regions suggests analog binding properties. Indeed, biochemical studies revealed that all podin proteins interact with the Ig-domains 20-21 of filamin C. Similar to the situation in synaptopodin interaction studies showed that  $\alpha$ -actinin binds also myopodin and tritopodin at multiple binding sites.

The previously demonstrated interaction between myopodin and F-actin is actually mediated by two independent actin binding sites, which are found in all myopodin isoforms. Furthermore this thesis demonstrates that myopodin is able to bundle actin filaments similar to  $\alpha$ -actinin. Interestingly the actin bundling activity is not only achieved by the presence of two F-actin binding sites, but also results from myopodin's ability to dimerise. In conclusion, all podin proteins show analog binding properties, indicating an at least partial functional complementarity of these proteins within the sarcomeric Z-disc. There is evidence that at least two members of the podin protein family, myopodin and tritopodin, are actively involved in myofibrillogenesis, by forming complexes with  $\alpha$ -actinin and filamin C during the initial stages of myofibril assembly. In contrast, synaptopodin appears to have exclusive functions in fully differentiated tissues.

# Kurzfassung

Die Ausbildung der kontraktilen Myofibrillen ist ein komplexer Vorgang, der die streng kontrollierten Interaktionen vieler Proteine bedarf. Auf der Suche nach Proteinen, die an diesen Prozessen beteiligt sind, stellte sich die Podin-Proteinfamilie als interessanter Kandidat heraus. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die biochemische und zellbiologische Charakterisierung dieser Proteinfamilie, bestehend aus Synaptopodin, Myopodin und Tritopodin, hinsichtlich ihrer Expressionsmuster, Spleißvarianten und Liganden.

Die Analyse putativer Isoformen des Myopodins und Tritopodins implizieren eine wesentlich größere Komplexität, als bislang angenommen. Mithilfe von RT-PCR Experimenten sowie spezifischer Antikörper konnte in glattem Muskelreichten Geweben die Expression der langen Myopodinisoform a und im Skelettmuskel die kurze Myopodinisoform e nachgewiesen werden. Die Expression von Tritopodin scheint hingegen auf die quergestreifte Muskulatur beschränkt zu sein. Immunhistochemische Färbungen zeigen erstmals die Lokalisation aller drei Podin-Proteine in der adulten sarkomerischen Z-Scheibe. Während Myopodin und Tritopodin bereits in sehr frühen Stadien der Skelettmuskeldifferenzierung exprimiert werden und bereits in Z-Scheibenvorläuferstrukturen mit  $\alpha$ -Aktinin kolokalisieren, konnte Synaptopodin ausschließlich in adulten Stadien detektiert werden.

Aufgrund der Homologie der Podin-Proteine untereinander, werden ähnliche Bindungsverhalten vermutet. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass alle Podin-Proteine mit den Ig-Domänen 20-21 des Filamin C interagieren. Für Synaptopodin war zudem bekannt, dass es mehrere unabhängige Bindungsstellen für  $\alpha$ -Aktinin besitzt. Ähnliche Bindungseigenschaften konnten hier für Myopodin und Tritopodin nachgewiesen werden. Auch wurde bereits die grundlegende Fähigkeit des Myopodins an F-Aktin zu binden, beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass Myopodin sogar zwei F-Aktinbindungsstellen besitzt, die in allen putativen Isoformen vorhanden sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass Myopodin, ähnlich wie  $\alpha$ -Aktinin, Aktin zu dicken Bündeln verknüpft. Die Aktinbündelungsaktivität ist dabei nicht nur auf die zwei vorhandenen Aktinbindungsstellen, sondern auch auf die hier erstmals gezeigte Dimerisierung des Myopodins, zurückzuführen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier erzielten Ergebnisse deutliche Hinweise auf eine Funktion der Podine als Multiadapterproteine der Z-Scheibe liefern, wobei die ähnlichen Bindungseigenschaften der einzelnen Podin-Proteine eine komplementäre Funktion implizieren. Weiterhin deutet die sehr frühe Expression von Myopodin und Tritopodin in der Skelettmuskeldifferenzierung darauf hin, dass diese Proteine eine wichtige Rolle in der initialen Myofibrillogenese spielen, wohingegen Synaptopodin ausschließlich im adulten Skelettmuskel vorhanden ist.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Zytoskelett . . . . .	1
1.1.1	Das Aktin-Zytoskelett-System . . . . .	2
1.1.1.1	Mikrofilamente . . . . .	3
1.1.1.2	Aktin-bindende Proteine . . . . .	4
1.2	Die Muskulatur . . . . .	5
1.2.1	Die quergestreifte Muskulatur . . . . .	5
1.2.1.1	Die Skelettmuskulatur . . . . .	6
1.2.1.2	Die Herzmuskulatur . . . . .	9
1.2.1.3	Muskelentwicklung und Myofibrillogenese . . . . .	9
1.2.1.4	Die Z-Scheibe und ihre Hauptakteure . . . . .	11
1.2.2	Die glatte Muskulatur . . . . .	15
1.2.3	Die Kontraktionsmechanismen im quergestreiften und glatten Muskel	16
1.3	Die Podin-Proteinfamilie . . . . .	17
1.3.1	Synaptopodin . . . . .	17
1.3.2	Myopodin . . . . .	19
1.3.3	Tritopodin . . . . .	21
1.4	Ausgangspunkt und Zielstellung . . . . .	22
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits . . . . .	25
2.2	Kulturmedien für Bakterien und Hefen . . . . .	25
2.3	Antibiotika . . . . .	26
2.4	Bakterien- und Hefestämme . . . . .	26

---

2.4.1	DNA-Klonierung . . . . .	26
2.4.2	Proteinexpression . . . . .	26
2.4.3	Hefe-Doppel-Hybridssystem . . . . .	26
2.5	Plasmide . . . . .	27
2.6	Antikörper . . . . .	28
2.7	Molekularbiologische Methoden . . . . .	29
2.7.1	RNA-Isolierung . . . . .	29
2.7.2	Reverse Transkription . . . . .	30
2.7.3	5'-RACE ( <i>Rapid Amplification of cDNA-Ends</i> ) . . . . .	30
2.7.4	Polymerasekettenreaktion . . . . .	31
2.7.5	Restriktionsverdau von DNA . . . . .	32
2.7.5.1	Analytischer Restriktionsverdau . . . . .	32
2.7.5.2	Präparativer Restriktionsverdau . . . . .	32
2.7.6	Agarosegelelektrophorese . . . . .	32
2.7.7	Ligation . . . . .	33
2.7.8	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.colis</i> . . . . .	33
2.7.8.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.colis</i> für Klonie- rungszwecke . . . . .	33
2.7.8.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.colis</i> für Expressions- zwecke . . . . .	34
2.7.8.3	Bestimmung der Kompetenz . . . . .	34
2.7.9	Transformation in <i>E.coli</i> . . . . .	34
2.7.10	Glycerolstocks . . . . .	35
2.7.11	DNA-Minipräparation . . . . .	35
2.7.12	Präparative DNA-Isolierung . . . . .	36
2.7.13	Spektrale Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA . . . . .	36
2.8	Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente . . . . .	37
2.8.1	Transformation in L40 . . . . .	38
2.8.1.1	Prätransformation . . . . .	38
2.8.1.2	Cotransformation gezielter Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente	38
2.8.2	Selektion auf Aminosäuremangelmedien . . . . .	39
2.8.3	Test auf Interaktion . . . . .	39



---

2.8.3.1	Test auf Histidinauxotrophie . . . . .	39
2.8.3.2	Nachweis der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität . . . . .	39
2.9	Biochemische Methoden . . . . .	40
2.9.1	Proteinexpression in Bakterien . . . . .	40
2.9.1.1	Mini-Expressionsanalyse . . . . .	40
2.9.1.2	Proteinexpression im größeren Maßstab . . . . .	40
2.9.2	Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien . . . . .	41
2.9.2.1	Aufreinigung unter Verwendung des His6-Tags . . . . .	41
2.9.2.2	Aufreinigung unter Verwendung des GST-Tags . . . . .	42
2.9.3	Herstellung von Zell- und Gewebeextrakten . . . . .	42
2.9.3.1	SDS-Totalextrakte . . . . .	42
2.9.4	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	43
2.9.5	Gelelektrophorese: SDS-PAGE nach Laemmli . . . . .	43
2.9.6	Proteintransfer . . . . .	44
2.9.6.1	Semidry-Methode . . . . .	44
2.9.6.2	Tankblot-Methode . . . . .	44
2.9.7	Immundetektion . . . . .	44
2.9.8	Western Blot-Overlay-Experimente . . . . .	45
2.9.9	Dotblot-Overlay-Experimente . . . . .	45
2.9.10	Coimmunpräzipitation . . . . .	46
2.9.11	<i>in vitro</i> Phosphorylierungen . . . . .	46
2.9.12	Surface Acoustic Wave (SAW) Messungen . . . . .	47
2.9.12.1	Geräte und Versuchsaufbau . . . . .	47
2.9.12.2	Immobilisierung von Proteinen am Biosensor . . . . .	48
2.9.12.3	Messung der Bindungsstärke . . . . .	48
2.9.12.4	Auswertung der SAW-Messungen . . . . .	49
2.9.13	Aktinbindungassays . . . . .	51
2.9.14	G-Aktin-Präparation . . . . .	51
2.9.15	Aktin <i>high speed Cosedimentationsassays</i> . . . . .	52
2.9.16	Aktin <i>low speed Cosedimentationsassays</i> . . . . .	53
2.10	Zellbiologie und Mikroskopie . . . . .	54
2.10.1	Zellkultur . . . . .	54

---

2.10.2	Kultivierung von Hskm- und C2/C2C12-Zellen . . . . .	55
2.10.3	Transiente Transfektionen . . . . .	55
2.10.4	Paraformaldehyd-Fixierung von Zellen . . . . .	56
2.10.5	Methanol-Aceton-Fixierung von Zellen . . . . .	56
2.10.6	Gefrierschnitte von Geweben . . . . .	56
2.10.7	Methanol-Aceton-Fixierung von Gefrierschnitten . . . . .	56
2.10.8	Indirekte Immunfluoreszenz . . . . .	57
2.10.8.1	Indirekte Immunfluoreszenz von Zellen . . . . .	57
2.10.8.2	Indirekte Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten . . . . .	57
2.10.9	Mikroskopische Auswertung . . . . .	58
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
3.1	Die genomische Struktur der Podine und daraus resultierende Isoformen . .	60
3.1.1	Alternative Spleißvorgänge und zwei Transkriptionsstarts resultieren in sechs putative Myopodinisoformen . . . . .	60
3.1.1.1	Expressionsanalyse humaner Myopodinvarianten auf mRNA-Ebene . . . . .	62
3.1.1.2	Bestätigung der Expression der kurzen Myopodinisoformen in Hskm-Zellen auf mRNA-Ebene . . . . .	65
3.1.2	Die Isoformen des Myopodins zeigen teils gewebespezifische Expression . . . . .	67
3.1.2.1	Herstellung spezifischer Antikörper gegen Myopodin . . .	67
3.1.2.2	Expressionsanalyse humaner Myopodinvarianten auf Proteinebene . . . . .	68
3.1.2.3	Expressionsanalyse muriner Myopodinisoformen auf Proteinebene . . . . .	72
3.1.2.4	Expressionsanalyse von Myopodinisoformen in Rattengeweben . . . . .	75
3.1.3	Alternatives Spleißen und zwei Transkriptionsstarts resultieren in mehrere putative Tritopodinisoformen . . . . .	77
3.1.3.1	Expressionsanalyse muriner Tritopodinvarianten auf mRNA-Ebene . . . . .	79

---

3.1.4	Tritopodin ist auf Proteinebene nur in quergestreiften Muskeln nachweisbar . . . . .	81
3.1.4.1	Herstellung spezifischer Antikörper gegen Tritopodin . . .	81
3.1.4.2	Expressionsanalyse humaner und muriner Tritopodinisoformen auf Proteinebene . . . . .	82
3.2	Die Podine während der Muskeldifferenzierung . . . . .	83
3.2.1	Myopodin wird bereits in frühen Differenzierungsstadien exprimiert	83
3.2.1.1	Expressionsanalyse der Myopodinvarianten auf mRNA-Ebene . . . . .	83
3.2.1.2	Expressionsanalyse der Myopodinisoformen auf Proteinebene . . . . .	85
3.2.1.3	Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in differenzierenden Skelettmuskelzellen . . . . .	86
3.2.2	Tritopodin wird ebenfalls in frühen Differenzierungsstadien exprimiert	96
3.2.2.1	Analyse der Tritopodinvarianten auf mRNA-Ebene . . . .	96
3.2.2.2	Analyse der Tritopodinvarianten auf Proteinebene . . . . .	98
3.2.2.3	Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin in differenzierenden Skelettmuskelzellen . . . . .	100
3.2.3	Alle Podin-Proteine werden in adulten Muskelgeweben exprimiert .	107
3.2.3.1	Alle drei Podin-Proteine zeigen Lokalisation in der Z-Scheibe	107
3.2.3.2	Myopodin wird in der Prostata ausschließlich in Glattmuskelzellen exprimiert . . . . .	114
3.3	Die Podine sind Multiadapterproteine der Z-Scheibe . . . . .	119
3.3.1	Myopodin interagiert mit Filamin C . . . . .	119
3.3.1.1	Hefe-Zwei-Hybrid-Studien zur Einengung der Bindungsregion im Filamin C . . . . .	119
3.3.1.2	Biochemische Studien zur Eingrenzung der Bindungsregion im Filamin C . . . . .	119
3.3.1.3	Bestimmung der Bindungsstärke von Myopodin und Filamin C mittels SAW . . . . .	121
3.3.1.4	Die Bindung von Myopodin an Filamin A kann nicht durch Coimmunpräzipitationen nachgewiesen werden . . . . .	123

---

3.3.1.5	Die Bindung von Myopodin an Filamin wird durch eine bei den Podinen stark homologe Region vermittelt . . . . .	124
3.3.2	Tritopodin und Synaptopodin interagieren ebenfalls mit Filamin C	126
3.3.3	Myopodin besitzt mehrere unabhängige $\alpha$ -Aktinin Bindungsstellen .	129
3.3.3.1	Bestimmung der Bindungsstärke von Myopodin und $\alpha$ -Aktinin mittels SAW . . . . .	131
3.3.3.2	Charakterisierung der Myopodin- $\alpha$ -Aktinin2-Interaktion .	132
3.3.4	Tritopodin besitzt ebenfalls mehrere unabhängige $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstellen . . . . .	134
3.3.5	Bestätigung der Funktionalität der Bindungsregionen der Podine durch transiente Transfektionen . . . . .	136
3.3.5.1	Bestätigung der Funktionalität der Bindungsregionen des Myopodins durch transiente Transfektionen . . . . .	136
3.3.5.2	Bestätigung der Funktionalität der Bindungsregionen des Synaptopodins und Tritopodins durch transiente Transfektionen . . . . .	139
3.3.6	Myopodin wird <i>in vitro</i> phosphoryliert . . . . .	142
3.4	Myopodin ist ein F-Aktin-bindendes Protein . . . . .	143
3.4.1	Myopodin besitzt zwei voneinander unabhängige F-Aktinbindungsstellen . . . . .	143
3.4.2	Myopodin ist ein Aktin-bündelndes Protein . . . . .	152
3.4.2.1	Nachweis der Aktinquervernetzung mit Hilfe von Aktin <i>low speed Cosedimentationen</i> . . . . .	152
3.4.2.2	Nachweis der Aktinbündelung mittels Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	159
3.4.3	Myopodin bildet <i>in vitro</i> Dimere . . . . .	161
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>164</b>
4.1	Die Podin-Proteinfamilie und ihre Isoformen . . . . .	164
4.1.1	Myopodinisformen . . . . .	164
4.1.2	Tritopodinisformen . . . . .	168
4.2	Die Podin-Proteinfamilie und ihre Lokalisation in unterschiedlichen Muskelgeweben . . . . .	171

---

4.2.1	Die Podin-Proteine in adulten Muskelgeweben . . . . .	171
4.2.2	Die Podin-Proteinfamilie während der Muskeldifferenzierung . . . . .	172
4.2.2.1	Myopodin während der Muskeldifferenzierung . . . . .	173
4.2.2.2	Tritopodin während der Muskeldifferenzierung . . . . .	174
4.3	Die Podin-Proteinfamilie und ihre Interaktionspartner . . . . .	176
4.3.1	Die Podin-Proteinfamilie und Filamin C . . . . .	176
4.3.2	Die Podin-Proteinfamilie und $\alpha$ -Aktinin . . . . .	179
4.3.3	Myopodin und F-Aktin . . . . .	181
4.3.4	Die Podine sind Multiadapterproteine der Z-Scheibe . . . . .	182
4.4	Ausblick . . . . .	184
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>187</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>A</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XIV</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XV</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XX</b>
<b>B</b>	<b>Ergänzende Abbildungen</b>	<b>XXI</b>
<b>C</b>	<b>Primer-, Nuklein- und Aminosäuresequenzen</b>	<b>XXV</b>
<b>D</b>	<b>Vektorkarten</b>	<b>XXXII</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Willkürliche Bewegungen, Herzschlag sowie die Atmungsbewegung und die Motilität des Verdauungstraktes - all diese Vorgänge sind für höhere Organismen lebenswichtig und basieren auf spezialisiertem kontraktilen Gewebe - der Muskulatur. Im Verlauf der Evolution haben sich verschiedene Muskeltypen entwickelt, die sich an ihre Aufgaben im Organismus perfekt angepasst haben. Aufgrund morphologischer und funktioneller Unterschiede werden Muskeln in zwei Hauptgruppen unterteilt: die glatte Muskulatur und die quergestreifte, welche wiederum in die Skelett- und die Herzmuskulatur, unterteilt werden kann. Unabhängig vom Muskeltyp basiert die Bewegung stets auf kontraktilen Strukturen, die aus Bestandteilen des Zytoskeletts zusammengesetzt sind.

### 1.1 Das Zytoskelett

Alle eukaryontischen Zellen verfügen über ein Zytoskelett, das für die Gestalt und Bewegung der Zellen sowie für Transportvorgänge innerhalb der Zellen verantwortlich ist. Diese Funktionen werden von den verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts gewährleistet. Das Zytoskelett umfasst drei Filamentsysteme: die Mikrotubuli, die Intermediärfilamente sowie die Mikrofilamente.

**Mikrotubuli** sind unverzweigte Röhren mit einem Durchmesser von etwa 25 nm, die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin aufgebaut sind. Die Tubuline sind globuläre, etwa 55 kDa große Proteine, die GTP binden können. Die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin gebildeten Heterodimere

assemblieren zu linearen Protofilamenten, von denen 13 zur Wand des Mikrotubulus zusammentreten, welcher eine strukturelle und kinetische Polarität aufweist. Am Plusende überwiegt die Polymerisation, am Minusende die Depolymerisation, was eine dynamische Instabilität der Mikrotubuli zur Folge hat, die eine flexible Anpassung an die Bedürfnisse der Zelle erlaubt. Die Mikrotubuli sind terminal mit dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (*microtubule organizing center*, MTOC) verbunden, das Zellkern-nah situiert ist. Wichtige Aufgaben der Mikrotubuli sind der intrazelluläre Transport von Vesikeln und Zellorganellen, die Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose sowie die mitotische Chromosomenbewegung und der Aufbau des Axonems in Cilien und Geißeln. Zur Triebkraftherzeugung bedienen sich die Mikrotubuli der Hilfe von Motorproteinen, der Kinesine und Dyneine.

Die **Intermediärfilamente** sind strukturell unpolare, seilartige Filamente mit einem Durchmesser von etwa 10 nm, die vor allem der mechanischen Festigkeit der Zellen dienen. Diese Filamente werden aus verschiedenen mitunter gewebespezifisch exprimierten Proteinen gebildet. Intermediärfilamente durchziehen nicht nur das Zytosol, sondern man findet sie auch im Zellkern (Lamine). Obwohl die Intermediärfilament-Proteine eine große heterologe Familie bilden, ist der grundsätzliche Aufbau der Intermediärfilamente gleich. Ein Monomer besitzt an beiden Enden globuläre Domänen, zentral gelegen ist eine helikale Region, die zur Dimerisierung befähigt ist. Zwei Monomere können sich so parallel aneinander lagern. Diese Dimere lagern sich wiederum antiparallel und leicht versetzt zu Tetrameren zusammen, wodurch eine strukturelle Unpolarität der Intermediärfilamente erreicht wird. Die versetzte Anordnung der Tetramere ermöglicht das Hintereinanderschalten vieler Tetramere. Der Querschnitt durch ein Intermediärfilament zeigt ein Tetramer in der Mitte und sieben weitere darum gewickelt.

### 1.1.1 Das Aktin-Zytoskelett-System

Das dritte Filamentsystems der Zelle ist das Aktinzytoskelett bzw. das Mikrofilament-system, welches eine essentielle und vor allem eine vielfältige Rolle in eukaryontischen Zellen spielt. Die Diversität der Aufgaben des Aktinzytoskeletts reicht von der Bildung stabilisierender Strukturen wie den Mikrovilli des Darmepithels, über die Ausbildung des

dynamischen Geflechts im Leitsaum einer migrierenden Zelle bis hin zur Formation der kraftherzeugenden Strukturen in Muskeln. Die Grundstruktur der Mikrofilamente ist dabei, wie unter 1.1.1.1 beschrieben, stets dieselbe, da die Anpassung an die unterschiedlichen Aufgaben in der Zelle durch Aktin-bindende Proteine erreicht wird (1.1.1.2).

### 1.1.1.1 Mikrofilamente

Mikrofilamente sind helikale Polymere aus dem Protein Aktin, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Fäden von etwa 8 nm Dicke erscheinen. Die Helix besteht aus gleich orientierten Aktin-Molekülen, die auch als G-Aktin (globuläres Aktin) bezeichnet werden. G-Aktin besitzt eine molekulare Masse von 42 kDa, wird in allen eukaryontischen Zellen exprimiert und gilt als eines der konserviertesten Proteine. Im Menschen gibt es 6 verschiedene Aktinisoformen, jede kodiert von individuellen Genen, welche untereinander aber hohe Homologie aufweisen (Vandekerckhove und Weber, 1978). Das G-Aktinmolekül (Abb. 1.1 A) unterteilt sich in vier Domänen, wobei Domäne 1 und 3 den „Schwanz“ bilden und die Domänen 2 und 4 den „Kopf“. Ein Spalt zwischen Domäne 2 und 4 bindet und hydrolysiert ATP (Otterbein *et al.*, 2001). Die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin (filamentöses Aktin), schematisch dargestellt in Abbildung 1.1 B, beginnt mit der Bildung eines Trimerstadiums (Nukleation), an dem sich weitere G-Aktin-Moleküle anlagern können. Hierbei lagert sich die Kopfdomäne des Monomers an die Schwanzdomäne des Aktinfilaments (Wegner, 1976). Dadurch entsteht eine strukturelle Polarität der Filamente, die sich auch in der unterschiedlichen Dynamik der Filamentenden widerspiegelt. Die Polymerisation erfolgt primär am sogenannten Plus- oder *barbed*-Ende eines Filaments, was im Aktinmonomer dem „Schwanz“ entspricht. Am Minus- oder *pointed*-Ende erfolgt dagegen vor allem Depolymerisation. Dieses Verhalten wird als Tretmühlmechanismus (*treadmilling*) bezeichnet (Neuhaus *et al.*, 1983; Wanger *et al.*, 1985).

Die Aktinpolymerisation findet *in vitro* spontan in Gegenwart von ATP, sowie ein- bzw. zweiwertigen Ionen ( $K^+$  sowie  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$ ) statt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wie in Abbildung 1.1 C verdeutlicht, die Nukleation. Kurz nach der Polymerisation wird das am Aktin-Molekül gebundene ATP zu ADP hydrolysiert. Dies hat eine Konformationsänderung des Moleküls zur Folge, wodurch die Stabilität des Filaments



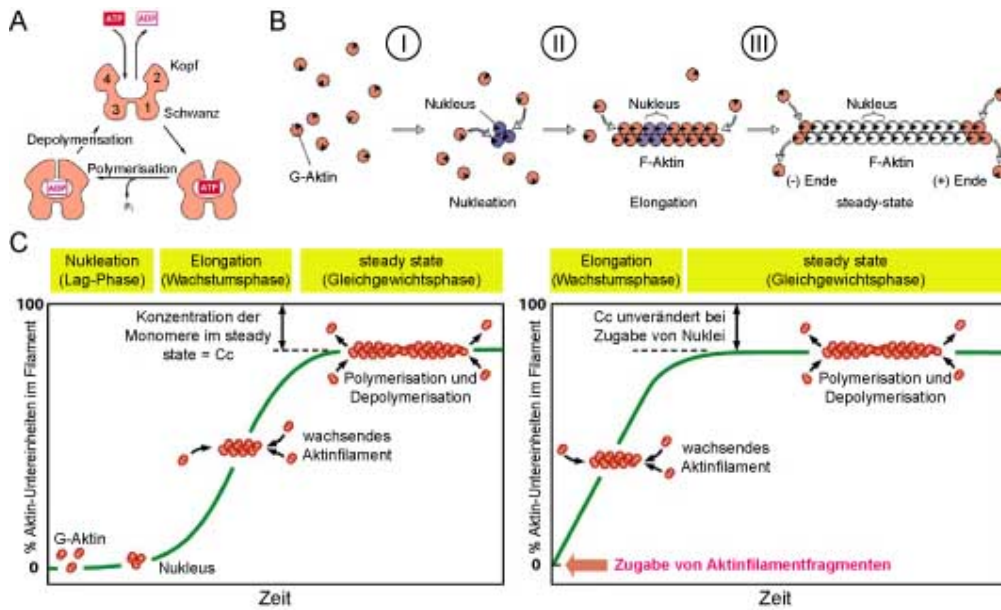


Abbildung 1.1: **Aktinfilamente entstehen durch Polymerisation** A: Schematische Darstellung eines Aktinmonomers mit Nukleotidbindungsstelle und den Domänen 1 bis 4. Domäne 1 und 3 bilden den „Schwanz“ während Domäne 2 und 4 den „Kopf“ des G-Aktins bilden. B: Die Phasen der Aktinpolymerisation *in vitro*. Phase I: Nukleation, Phase II: Elongation, Phase III: Gleichgewichtszustand (*steady state*) C: Der Zeitverlauf einer *in vitro* Polymerisationsreaktion (linke Kurve) mit der initialen Verzögerungsphase („Lag-Phase“) verursacht durch die langsame Bildung der Nuklei. Werden Nukleationskeime (F-Aktin-Fragmente) zugesetzt, startet der Elongationsprozeß direkt (rechte Kurve). (A) und (C) modifiziert nach Alberts *et al.* (2007), (B) modifiziert nach Lodish *et al.* (1999).

geschwächt und die Depolymerisation gefördert wird. Dieses dynamische Auf- und Abbau von Filamenten ist von essentieller Bedeutung für die Zelle und wird reguliert durch Aktin-bindende Proteine.

### 1.1.1.2 Aktin-bindende Proteine

In Zellen wird die Anpassung an die mannigfaltigen Aufgaben der Mikrofilamente über den dynamischen Auf- und Abbau der Filamente, sowie die Organisation in funktionelle Strukturen (z. B. kontraktile Bündel) von Aktin-bindenden Proteinen (*actin binding proteins*, ABPs) bestimmt (Ayscough, 1998). Bis heute sind eine Vielzahl solcher Aktin-bindender Proteine bekannt, die häufig nach ihrer Funktion oder ihrer Aktinbindungseigenschaften in Klassen eingeteilt werden (Pollard, 1999; dos Remedios *et al.*, 2003; Winder und Ayscough, 2005). Trotz ähnlicher Aktinbindungseigenschaften können die Funktionen der Proteine in der Zelle sehr unterschiedlich sein. So binden sowohl Thymosin als auch Profilin globuläres Aktin, Thymosin verhindert durch die Bindung aber die Polymerisation,

während Profilin durch die Katalyse des Nukleotidaustausches die Polymerisation fördert. Tabelle 1.1 gibt beispielhaft einige der ABPs, hier eingeteilt in acht funktionelle Klassen, wieder.

Tabelle 1.1: Übersicht zu verschiedenen Klassen von Aktin-bindenden Proteinen, sowie deren Funktionen

<b>Eigenschaft</b>	<b>allgemeine Funktion</b>	<b>Beispiele</b>	<b>Referenz</b>
Monomer bindend	Verhindern durch die Bindung des G-Aktins die Polymerisation; Katalyse des Nukleotid-austauschs	Thymosin Profilin	zusammengefasst in Pollard und Borisy (2003) sowie in Dominguez (2009)
polymerisierend	Beschleunigen den Aufbau von F-Aktin	Formine	Chesarone <i>et al.</i> (2010)
depolymerisierend	Beschleunigen den Abbau von F-Aktin	ADF/Cofilin	Paavilainen <i>et al.</i> (2004)
terminal bindend	am Minus-Ende: Verhinderung der Depolymerisation am Plus-Ende: Blockierung der Polymerisation	Tropomodulin CapZ	Kostyukova (2008) Casella und Torres (1994)
Filament schneidend	Zerschneiden das Filament in kürzere Fragmente	Gelsolin	Burtnick <i>et al.</i> (2004)
quervernetzend	Entstehung von Aktinbündeln und dreidimensionalen Netzwerken	$\alpha$ -Aktinin Filamin	Sjöblom <i>et al.</i> (2008) Tseng <i>et al.</i> (2004)
seitlich bindend	Stabilisierung des F-Aktins Längenregulation	Tropomyosin Nebulin	Hitchcock-DeGregori (2008) Littlefield und Fowler (2008)
Motoren	bewegen sich entlang der Filamente zum Transport oder zur Krafterzeugung	Myosin	Sellers (2000)

## 1.2 Die Muskulatur

### 1.2.1 Die quergestreifte Muskulatur

Im polarisierten Licht erscheint die quergestreifte Muskulatur als eine alternierende Folge heller, anisotroper (doppelbrechender) und dunkler, isotroper (gleichbrechender) Streifen. Diese Beobachtung führte zu den Bezeichnungen A-Bande (anisotrop) und I-Bande (isotrop).

Im Elektronenmikroskop entsprechen die anisotropen Bereiche den elektronendichteren und erscheinen somit dunkel, die isotropen Bereiche erscheinen als helle Banden, weil sie eher elektronendurchlässig sind. Diese namensgebende, charakteristische Querstreifung der Skelett- und Herzmuskelzellen unterscheidet sie von der glatten Muskulatur. Bei

genauerer Betrachtung einer elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Skelettmuskels, zeigen sich neben den schon erwähnten A- und I-Banden noch detailliertere Strukturen. So erkennt man in der Mitte der hellen I-Bande einen dunklen, sehr elektronendichten Streifen, der als Z-Scheibe bezeichnet wird. In der Mitte der A-Bande befindet sich eine helle Zone, welche H-Bande genannt wird und in deren Zentrum sich die elektronendichte M-Bande befindet. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnittes einer Skelettmuskelzelle ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Diese Querstreifung geht auf die hochregelmäßige Anordnung bestimmter Strukturen in den Myofibrillen zurück, die im Folgenden näher beschrieben wird.

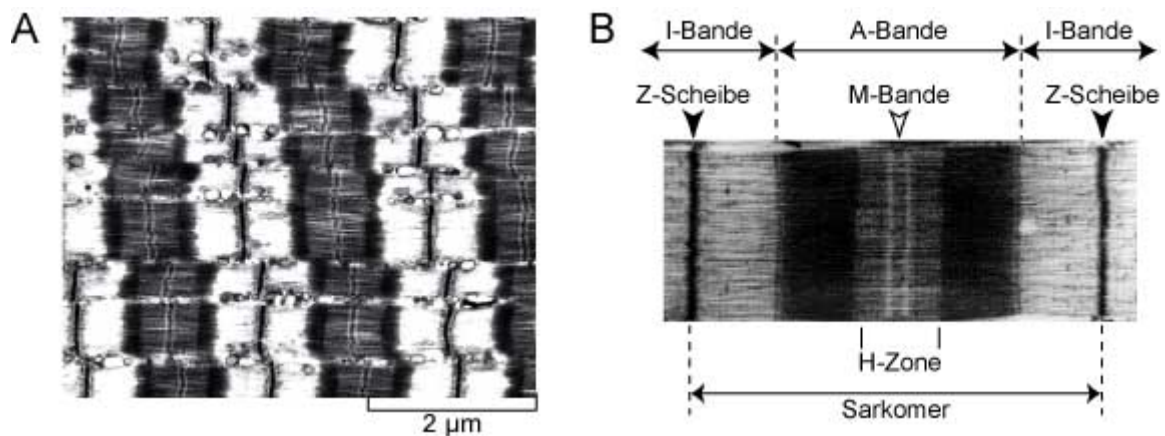


Abbildung 1.2: **Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Skelettmuskels.** A: Längsschnitt einer Skelettmuskelzelle. Die alternierende Folge heller und dunkler Bereiche war namensgebend für die querstreifte Muskulatur. B: Vergrößerung eines Sarkomers, der grundlegenden sich wiederholenden Einheit einer Myofibrille. Charakteristische Bereiche, wie z. B. die Z-Scheibe oder die M-Bande sind genau gekennzeichnet. (A modifiziert nach Alberts *et al.* (2007), B modifiziert nach Prof. D. O. Fürst).

### 1.2.1.1 Die Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur dient der willkürlichen, aktiven Bewegung. Sie besteht aus parallel, in Bündeln angeordneten Zellen, den Muskelfasern, welche von Bindegewebe (Faszien) umgeben sind. Die Muskelfasern können beim Menschen eine Länge von bis zu 50 cm erreichen. Diese polynukleären, zylindrischen Zellen entstehen während der Embryonalentwicklung durch Fusion aus vielen Vorläuferzellen, den sogenannten Myoblasten. Die durch die Fusion entstandenen vielkernigen Myotuben (Synzytien) differenzieren schließlich zu kontraktile Muskelfasern, in denen die Kerne in der Zellperipherie unterhalb der

Plasmamembran zu finden sind. Skelettmuskelzellen sind über myotendinöse Übergänge (*myotendinous junctions, MTJ*) mit Sehnen und durch diese indirekt mit Knochen verbunden, wodurch die Entwicklung von Zugkräften ermöglicht wird (Berthier und Blaineau, 1997). Die Muskelfasern (Abb. 1.3) enthalten viele parallel angeordnete Strukturelemente,

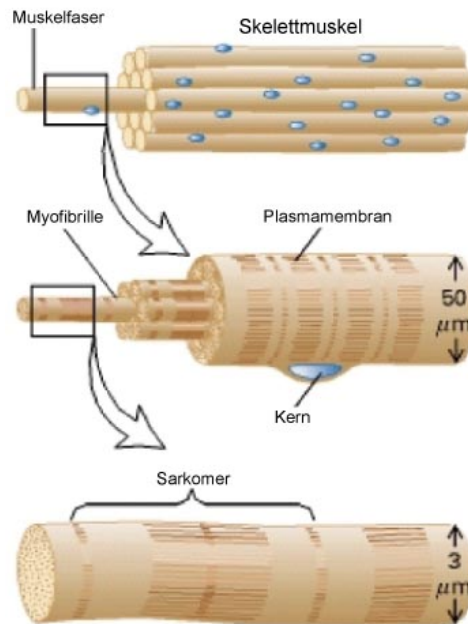


Abbildung 1.3: **Schematische Darstellung eines Skelettmuskels.** Skelettmuskeln bestehen aus Bündeln von Muskelfasern, bzw. polynukleären Muskelzellen. Jede Muskelfaser beinhaltet eine Vielzahl von Myofibrillen, die sich über die gesamte Länge der Muskelzelle erstrecken. Die Myofibrillen bestehen aus dünnen Aktin- und dicken Myosinfilamenten in einer hochorganisierten Anordnung, deren kleinste funktionelle Einheit das Sarkomer ist. Abbildung modifiziert nach Lodish *et al.* (1999).

die Myofibrillen. Diese kontraktile Elemente besitzen eine regelmäßige Anordnung von sogenannten dünnen und dicken Filamenten. Die kleinste sich wiederholende Einheit der Myofibrillen ist das Sarkomer, dessen schematischer Aufbau in Abbildung 1.4 skizziert ist. Ein Sarkomer wird seitlich von zwei Z-Scheiben begrenzt und stellt somit die kleinste kontraktile Einheit des Muskels dar (Clark *et al.*, 2002). Das dünne Filamentsystem, das von Aktin und assoziierten Proteinen gebildet wird, ist in den Z-Scheiben verankert. Weitere Proteine der Z-Scheiben sind u. a. die ABPs Filamin und  $\alpha$ -Aktinin, auf die unter Abschnitt 1.2.1.4 näher eingegangen wird. Die dünnen Aktinfilamente und damit assoziierte Proteine erstrecken sich über die gesamte I-Bande. Das von dem Motorprotein Myosin und assoziierten Proteinen gebildete System dicker Filamente ist in der M-Bande verankert,

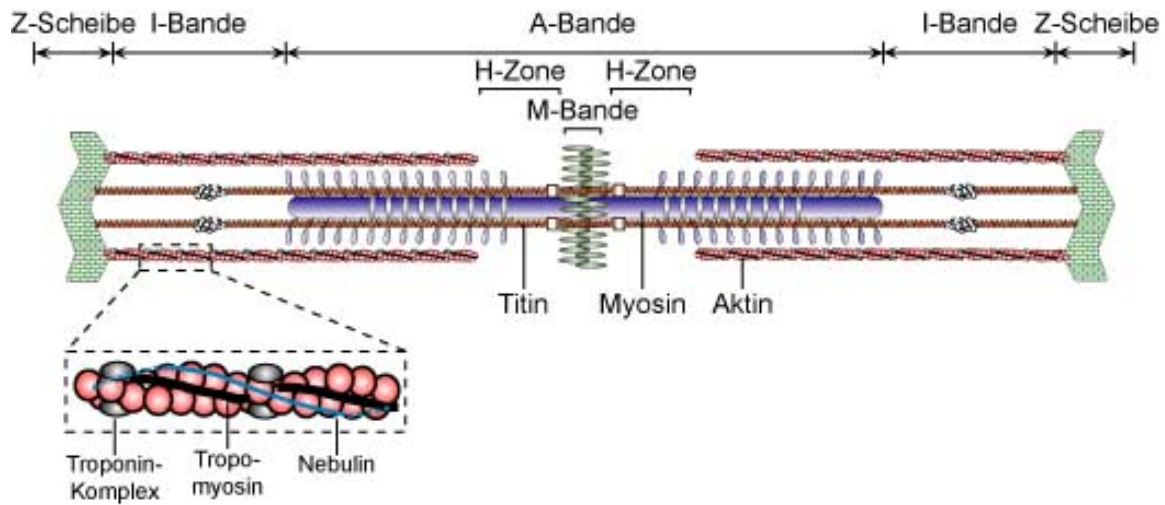


Abbildung 1.4: **Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus des Sarkomers.** Die Sarkomere bestehen im Wesentlichen aus parallel angeordneten dünnen Aktinfilamenten, verankert in den Z-Scheiben, sowie den dicken Myosinfilamenten, welche in der M-Bande verankert sind. Zusätzlich dargestellt ist Titin, welches sich von der Z-Scheibe bis zur M-Bande erstreckt. Der Ausschnitt unten links zeigt das F-Aktin assoziiert mit dem Troponinkomplex, Tropolomyosin und Nebulin. (Abbildung modifiziert nach Prof. D. O. Fürst)

die sich in der Mitte des Sarkomers befindet. Von der M-Bande ausgehend sind die dicken Myosinfilamente spiegelsymmetrisch aufgebaut und erstrecken sich über die gesamte A-Bande. Der Bereich, in dem die dünnen und dicken Filamente überlagern, erscheint im Elektronenmikroskop als dunkler Bereich. Der Bereich der H-Zone wird lediglich von den dicken Filamenten durchzogen und ist abhängig vom Kontraktionszustand unterschiedlich groß. Durch die Aneinanderreihung vieler Sarkomere entsteht die typische Querstreifung der Skelett- bzw. Herzmuskelzellen. Ein drittes Filamentsystem des Muskels, dessen Hauptkomponente Titin darstellt, gewährleistet die elastische Verknüpfung von Z-Scheibe und M-Bande (Wang *et al.*, 1979, 1991). Titin zuerst von Maruyama *et al.* (1977) beschrieben als Connectin, ist mit 3 MDa das bislang größte beschriebene Protein. Es besteht, abhängig von der Isoform, aus bis zu 112 immunglobulin- und 132 fibronectinähnlichen Domänen. Aminoterminal ist das Titin in der Z-Scheibe verankert und erstreckt sich von dort bis zur M-Bande (Fürst *et al.*, 1988). Titin ist ein multifunktionelles Protein, welches mehrere Bindungsstellen für Struktur- und Signalproteine sowie C-terminal eine Kinase Domäne besitzt (Tskhovrebova und Trinick, 2003).

### 1.2.1.2 Die Herzmuskulatur

Das Herz, ein muskuläres Hohlorgan, gewährleistet mit ständigen rhythmischen Kontraktionen die Durchblutung aller anderen Organe und Gewebe. Es wird durch die Herzscheidewand in eine rechte und linke Herzhälfte unterteilt, welche jeweils aus einer Kammer (Ventrikel) und einem Vorhof (Atrium) bestehen. Die Herzklappen zwischen Vorhof und Herzkammer, und die Herzklappen der großen Arterien sorgen dafür, dass das Blut in die richtige Richtung fließt. Der Herzmuskel hat mit der Skelettmuskulatur viele Merkmale gemeinsam, unterscheidet sich aber auch in wesentlichen Punkten. Herzmuskelzellen (Cardiomyozyten) fusionieren im Gegensatz zu Skelettmuskelzellen während der Embryonalentwicklung nicht und besitzen in der Regel nur einen Zellkern. Um dennoch koordiniert kontrahieren zu können sind die Cardiomyozyten über besondere Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden, den sogenannten Glanzstreifen oder *intercalated disks*. Diese enthalten u. a. Desmosomen und *gap junctions*, welche die Zellen mechanisch bzw. elektrisch miteinander verbinden, so dass eine verzögerungsfreie Erregungsausbreitung gewährleistet ist. Deshalb wird der Herzmuskel auch als ein funktionelles Synzytium bezeichnet. Zudem befinden sich in den Glanzstreifen Adhärenzverbindungen, aufgebaut aus Cadherinen bzw. Integrinen, die intrazellulär Verbindungen zum Aktinzytoskelett aufbauen (Yamaguchi *et al.*, 1988; Perriard *et al.*, 2003). Der Kontraktionsmechanismus des Herzmuskels entspricht grundsätzlich dem des Skelettmuskels.

### 1.2.1.3 Muskelentwicklung und Myofibrillogenese

Skelettmuskelzellen sind durch Fusion entstandene multinukleäre Zellen. Während der Myogenese entziehen sich Myoblasten dem Zellzyklus und initiieren die Expression muskelspezifischer Gene (Wakelam, 1985; Lassar *et al.*, 1994). Die dadurch eingeleitete Fusion der Myoblasten bewirkt zunächst die Entstehung junger Myotuben (*nascent myotubes*), die durch weitere Reifung terminal differenzierte Myotuben (*mature myotubes*) bilden (Wakelam, 1985; Sanger *et al.*, 2002). Während dieses Prozesses finden stetig weitere Fusionen sowie die Expression spezifischer Proteine statt (Horsley und Pavlath, 2004). Neben der äußeren Morphologie verändert sich auch die Organisation des Zytoskeletts hin zur Entstehung der hochgeordneten, zur Kontraktion befähigten Sarkomerstruktur, was als

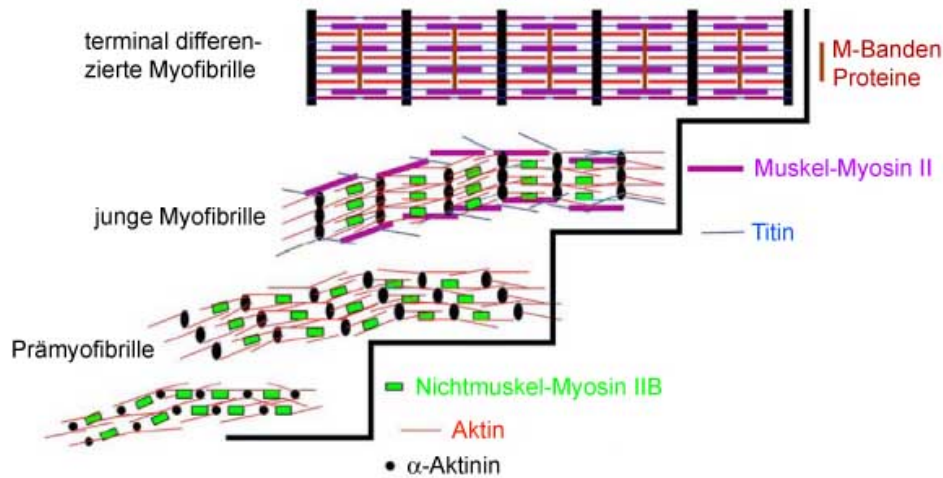


Abbildung 1.5: **Prämyofibrillenmodell nach Sanger.** Myofibrillen entstehen aus Vorläuferstrukturen, den sogenannten Prämyofibrillen. Diese sind aufgebaut aus Minisarkomeren, deren Grenzen die *Z-bodies* bilden, in denen sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin exprimiert wird. Das in den frühen Prämyofibrillen vorhandene Nichtmuskelmyosin wird mit der Reifung zu den naszierenden Myofibrillen gegen Muskelmyosin II ausgetauscht und auch Titin kann detektiert werden. In diesem Stadium sind die *Z-bodies* lateral miteinander zu Z-Scheibenvorläuferstrukturen fusioniert. In den terminal differenzierten Myotuben sind die Z-Scheiben und ebenso die gesamte Sarkomerstruktur voll ausgebildet. Abbildung modifiziert nach Sanger *et al.* (2005).

Myofibrillogenese bezeichnet wird. Der Aufbau einer funktionellen Myofibrille aus ihren Einzelkomponenten bedingt die Interaktion vieler Proteine, sowie die exakte Kontrolle dieser Abläufe, wobei viele Details bislang unerforscht sind. Es existieren mehrere Modelle, zusammengefasst in Sanger *et al.* (2005), die die Entstehung einer Myofibrille beschreiben. Das von den Autoren bevorzugte Prämyofibrillenmodell (*premyofibril model*) (siehe Abbildung 1.5), beschreibt die Entstehung von Myofibrillen aus Vorläuferstrukturen, den Prämyofibrillen. Diese bestehen aus sogenannten Minisarkomeren und entstehen an den Rändern der Muskelzellen. Die Minisarkomere beinhalten in den sogenannten *Z-bodies* neben Aktinfilamenten und damit assoziierten Proteinen bereits sarkomerspezifische Proteine, wie z. B.  $\alpha$ -Aktinin. Außerdem sind Filamente aus Nichtmuskel-Myosin II vorhanden. Mit voranschreitender Myofibrillogenese beginnen die *Z-bodies* sich aneinander auszurichten und formen so die Z-Scheiben-Vorläufer der jungen Myofibrillen. In terminal differenzierten Myofibrillen sind die Z-Scheiben vollständig ausgebildet und angeordnet.



#### 1.2.1.4 Die Z-Scheibe und ihre Hauptakteure

Entgegen früheren Annahmen stellt die Z-Scheibe nicht nur ein statisches Gebilde zur Verankerung der Aktinfilamente dar. In den letzten Jahren wurde ein ausgedehntes Netzwerk von Proteinen erforscht, die dort lokalisiert sind und ihre Aktivität entfalten (Frank *et al.*, 2006). Interessanterweise sind in der Z-Scheibe mehrere Proteine vorhanden, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, welche die Z-Scheibe als biochemischen Sensor auszeichnen (Hoshijima, 2006). Weiterhin sind viele Z-Scheiben Proteine in der Lage zu anderen Kompartimenten (z. B. Nukleus) zu gelangen und so Signale weiterzuleiten (Gautel, 2008). Zwei Proteine, welchen eine zentrale Rolle in der Z-Scheibe zugesprochen wird, sind die ABPs  $\alpha$ -Aktinin und Filamin.

##### $\alpha$ -Aktinin

$\alpha$ -Aktinin gehört, neben Spektrin und Dystrophin, zur Spektrin Superfamilie. In Säugetieren existieren vier Gene (*ACTN1*, *ACTN2*, *ACTN3* und *ACTN4*), die für mehrere  $\alpha$ -Aktinin-Isoformen kodieren und gewebespezifische Expression aufweisen. Im Skelettmuskel werden  $\alpha$ -Aktinin 2 und 3, in Nichtmuskelzellen dagegen  $\alpha$ -Aktinin 1 und 4 exprimiert (Blanchard *et al.*, 1989). Alle  $\alpha$ -Aktinin-Isoformen bestehen aus einer N-terminalen Aktinbindungsdomäne (ABD) gefolgt von vier sogenannten *Spektrin Repeats*, auch *rod*-Domänen genannt, sowie einer C-terminalen Calmodulin-ähnlichen Domäne (CAM-Domäne) (Davison und Critchley, 1988; Travé *et al.*, 1995; Castresana und Saraste, 1995). Durch die Bildung von antiparallelen Dimeren kann  $\alpha$ -Aktinin Aktinfilamente bündeln (Yläne *et al.*, 2001). Die Dimerisierung erfolgt über die positiv geladenen *Spektrin Repeats* 1 und 2 mit den negativ geladenen *Spektrin Repeats* 4 und 3 eines zweiten  $\alpha$ -Aktininmoleküls (Djinovic-Carugo *et al.*, 1999). Die ABD ist aufgebaut aus zwei Calponin-Homologie-Domänen (CH-Domänen) und ähnelt somit einer Reihe weiterer Aktin bindender Proteine, wie z. B. Dystrophin und Filamin (Troys *et al.*, 1999). Die CAM-Domäne besteht aus vier *EF-hand*-Motiven, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden können. Die Calcium-Bindung beeinflusst und reguliert die Affinität des nichtmuskelspezifischen  $\alpha$ -Aktinin-Dimers zum F-Aktin (Burrige und Feramisco, 1981; Noegel *et al.*, 1987). Die muskelspezifischen  $\alpha$ -Aktinine 2 und 3 haben diese Fähigkeit durch Mutationen während



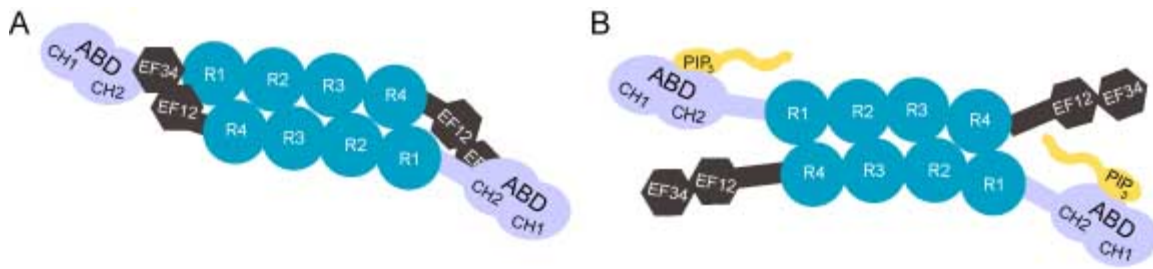


Abbildung 1.6: **Schematische Darstellung der Struktur des  $\alpha$ -Aktinin2-Dimers.** A: Die CAM-Domäne des einen  $\alpha$ -Aktinin-Moleküls bindet zwischen der ABD und den Spektrin-Like-Repeats des anderen Moleküls. B: Die konformationelle Änderung durch die zusätzliche Bindung von PIP<sub>2</sub> ermöglicht der CAM-Domäne mit Titin zu interagieren, was gleichzeitig die Affinität des  $\alpha$ -Aktinins zu F-Aktin erhöht.

der Evolution verloren (Blanchard *et al.*, 1989). Hier wird die Affinität des  $\alpha$ -Aktinins zum F-Aktin über die Bindung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) erreicht (Fraley *et al.* (2003), Abb. 1.6). Zudem bindet die CAM-Domäne Titin, welches an der Lokalisierung oder genauer dem sogenannten *Targeting*, von  $\alpha$ -Aktinin an die Z-Scheibe beteiligt ist (Young und Gautel, 2000).

Für  $\alpha$ -Aktinin wurde eine Vielzahl verschiedenster Interaktionspartner beschrieben. Hierzu gehören u. a. Transmembranproteine, Proteine der *dense bodies* (s. u.) bzw. der Z-Scheiben sowie des Kontraktionsapparates der quergestreiften Muskulatur (zusammengefasst in Sjöblom *et al.* (2008)). Transmembranproteine interagieren überwiegend über ihre positiv geladenen zytoplasmatischen Schwanzregionen mit den negativ geladenen *rod*-Domänen des  $\alpha$ -Aktinins (z. B.  $\beta$ -Untereinheit des Integrins (Otey *et al.*, 1990) oder Vinculin (Wachsstock *et al.*, 1987)). Die *dense bodies* der Nichtmuskelzellen sind die strukturellen und funktionellen Analoga der Z-Scheiben im quergestreiften Muskel (Lazarides und Burridge, 1975). In diesen Strukturen bindet  $\alpha$ -Aktinin an PDZ- und LIM Domänen enthaltenen Proteine, wie z. B. Zyxin (Crawford *et al.*, 1992) oder Proteine der Enigma/Cypher-Familie (Bauer *et al.*, 2000). Mit  $\alpha$ -Aktinin wechselwirkende Proteine der Kontraktionsmaschinerie sind z. B.: Titin (Ohtsuka *et al.*, 1997), Nebulin (Nave *et al.*, 1990), CapZ (Papa *et al.*, 1999) sowie Myotilin (Salmikangas *et al.*, 1999). Die Vielzahl an verschiedenen Bindungspartnern macht  $\alpha$ -Aktinin zu einer Interaktionsplattform, deren Regulationsmechanismen bislang allerdings noch unverstanden sind.

## Filamin

Filamin wurde zuerst von Wang *et al.* (1975) sowie von Hartwig und Stossel (1975) entdeckt. In Säugetieren existieren drei Filamingene (*FLNA*, *FLNB* und *FLNC*), welche teilweise gewebespezifisch exprimiert werden (van der Flier und Sonnenberg, 2001). Während Filamin A und B ein breites Expressionsmuster aufweisen, scheint die Filamin C Expression auf den Skelett- und Herzmuskel limitiert zu sein (Thompson *et al.*, 2000). Filamine lokalisieren in Nichtmuskelzellen entlang von Aktin-Stressfasern sowie im kortikalen Aktinnetzwerk. In Skelett- und Herzmuskelzellen ist es vorrangig in der Z-Scheibe, aber auch in den Muskel-Sehnenverbindungen bzw. in den Glanzstreifen zu finden (van der Ven *et al.*, 2000). Alle Filamine zeigen einen sehr ähnlichen molekularen Aufbau. N-terminal gelegen befindet sich eine ABD, die ähnlich wie beim  $\alpha$ -Aktinin aus zwei CH-Domänen aufgebaut ist und drei hydrophobe Aktinbindungsstellen aufweist (Pollard *et al.*, 1994). Darauf folgen 24 Immunglobulin-ähnliche, sogenannte Ig-Domänen, jede aufgebaut aus zwei  $\beta$ -Faltblättern, die sich wiederum aus drei bzw. vier antiparallelen  $\beta$ -Strängen (Stränge A-G) zusammensetzen (Fucini *et al.*, 1997; Pudas *et al.*, 2005). Eine schematische Darstellung der Filaminstruktur ist in Abbildung 1.7 gezeigt. Die letzte Ig-Domäne vermittelt die Dimerisierung des Filamins (Himmel *et al.*, 2003). Die Ig-Domänen 15 und 16 sowie 23 und 24 werden jeweils durch Gelenkregionen, sogenannte *hinge*-Regionen getrennt. Die Filamine A, B und C weisen untereinander, mit Ausnahme der Gelenkregionen, eine Sequenzhomologie von 60 bis 80 % auf (Gorlin *et al.*, 1990). Für Filamin A konnte gezeigt werden, dass die Ig-Domänen 16-17, 18-19 und 20-21 kompakte Domänenpaare bilden, welche eine Rolle in der Regulation der Interaktionen mit anderen Proteinen darstellen (Heikkinen *et al.*, 2009). Für Filamin B und C wird diese Paarung von Ig-Domänen ebenfalls vermutet (Heikkinen *et al.* (2009), persönliche Kommunikation mit Prof. J. Ylännä). Die muskelspezifische Isoform C unterscheidet sich von den anderen Filaminen durch eine Insertion von 81 Aminosäuren in der zwanzigsten Ig-Domäne, welche an der Positionierung von Filamin C an die Z-Scheibe beteiligt zu sein scheint (Xie *et al.*, 1998; van der Ven *et al.*, 2000). In der prominentesten Spleißvariante des Filamin C fehlt zudem die Gelenkregion zwischen Ig-Domäne 15 und 16 (Xie *et al.*, 1998). In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl an Bindungspartnern von Filamin C beschrieben (Stossel *et al.*, 2001; Popowicz

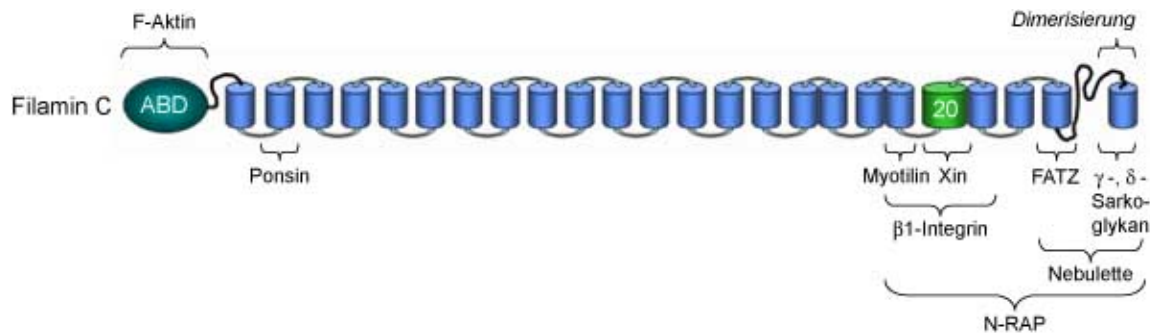


Abbildung 1.7: **Schematische Darstellung eines Filamin C Moleküls.** N-terminal befindet sich eine Aktinbindungsdomäne gefolgt von 24 Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Die Ig-Domäne 24 ist zur Dimerisierung befähigt. Filamin C unterscheidet sich von Filamin A und B v. a. durch eine Insertion in Ig-Domäne 20, welche deshalb grün hervorgehoben ist. Weiterhin sind die Bindungsstellen von einigen Interaktionspartnern des Filamin C aufgeführt.

*et al.*, 2006). So konnten z. B. Thompson *et al.* (2000) zeigen, dass Filamin C mit  $\gamma$ - und  $\delta$ -Sarkoglykanen interagiert. Filamin stellt somit eine mögliche Verbindung zwischen der Membran und dem Aktinzytoskelett dar. Zudem wechselwirkt es mit Strukturproteinen der Z-Scheibe, wie z. B. Myotilin (van der Ven *et al.*, 2000) und Calsarcin/FATZ/Myozenin (Frey und Olson, 2002; Gontier *et al.*, 2005), Xin (van der Ven *et al.*, 2006), KY-Protein (Beatham *et al.*, 2004) aber auch mit dem Costamer-Protein Ponsin (Zhang *et al.*, 2007). Im Herzen interagiert Filamin C mit Nebulette (Holmes und Moncman, 2008). Einige Bindungspartner sind in Abbildung 1.7 aufgelistet. Neben dieser mechanischen Funktion werden den Filaminen eine Rolle in Signaltransduktionsprozessen zugesprochen. So bindet der C-Terminus von Filamin an verschiedene GTPasen der Rho-Familie, welche als „Schalter“ in verschiedenen Umbauprozessen des Aktinzytoskeletts wirken (Ohta *et al.*, 1999), als auch an den Guaninnukleotidaustauschfaktor Trio, der für die Aktivierung der GTPasen RhoG, Rac1 und RhoA verantwortlich ist (Bellanger *et al.*, 2000). Folglich kann Filamin das *Targeting* der GTPasen und ihrer Aktivatoren an die Z-Scheibe vermitteln und so verschiedene Signaltransduktionsprozesse koordinieren, die die Anordnung und den Umbau des Aktinzytoskeletts steuern. Die verschiedenen Funktionen des Filamins werden sowohl über Phosphorylierung diverser Kinasen, wie die Poteinkinase C oder die cAMP- und CaM-Kinase, (Ohta und Hartwig, 1995; Tigges *et al.*, 2003; Wallach *et al.*, 1978) als auch über die Calpain-vermittelte Proteolyse (Raynaud *et al.*, 2006) und strukturell bedingte Autoinhibition (Lad *et al.*, 2007), reguliert.

## 1.2.2 Die glatte Muskulatur

Muskelfasern ohne die charakteristische Streifung durch die regelmäßige Anordnung der Myofibrillen werden als „glatt“ bezeichnet, da lichtmikroskopisch das Zytoplasma der Glattmuskelzellen homogen erscheint (Abb. 1.8). Die spindelförmigen Glattmuskelzellen sind 20 bis 200  $\mu\text{m}$  lang und bis 10  $\mu\text{m}$  breit. Der ovale Zellkern liegt in der Mitte der Zelle. Bei Kontraktion nimmt die Länge der Zelle ab, während der Umfang zunimmt. Der Zellkern nimmt währenddessen eine korkenzieherartige Gestalt an. Die Aktin- und Myosinfilamente in Glattmuskelzellen sind in längsgerichteten Fibrillen angeordnet, wobei die Aktinfilamente in den sogenannten Ansammlungspunkten (*dense bodies*) verankert sind. Diese Strukturen sind, wie die Z-Scheiben der Skelettmuskulatur reich an  $\alpha$ -Aktinin. Zudem sind die Glattmuskelzellen von Intermediärfilamenten durchzogen, die ebenfalls mit den *dense bodies* verbunden sind. Die Fibrillen sind wie die Intermediärfilamente, an der Plasmamembran in Anheftungsplatten (*dense plaques*) befestigt und ermöglichen darüber den Kontakt zu benachbarten Zellen. Eine Besonderheit dieses Muskeltyps stellen die sogenannten *Caveolae* dar, Invaginationen des Sarkolemm, welche an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind. Eine schematische Darstellung aller wichtigen Bestandteile einer Glattmuskelzelle liefert Abbildung 1.8. Glattmuskelzellen kontrahieren im Vergleich zur quergestreiften Muskulatur eher langsam und oft über lange Zeit. Da die glatte Muskulatur nur langsam ermüdet, kommt sie vor allem in Organen vor, die konstant in Bewegung sind, wie in pulsierenden Blutgefäßen, in Eingeweiden wie z. B. Darmtrakt, Atmungs-trakt, Harn- und Geschlechtsorganen und in Drüsen. Sie kann auch außerordentlich große Kräfte entwickeln, z. B. während des Geburtsvorganges bei der Kontraktion des Uterus, dem größten Glattmuskel. Glattmuskelzellen werden abhängig von der Art der Innervation in zwei Typen unterschieden. Der sogenannte ***Single-unit-Typ*** ist elektrisch mit benachbarten Glattmuskelzellen über *Gap junctions* verbunden. Größere Zellverbände reagieren somit als funktionelle Einheit. Durch die Depolarisation einzelner, unabhängig agierenden Schrittmacherzellen, wird die Erregung auf alle verbundenen Zellen ausgebreitet. Die Geschwindigkeit und Stärke der Kontraktion wird zwar durch Neurone, die synaptisch an den Glattmuskelzellen enden, beeinflusst, ist aber für die Innervierung nicht erforderlich. *Single-unit-Typ*-Muskelzellen findet man im Magen-Darm-Trakt, in Urogenitalorganen

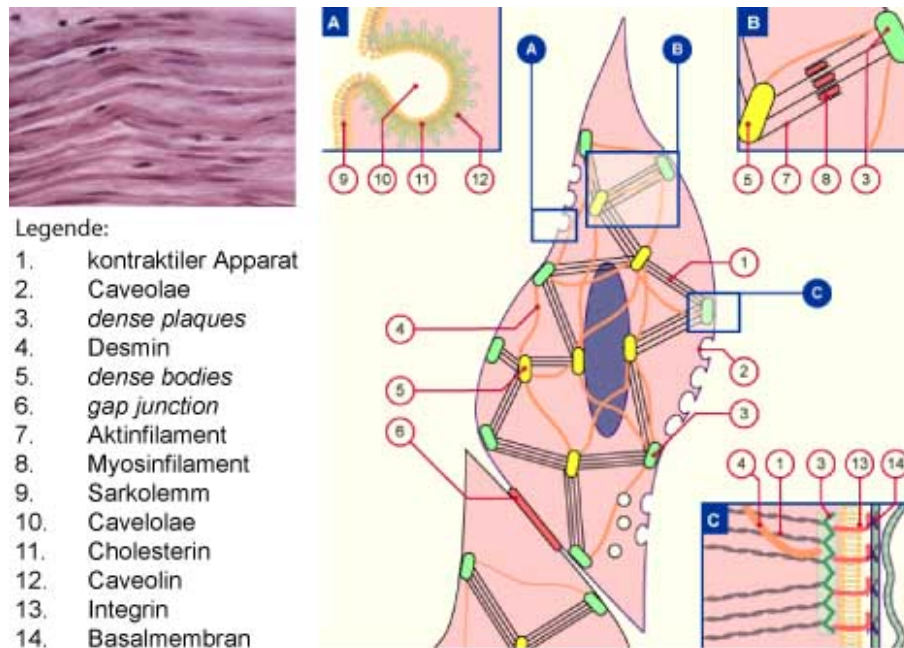


Abbildung 1.8: **Übersicht über den Aufbau der glatten Muskulatur.** Oben links dargestellt ist eine Hämalaun-Eosin-Färbung eines Glattmuskels. Deutlich zu erkennen sind die spindelförmigen Glattmuskelzellen mit je einem Zellkern sowie das homogene Zytoplasma. Rechts dargestellt ist eine schematische Zeichnung einer Glattmuskelzelle mit den typischen Zytoskelettbestandteilen. (Abbildung modifiziert nach <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/muskel/glatte/d-glatte.php>)

(z. B. Harnblase, Uterus) sowie in Arterien und Arteriolen. Im Gegensatz dazu werden Glattmuskelzellen des sogenannten **Multi-unit-Typs** nur einzeln, also unabhängig voneinander innerviert. Sie kontrahieren nur nach neuronaler Stimulation. Dieser Muskeltyp kommt vor allem in der Wand kleinerer Gefäße, im Ziliarkörper des Auges oder den Atemorganen vor.

### 1.2.3 Die Kontraktionsmechanismen im quergestreiften und glatten Muskel

Die besondere Eigenschaft von Muskeln ist ihre Fähigkeit zur Kontraktion. Diese Kontraktion wird bewerkstelligt durch das Zusammenspiel von dünnen Aktinfilamenten und aus dem Motorprotein Myosin bestehenden dicken Filamenten. Hierbei gleiten die Filamentproteine ohne Veränderung der Eigenlänge aneinander vorbei und verkürzen somit die Länge des Muskels (Gleitfilamenttheorie, Huxley und Hanson (1954)). Im quergestreiften Muskel wird die Kontraktion durch Aktin bindende Proteine wie folgt reguliert: entlang

des Aktinfilaments befinden sich das langgestreckte Tropomyosin (TM), welches bei niedriger Calciumkonzentration die Anlagerung von Myosin sterisch behindert, sowie der Troponin (TN)-Komplex, bestehend aus den Untereinheiten TN-C, -I und -T. TN-C besitzt eine hohe Affinität zu Calcium-Ionen. Wird die Kontraktion durch ein Aktionspotential initiiert, so führt dies zur Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Dieses bindet an TN-C, welches durch allosterische Regulation eine Konformationsänderung des Tropomyosins bewirkt. Dadurch wird die Myosinbindungsstelle am Aktinfilament freigelegt.

Im glatten Muskel werden dagegen weder Troponin noch Tropomyosin exprimiert. Die Regulation erfolgt hier über Calmodulin, Caldesmon und die Myosin-Leichtketten-Kinase (*myosin light chain kinase*, *MLCK*). Caldesmon ist ein langgestrecktes Protein, welches am Aktinfilament bindet und ähnlich wie Tropomyosin im quergestreiften Muskel die Anlagerung von Myosin an Aktin verhindert. Calmodulin besitzt eine hohe Affinität zu Calcium. Bindet der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex an Caldesmon oder wird Caldesmon durch die Proteinkinase C phosphoryliert, gibt es die Myosinbindungsstellen am Aktin frei. Außerdem aktiviert der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex die MLCK, welche die leichten Ketten des Myosins phosphoryliert, wodurch das Myosinmolekül in seine aktive Form überführt wird und die Triebkraft für die Kontraktion bereitstellen kann.

## 1.3 Die Podin-Proteinfamilie

Die Podin-Proteinfamilie umfaßt die drei Mitgliedern: Synaptopodin, Myopodin und Triptopodin, welche durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Alle drei Proteine untereinander sind sehr homolog und besitzen einen hohen Anteil an Prolinen, was eine gestreckte ungefaltete Struktur der Proteine vermuten lässt (Mundel *et al.*, 1997; Khaymina *et al.*, 2007).

### 1.3.1 Synaptopodin

Synaptopodin, kodiert durch das Gen *SYNPO*, wurde erstmals 1997 von Mundel *et al.* beschrieben und wird vor allem in der Niere und in telenzephalen Regionen des Ge-

hirns exprimiert. In Podozyten der Nieren ist es punktförmig entlang des Aktinzytoskeletts lokalisiert. Auch in den dendritischen Dornen (*dendritic spines*) des zentralen Nervensystems (ZNS) ist Synaptopodin mit dem Aktinzytoskelett assoziiert (Deller *et al.*, 2000b). Eine direkte Interaktion von Synaptopodin mit F-Aktin konnte durch Kremerskothen *et al.* (2005) gezeigt werden. Außerdem interagiert Synaptopodin über mehrere unabhängige Bindungsstellen direkt mit  $\alpha$ -Aktinin (Kremerskothen *et al.*, 2005; Asanuma *et al.*, 2005). Weiterhin fanden Asanuma *et al.* (2005) heraus, dass murines Synaptopodin in drei Spleißvarianten auftritt, welche gewebspezifisch exprimiert werden, Synpo-short (685 Aminosäuren) neuronal, Synpo-long (903 Aminosäuren) und Synpo-T (181 Aminosäuren) renal. Eine Zusammenfassung der humanen Synaptopodinisoformen, sowie der  $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstellen befindet sich im Anhang B.1. Erste Untersuchungen ließen vermuten, dass Synaptopodin den Dornenapparat (*spine apparatus*), eine spezialisierte Form des endoplasmatischen Retikulums, mit dem Aktinzytoskelett verbindet und so eine Rolle in der aktinbasierten Formgebung der dendritischen Dornen besitzt (Deller *et al.*, 2000a). Zur ausführlicheren Untersuchung der Funktion dieses Proteins wurde eine Synaptopodin knockout-Maus (Synpo<sup>-/-</sup> - Maus) generiert. Diese Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Auch die Nierenfunktion ist unbeeinträchtigt, obwohl Synaptopodin im Wildtyp dort sehr stark exprimiert ist. Auch neuroanatomische Untersuchungen der Gehirne ergaben keine Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen und erst die genaue Betrachtung der telenzephalischen Neurone ergab, dass Synpo<sup>-/-</sup> - Mäuse keinen Dornenapparat besitzen (Deller *et al.* (2003)). Da der Dornenapparat eine potentielle Rolle in der Langzeit-Potenzierung (*LTP - longterme potentiation*) ausübt, wurden die Synpo<sup>-/-</sup> - Mäuse diesbezüglich untersucht. Dabei fand man heraus, dass die LTP im Hippocampus reduziert ist und dass die Mäuse ein verschlechtertes Ortsgedächtnis besitzen. Die Synpo<sup>-/-</sup> - Mäuse exprimieren zwar weder Synpo-short noch Synpo-long, allerdings wird die Isoform Synpo-T exprimiert. Diese Isoform ist in den Podozyten der defizienten Tiere hochreguliert und kann dort vermutlich die Deletion von Synpo-long kompensieren (Asanuma *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Myopodin

Das Protein Myopodin, kodiert durch das Gen *SYNPO2*, wurde zuerst im Jahre 2001 von Weins *et al.* beschrieben. Die Aminosäuresequenz weist mit 47,7% signifikante Homologie zu Synaptopodin auf. Northern Blot-Analysen des murinen Herz- und Skelettmuskels ergaben, dass die mRNA des Myopodins eine Länge von etwa 3,6 kb beträgt. Das entsprechende Protein wurde mit 80 kDa im Skelettmuskel und 95 kDa im Herzmuskel bestimmt. Da beide Muskelarten nur ein Transkript der gleichen Größe aufwiesen, wurde zunächst vermutet, dass die unterschiedlichen Proteinisoformen aufgrund posttranslationaler Modifikationen entstehen. Von de Ganck *et al.* (2008) wurde hingegen gezeigt, dass alternative Spleißvorgänge zu mindestens drei verschiedenen Proteinvarianten führen.

Weiterhin postulierten Weins *et al.* (2001), dass Myopodin eine Aktinbindungsstelle besitzt und anhand von Transfektionsstudien mit Deletionskonstrukten konnte diese Region im zentralen Bereich des Myopodins auf etwa 150 Aminosäuren eingegrenzt werden. Die Beobachtung, dass die Überexpression von Myopodin zu Aktinbündeln im Zytoplasma und zur Bildung Myopodin-haltiger Aktinschleifen im Nukleus führte, ließ die Autoren schlussfolgern, dass Myopodin Aktinbündelungsaktivität aufweist. Immunfluoreszenzuntersuchungen von Skelettmuskelzellen ergaben, dass Myopodin in Myoblasten vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist, während es in differenzierten Muskelzellen mit  $\alpha$ -Aktinin in den Z-Scheiben der quergestreiften Muskulatur kolokalisiert ist. Deshalb wurde vermutet, dass Myopodin zum einen eine strukturelle Funktion in den Z-Scheiben besitzt, zum anderen aber auch als Signalprotein zwischen Z-Scheibe und Nukleus fungieren könnte (Weins *et al.*, 2001).

Die Bindung an Aktin konnte von bereits 1999 von (Leinweber *et al.*, 1999) gezeigt werden, allerdings wird Myopodin hier Fesselin genannt. Erst im Jahre 2009 wurde gezeigt, dass Fesselin eine Ortholog des Myopodins ist Schroeter *et al.* (2008a). Fesselin stimuliert die Nukleation von Aktin sowie dessen Polymerisation (Beall und Chalovich, 2001). Weiterhin wurde Myopodin als Interaktionspartner von  $\alpha$ -Aktinin beschrieben (Takada *et al.*, 2001; Pham und Chalovich, 2006; Faul *et al.*, 2007), wobei diese Interaktion das 14-3-3 abhängige *Targeting* von Myopodin in den Zellkern verhindern kann (Faul *et al.*, 2007). Weitere Bindungspartner für Myopodin sind Zyxin (Yu und Luo,



2006) und Calmodulin, dessen Bindung  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig reguliert wird Kolakowski *et al.* (2004). Weiterhin inhibiert Myopodin die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität, weshalb Myopodin bzw. Fesselin im Glattmuskel eine ähnliche Rolle wie Caldesmon zugesprochen wird (Schroeter und Chalovich, 2005). Auch die Bindung an Myosin konnte nachgewiesen werden (Schroeter und Chalovich, 2005).

Bereits 2001 konnten Lin *et al.* zeigen, dass *SYNPO2* in invasivem Prostatakrebs häufig Deletionen aufweist. Neben Northern Blot-Analysen, die im Widerspruch zu Weins *et al.* (2001) die Expression eines 4,2 kb Transkriptes in Prostata, Dünn- und Dickdarm, im Herzen sowie besonders stark im Skelettmuskel beschrieben, zeigten *in situ*-Hybridisierungs (ISH)-Experimente mit humanem Prostatagewebe die Expression von Myopodin in den dortigen Epithel- und vor allem in den Drüsenzellen. Das glattmuskelnreiche Stroma weist dagegen keine Expression von Myopodin-mRNA auf. Aufgrund der Homologie zu Synaptopodin wurde von Lin *et al.* (2001) spekuliert, dass Myopodin u. a. eine Rolle in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten besitzt. Wird durch Deletionen des Myopodin-Gens die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten behindert, so kann dies zur verstärkten Migration der betroffenen Zellen aus dem Zellverband und folglich zur Bildung von Metastasen bzw. invasiven Krebs führen. Spätere Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass Myopodin eine Rolle als Tumorsuppressor besitzen könnte. So beschrieben Sanchez-Carbayo *et al.* (2003), dass im normalen Urothel der Harnblase Myopodin im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert ist, in verändertem Gewebe oberflächiger und invasiver Blasen Tumoren dagegen eine verminderte nukleäre Myopodinexpression zu beobachten ist. Weiterhin beschrieben Jing *et al.* (2004), dass eine Expression von Myopodin Tumorwachstum und Metastasierung unterdrückt. Immunhistochemische Färbungen durch Jing *et al.* (2004) zeigten Expression des Myopodins im Epithel- und Drüsengewebe der Prostata. Allerdings stehen diese Beobachtungen der Myopodinexpression in Epithelien im Widerspruch mit eigenen durchgeführten Versuchen, in denen Myopodin auf Proteinebene lediglich in Muskelzellen nachgewiesen werden konnte (Linnemann, 2005; Krüger, 2007).

### 1.3.3 Tritopodin

Tritopodin ist das dritte und bislang am wenigsten erforschte Mitglied der Podin-Proteinfamilie und wird von dem Gen *SYNPO2L* kodiert. Die signifikante Homologie von 30 % zu Myopodin auf Aminosäureebene lässt ähnliche Funktionen für diese Proteine vermuten. Affymetrix *All-Exon-Chip-Analysen* deuten darauf hin, dass Tritopodin auf mRNA-Ebene vor allem in quergestreiften Muskeln exprimiert wird.

Kürzlich wurde von Beqqali *et al.* (2010) eine erste ausführliche Studie zu diesem Protein, in diesem Fall CHAP (*cytoskeletal heart-enriched actin-associated protein*) genannt, veröffentlicht, deren Ergebnisse im Folgenden zusammengefasst werden sollen. Die genomische Organisation des murinen CHAPs (mCHAP) zeigt die Expression von 5 Exons, wobei zwei Isoformen postuliert werden: mCHAPa, bestehend aus den Exons 1, 2, 3 und 5 sowie mCHAPb resultierend aus einem Startcodon in Exon 4. Die entsprechenden Proteinvarianten werden mit 140 kDa (mCHAPa) und 110 kDa (mCHAPb) beschrieben. Das Protein mCHAPa besitzt N-terminal eine PDZ-Domäne, beide Isoformen beinhalten eine klassische Kernlokalisationssequenz (KKRR).

Expressionsanalysen auf mRNA und Proteinebene in Mäusen zeigten, dass mCHAP *in vivo* und *in vitro* in differenzierenden Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert wird, wobei die mRNA der Isoform mCHAPb bereits ab Tag E7,75 (embryonaler Tag 7,75) im „halbmondförmigen Herzfeld“ (*cardiac crescent*) und ab Tag E10 im dorsalen Bereich der Somiten, aus dem sich später Muskelgewebe entwickelt, nachgewiesen wurde. mCHAPa hingegen konnte nicht in den frühen Stadien der Muskelentwicklung nachgewiesen werden, ist aber die prominente Isoform im adultem Herz- und Skelettmuskelgewebe, wo der mCHAPb-Expressionlevel hingegen stark verringert ist. In differenzierenden murinen Skelettmuskelzellen (C2C12-Zellen) konnten aber beide Isoformen mit zunehmender Differenzierung in steigenden Mengen nachgewiesen werden.

Immunfluoreszenzfärbungen von embryonalen Cardiomyozyten (E17,5), adulten Herzmuskel- und Skelettmuskelgewebeschnitten zeigten die Kolokalisation von mCHAP mit  $\alpha$ -Aktinin in den Z-Scheiben der Sarkomere, wobei es aber auch gelegentlich im Kern von embryonalen Herzmuskelzellen beobachtet wurde. Transfektionsstudien mit trunkierten mCHAP-Fragmenten deuten darauf hin, dass der N-terminale Bereich des Proteins,

unabhängig davon, ob die Kernlokalisationssequenz enthalten war, für die Lokalisation im Zellkern verantwortlich ist, während der C-terminale Bereich die Aktinassoziation verursacht. Coimmunpräzipitationen zeigten, dass mCHAP mit  $\alpha$ -Aktinin interagiert, jedoch nicht mit Aktin (Beqqali *et al.*, 2010).

Im Zebrafisch (*Danio rerio*) konnten von Beqqali *et al.* (2010) zwei Gene (*chap1* und *chap2*) bestimmt werden, die für CHAP kodieren, deren Expression während der Entwicklung ausführlich studiert wurde. Die gezielte Herunterregulierung des Expressionslevels von *chap1* sowie von *chap2* durch die Anwendung von *antisense morpholino* Oligonukleotiden, führte zu einer gestörten Somitenentwicklung, einer abnormalen Herzmorphologie sowie verringerter Kontraktilität und der Ausbildung cardialer Ödeme. Zudem konnten Morpholino-behandelte Zebrafische nicht von alleine schlüpfen, was auf eine reduzierte Muskelkraft schließen lässt. An Tag 6 nach der Befruchtung starben die *chap*-Mutanten. Die genauere Analyse der *chap1*-Mutanten ergaben eine veränderte Morphologie des Herzens. Immunfluoreszenzfärbungen der Skelettmuskeln wiesen die Zerstörung der Somitengrenzen in *chap1*-Mutanten und die irreguläre Anordnung der Muskelfasern in den Somiten nach. Die Ultrastrukturanalyse mittels Elektronenmikroskopie zeigte die Zerstörung bzw. das Fehlen von Sarkomerstrukturen.

All diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CHAP/Tritopodin eine wichtige Funktion für die Morphogenese der quergestreiften Muskulatur übernimmt.

## 1.4 Ausgangspunkt und Zielstellung

Die Ausbildung der kontraktilen Myofibrillen ist ein sehr komplexer Vorgang, der die streng kontrollierten Interaktionen vieler Proteine bedarf. Auf der Suche nach Proteinen, die an diesen Prozessen beteiligt sind, stellte sich die Podin-Proteinfamilie als potentiell interessante Komponenten heraus. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die zellbiologische und biochemische Charakterisierung der Podin-Proteinfamilie. Zum einen galt es, die Genstruktur und die daraus resultierenden Isoformen für Myopodin und Tritopodin aufzuklären, zum anderen sollte die Expression dieser Isoformen in verschiedenen Geweben auf mRNA- und Proteinebene untersucht werden. Für die Analyse der Proteinisoformen

auf Western Blots, sowie für indirekte Immunfluoreszenzen auf Geweben und Zellen, sind spezifische Antikörper notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit generiert und charakterisiert werden sollten.

Da Myopodin und Tritopodin hauptsächlich in quergestreiften Muskeln exprimiert werden, stellte sich die Frage nach der möglichen Rolle der Podin-Proteine und ihrer Isoformen während der Muskelentwicklung. Mit Hilfe von RT-PCRs und der Detektion der Podin-Proteine in Western Blots durch die selbst generierten Antikörper, sollte die Expression der unterschiedlichen Isoformen während der Muskeldifferenzierung verfolgt und durch immunfluoreszenzmikroskopische Analysen die Lokalisation der Podin-Proteine in den Muskelzellen ermittelt werden.

In der Literatur wird beschrieben, dass Myopodin in der Prostata vornehmlich in den Epithel- und Drüsenzellen exprimiert wird. Eigene Experimente zeigten hingegen die ausschließliche Expression in den dortigen Glattmuskelzellen. Aufgrund dieser widersprüchlichen Daten sollte die Expression des Myopodins in Geweben mit hohem Glattmuskelanteil untersucht werden. Durch immunhistochemische Färbungen mit den neu generierten Myopodinantikörpern, aber auch mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen wird erhofft, diese Diskrepanz aufklären zu können.

Synaptopodin besitzt mehrere voneinander unabhängige Bindungsstellen für  $\alpha$ -Aktinin. Aufgrund der Homologie zwischen den Podin-Proteinen ist ein ähnliches Bindungsverhalten von Myopodin und Tritopodin an  $\alpha$ -Aktinin anzunehmen. Demzufolge sollte im Rahmen dieser Arbeit das Bindungsverhalten dieser beiden Podine an  $\alpha$ -Aktinin untersucht und die Bindungsstellen eingengt werden. Zudem deuten erste Studien unserer Arbeitsgruppe darauf hin, dass Myopodin mit Filamin C interagiert. Deshalb sollte diese Interaktion genauer charakterisiert werden, was auch die Ermittlung der Bindungsstärke einschließt. Weiterhin galt es zu untersuchen, ob auch Synaptopodin und Tritopodin in der Lage sind mit Filamin C zu wechselwirken.

Myopodin ist ein F-Aktin bindendes Protein, das vermutlich auch eine aktinbündelnde Aktivität aufweist. Durch die Eingrenzung der F-Aktinbindungsstelle sowie der Analyse der aktinbündelnden Eigenschaften wird erhofft, Hinweise auf die Funktion dieses Proteins in der Zelle zu erhalten.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit soll eine grundlegende und ausführliche Charakterisierung der Podin-Proteine erhalten werden, auf deren Basis kommende funktionelle Analysen die Rolle der Podin-Proteine in Muskelzellen aufklären können.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits

Die Herkunft der meisten Verbrauchsmaterialien und Kits ist im Text beschrieben. Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen, die Feinchemikalien für die Elektrophorese von Biorad (München), Zellkulturmedien und -zusätze wenn nicht anders angegeben von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) und weitere Chemikalien sowie Verbrauchsmaterialien von Roth (Karlsruhe) bzw. Sigma (Taufkirchen). Für das Ansetzen von Lösungen wurde steriles Reinstwasser (Millipore-Qualität) verwendet.

### 2.2 Kulturmedien für Bakterien und Hefen

Tabelle 2.1: Kulturmedien

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro Liter, pH 7,5
SOB-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,59 g NaCl, 0,19 g KCl pro Liter, pH 7,0
SOC-Medium	5 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose in SOB-Medium
YPD-Medium	20 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 20 g Glucose pro Liter, pH 6,5
DOB-Medium	1,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Glucose, 5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pro Liter, pH 5,8 mit entsprechenden Aminosäuresupplementen (-L, -W, -H, -LW, -LWH; Clontech)

Für Festmedien wurde 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

## 2.3 Antibiotika

Antibiotika wurden dem autoklavierten Nährmedium vor der Verwendung stets frisch zugesetzt.

Tabelle 2.2: Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration
Carbenicillin	100 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphenicol	34 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	50 $\mu\text{g/ml}$

## 2.4 Bakterien- und Hefestämme

### 2.4.1 DNA-Klonierung

*E. coli JM109* (Stratagene, Heidelberg),

Genotyp: e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1hsdR17(r-k m+k ) supE44 relA1- (lacproAB) [F' traD36 proAB lacIqZ\_M15]

### 2.4.2 Proteinexpression

*E. coli BL21(DE3)CodonPlus (DE3)-RP* (Stratagene, Heidelberg),

Genotyp: F- ompT hsdS(r-B m-B) dcm+ Tetr gal -(DE3) endA Hte [argU proL Camr]

*E. coli BL21(DE3)C43* (Lucigen, Middleton, USA),

Genotyp: F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3), Miroux und Walker (1996)

### 2.4.3 Hefe-Doppel-Hybridsystem

*Saccharomyces cerevisiae L40* (Invitrogen)

Genotyp: MAT $\alpha$  his3 $\delta$ 200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2::(4lexAop-HIS3) URA3::(8lexAop-lacZ)GAL4, Vojtek *et al.* (1993)

## 2.5 Plasmide

Alle Plasmide verfügen über eine Carbenicillin-Resistenzkassette (Ausnahme: pLexPd mit Kanamycin-Resistenz). Falls notwendig, wurde die vorhandene Klonierungskassette ersetzt, so dass geeignete Restriktionsschnittstellen (*MluI* bzw. *BamHI* und *SalI* bzw. *XhoI*) zur Verfügung standen. Vektorkarten relevanter Plasmide befinden sich im Anhang.

Tabelle 2.3: Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmid	Anwendungsgebiete (Eigenschaften)	Herkunft
pGEMT	T/A-Klonierung	Promega (Mannheim)
pET23aEEF	prokaryotische Expression (His6- und EEF-Tag)	modifizierter pET23a (Novagen) Obermann <i>et al.</i> (1996)
pET23aT7	prokaryotische Expression (His6- und T7-Tag)	modifizierter pET23a (Novagen) Obermann <i>et al.</i> (1996)
pGEX-6P3	prokaryotische Expression (GST-Tag)	Amersham (Freiburg)
pACT2Pd	Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente ( <i>GAL4 activation domain</i> Hybridanteil, <i>LEU2</i> )	modifizierter pAct2 (Clontech)
pLexPd	Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente ( <i>LexA DNA binding domain</i> Hybridanteil, <i>TRP1</i> )	modifizierter pLexA (Clontech) Stenmark <i>et al.</i> (1995)
pMypG	eukaryotische Expression (Myomesin-Promotor, EGFP-Tag)	modifizierter pCAT3-Enhancer (Promega) Pacholsky (2003)
pEGFP-BACP-N3	eukaryotische Expression (Beta-Aktin-Chicken-Promotor, C-terminaler EGFP-Tag )	modifizierte pEGFP-Vektor Eulitz, AG Fürst
pEGFP-BACP-C2	eukaryotische Expression (Beta-Aktin-Chicken-Promotor, N-terminaler EGFP-Tag )	modifizierte pEGFP-Vektor Eulitz, AG Fürst
pCMV5-T7	eukaryotische Expression (CMV-Promotor, T7-Tag)	modifizierter pCMV5-Vektor Obermann <i>et al.</i> (1998)



## 2.6 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in Tab. 2.4 zusammengestellt. Geeignete Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-Konjugate (HRPO) für Western Blots (WB); Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate für Immunfluoreszenzfärbungen (IF)) sind in Tab. 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.4: primäre Antikörper

Name	Epitop	Typ	Anwendung	Herkunft
A653	$\alpha$ -Aktinin (sarkomerspezifisch)	Kaninchen	IF	Van der Ven <i>et al.</i> (2000)
EA53	$\alpha$ -Aktinin (sarkomerspezifisch)	Maus IgG1	IF	Abcam
BM75.2	$\alpha$ -Aktinin	Maus IgM	IF	Sigma (#A5044)
RR90	Filamin	Maus IgA	IF	Van der Ven <i>et al.</i> (2000)
1A4	Glattmuskel-Aktin	Maus IgG2a	IF	Sigma (#2547)
C-11	Keratin	Maus IgG1	IF	Sigma (#C2931)
HH9	Myopodin	Maus IgG	IF, WB	AG Micheel, Universität Potsdam
M2*	Myopodin	Kaninchen	IF, WB	AG Fürst
Myop PDZ*	Myopodin (isoformspezifisch)	Kaninchen	IF, WB	AG Fürst
Myop Ex6*	Myopodin (isoformspezifisch)	Kaninchen	IF, WB	AG Fürst
ML1*	Tritopodin (isoformspezifisch)	Kaninchen	IF, WB	AG Fürst
G1D4	Synaptopodin	Maus IgG1	IF, WB	Progen
164D4	Zyxin	Maus IgG1	IF	Rottner <i>et al.</i> (2001)
Calsarcin	Calsarcin		IF	N. Frey
Synemin	Synemin		IF	O. Skalli
BB78	Myomesin	Maus	IF	Vinkemeier <i>et al.</i> (1993)
GST	GST-Tag	Maus	WB	Novagen
T7	T7-Tag	Maus IgG2b	WB, IP, IF	Novagen (#69522)
YL1/2	EEF-Tag	Ratte	WB	Wehland <i>et al.</i> (1983)

\*Die Immunisierung der Kaninchen mit den rekombinant exprimierten und gereinigten Proteinfragmenten zur Herstellung der polyklonalen Antikörper gegen Myopodin und Tritopodin wurden von der Firma Biogenes (Berlin) vorgenommen.

Tabelle 2.5: sekundäre Antikörper

Name	Donor	gegen	Konjugat	Herkunft
GAM-PO	Ziege	Maus IgG	HRPO	Dianova (#115-035-068)
GAM-PO	Ziege	Maus IgG Fc gamma1	HRPO	Dianova (#115-035-068)
GARat-PO	Ziege	Ratte	HRPO	Dianova (#112-035-143)
GAR-PO	Ziege	Kaninchen	HRPO	Dianova (#111-035-003)
GAM IRdye680	Ziege	Maus IgG	IRdye680	LI-COR (#926-68020)
GAM IRdye800CW	Ziege	Maus IgG	IRdye800	LI-COR (#926-32210)
GAR IRdye800CW	Ziege	Kaninchen	IRdye800	LI-COR (#926-32211)
GARat IRdye800CW	Ziege	Kaninchen	IRdye800	LI-COR (#926-32219)
GAM IgG Cy5	Ziege	Maus IgG	Cy5	Dianova
GAM IgG1 alexa488	Ziege	Maus IgG1	alexa488	Molecular Probes (#A-21121)
GAM IgG1 alexa350	Ziege	Maus IgG1	alexa350	Molecular Probes (#A-21120)
GAM IgG1 alexa594	Ziege	Maus IgG1	alexa594	Molecular Probes (#A-21125)
GAM IgA Txr	Ziege	Maus IgA	Texasrot	Southern Biotech (#1040-07)
GAM IgM alexa546	Ziege	Maus IgM	alexa546	Molecular Probes (#A-21045)
GAM IgM Cy5	Ziege	Maus IgM	Cy5	Dianova
GAR Cy2	Ziege	Kaninchen	Cy2	Dianova
GAR Cy3	Ziege	Kaninchen	Cy3	Dianova
GAR Cy5	Ziege	Kaninchen	Cy5	Dianova

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von RNA aus Geweben wurde das *RNeasy Fibrious Tissue Mini Kit* (Qiagen, Hilden), zur Isolierung aus kultivierten Zellen wurde das *Mini RNA Isolation II Kit* (Promega, Mannheim) oder das *Mini RNA Isolation Kit II* (Zymo Research) nach den Angaben der Hersteller verwendet. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde spektroskopisch, wie in Abschnitt 2.7.13 beschrieben, bestimmt.

## 2.7.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe des *Omniscript-RT-Kits* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Als Primer fanden randomisierte Hexamere (*random hexamers*) oder randomisierte Nonamere (*random nonamers*) Verwendung, welche per Zufallsprinzip an die mRNA binden. Um den Abbau der RNA im Reaktionsansatz zu verhindern, wurden RNase-Inhibitoren (RNasin, Promega) zugesetzt. Die Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes befindet sich in Tabelle 2.6. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C und an-

Tabelle 2.6: Reaktionsansatz für Reverse Transkription

Komponente	Menge
RNA	1 $\mu\text{g}$
Primer (random hexa-/nonamers, 100 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{l}$
<i>Omniscript Reverse Transkriptase</i> (4 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
dNTPs (5 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{l}$
RNase Inhibitoren (10 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
RT-Puffer (10x)	2 $\mu\text{l}$
Wasser	ad 20 $\mu\text{l}$

schließend 15 min bei 70 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden umgehend in PCR-Reaktionen eingesetzt oder für den späteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

## 2.7.3 5'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA-Ends*)

Die 5'-RACE ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren zwischen einer bekannten internen Sequenz und einer unbekanntem Sequenz am 5'-Ende (5'-RACE) oder am 3'-Ende (3'-RACE) (Frohman *et al.* (1988)). Als Matrize dient in beiden Fällen isolierte mRNA. In dieser Arbeit wurde eine 5'-RACE mit Hilfe des *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0* (Invitrogen) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle C aufgeführt. Die RNA wurde isoliert aus differenzierten humanen Skelettmuskelzellen. Die PCR-Produkte der 5'-RACE wurden anschließend über T/A-Klonierung (siehe Abschnitt 2.7.7) in den Vektor pGEM-T (Promega) inseriert und sequenziert. Die Sequenzierung wurde vorgenommen von AGOWA/LGC Genomics, Berlin.

## 2.7.4 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden ausgewählte Sequenzabschnitte von cDNAs spezifisch amplifiziert. Zur Amplifikation kleiner PCR-Fragmente wurde das Taq-DNA-Polymerase-System *Firepol* von *Solis Biodyne, Tartu, Estland* verwendet. Der gebrauchsfertige *5 x Mastermix Ready to Load* enthielt bereits die entsprechenden Puffer- und Ladekomponenten sowie die *Firepol*-Taq-Polymerase. Ein Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  etwa 25 ng Matrizen-DNA, 10 pmol *sense* und *antisense* Primer, 5  $\mu\text{l}$  *5 x Mastermix Ready to Load* sowie Wasser.

Um Abschnitte der cDNA zu amplifizieren, wurde das Reaktionsgemisch einem bestimmten Temperaturprofil unterworfen (siehe Tab. 2.7). Die Elongationszeit war dabei abhängig von der Länge des gewünschten PCR-Produktes (ca. 1 min für 1 kb).

Präparative PCRs wurden mit der *Pfu-Polymerase* (Fermentas) durchgeführt, da dieses Enzym über eine Korrekturlese-Funktion verfügt. Hier wurde ein für dieses Enzym spezifischer Puffer (Fermentas) eingesetzt. Außerdem wurde die Elongationszeit entsprechend der geringeren Ablesegeschwindigkeit der *Pfu-Polymerase* im Vergleich zur *Taq-Polymerase* verlängert (ca. 2 min für 1 kb).

Ein Reaktionsansatz enthielt bei einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  400  $\mu\text{M}$  Desoxyribonukleotide (Fermentas), 1x Enzympuffer (Puffersystem mit Ammoniumsulfat, Fermentas), 10 pmol *sense* und *antisense* Primer sowie 0,5 U *Pfu-Polymerase*. Um nachfolgende

Tabelle 2.7: Temperaturprofil für PCR

Phase	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Primeranlagerung (Annealing)	61 °C	30 sec	35 Zyklen
Elongation	72 °C	30–90 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

Klonierungsexperimente zu erleichtern, wurden mit den Primern Schnittstellen für Restriktionsenzyme (in der Regel *MluI* und *SalI*) eingefügt. Die Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich im Anhang C. Zur Analyse wurden je 5  $\mu\text{l}$  der PCR-Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.7.6).

## 2.7.5 Restriktionsverdau von DNA

### 2.7.5.1 Analytischer Restriktionsverdau

Zur Kontrolle von Plasmiden bzw. einklonierten DNA-Fragmenten auf ihre korrekte Größe wurden analytische Restriktionsverdaue durchgeführt. In einem 10  $\mu$ l-Ansatz wurden etwa 100 ng DNA mit 2 U je Restriktionsenzym und dem entsprechenden Enzympuffer (Fermentas) sowie mit Wasser zum Einstellen des Endvolumens versetzt und mindestens eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.7.6).

### 2.7.5.2 Präparativer Restriktionsverdau

Ansätze zum präparativen Verdau von DNA enthielten 10  $\mu$ g Plasmid- bzw. 1  $\mu$ g gereinigtes PCR-Fragment, je 10 U Restriktionsenzym sowie den entsprechenden Enzympuffer. Das Endvolumen wurde auf 50  $\mu$ l mit Wasser eingestellt und nach Inkubation bei 37 °C über Nacht auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.7.6).

## 2.7.6 Agarosegelelektrophorese

Es wurden, entsprechend der zu trennenden DNA-Längen, 1–2 %ige (w/v) Agarose in TAE-Puffer (s. u.), versetzt mit 1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid, bzw. 0,5x GelRed (Biotium) verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 0,2 Volumina Ladepuffer (6 x LoadingDye, Fermentas) versetzt und in die Auftragesaschen des Gels überführt. Um die Länge der DNA bestimmen zu können wurde ein Marker mit auf das Gel aufgetragen (z. B. *MassRuler DNA Ladder Mix*, Fermentas). Die Gele wurden bei 100–150 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des GelDoc-Systems von Biorad. Zur Reinigung einzelner Banden aus dem Gel wurden diese unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend die DNA unter Verwendung des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

TAE: 40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA, pH 8,3

### 2.7.7 Ligation

Durch Restriktionsverdau vorbereitete PCR-Produkte oder aus Vektoren herausgeschnittene DNA-Fragmente wurden in mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene Plasmide eingefügt (Klonierung über cohesive Enden) und diese mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase (Fermentas) geschlossen. Ein Ligationsansatz enthielt etwa 75 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuß an Insert-DNA und 1 U T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer (Fermentas). Das Endvolumen von 10  $\mu$ l wurde mit Wasser eingestellt. Der gesamte Ligationsansatz wurde nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur oder nach Inkubation bei 16 °C über Nacht zur Transformation von chemisch kompetenten Bakterien 2.7.8 verwendet.

Eine weitere Möglichkeit bestimmte DNA-Fragmente in einen Vektor einzubringen ist die sogenannte T/A-Klonierung. Voraussetzung hier ist die Amplifikation des Inserts mit einer *Taq-Polymerase*. Diese erzeugt A-Überhänge an den Enden der PCR-Produkte, über die sich das Insert in einen Vektor mit T-Überhängen (pGEM-T, Promega) einbauen lässt. Diese Methode fand Anwendung bei der Klonierung der durch die 5'-RACE erhaltenen PCR-Produkte.

### 2.7.8 Herstellung chemisch kompetenter *E.colis*

#### 2.7.8.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.colis* für Klonierungszwecke

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien für Klonierungszwecke erfolgte nach Inoue *et al.* (1990). Um einzelne Kolonien der gewünschten Bakterien zu erhalten, wurden diese zunächst aus einem Glycerolstock auf einer geeigneten LB-Agarplatte ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 5 Kolonien von dieser Platte werden 250 ml LB-Medium angeimpft und bei 18 °C bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,6 kultiviert. Nach Erreichen der OD wird die Kultur 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 45000 rpm für 10 min und bei 4 °C pelletiert (Labofuge 400R, Heraeus). Das Pellet wird in 80 ml eiskaltem TB aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. Unter ständigem Rühren werden 1,5 ml DMSO (7 % Endkonzentration)

hinzugesetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wird die Kultur in mit flüssigem Stickstoff gekühlte Eppendorfgläser aliquotiert (100 und 200  $\mu\text{l}$  Aliquots) und bis zum Gebrauch bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Kompetenz der chemisch kompetenten Bakterien wurde wie unter Abschnitt 2.7.8.3 beschrieben, bestimmt.

TB-Puffer: 10 mM PIPES, 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 250 mM KCl, pH 6,7 (mit KOH); 55 mM  $\text{MnCl}_2$

### 2.7.8.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.colis* für Expressionszwecke

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien für Expressionszwecke erfolgte wie oben beschrieben mit dem Unterschied, dass das Heranwachsen der Kultur nicht bei  $18\text{ }^\circ\text{C}$ , sondern bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  erfolgte. Die gewünschte OD wurde somit schon nach etwa 3 h erreicht.

### 2.7.8.3 Bestimmung der Kompetenz

Die Kompetenz von Bakterien ist als Anzahl erhaltener Kolonien pro 1  $\mu\text{g}$  transformierter DNA auf 100  $\mu\text{l}$  Bakterien definiert.

Zur Bestimmung der Kompetenz werden 1 pg und 10 pg Testplasmid (pUC 18) auf 50  $\mu\text{l}$  Bakterien transformiert (Durchführung siehe Abschnitt 2.7.9). Nach Inkubation der LB-Agarplatte bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht werden die erhaltenen Kolonien ausgezählt und die Kompetenz daraus errechnet.

### 2.7.9 Transformation in *E.coli*

Von eingefrorenen kompetenten Bakterienzellen (*JM109*, *BL21 CP* oder *BL21 C43*), Herstellung beschrieben in 2.7.8 wurden 100  $\mu\text{l}$  Aliquots mit 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz oder 100 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. In einem Wasserbad wurden die Zellen einem Hitzeschock von 45 s bei  $42\text{ }^\circ\text{C}$  ausgesetzt und dann sofort 5 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  LB-Medium mit 20 mM Glukose wurde die gesamte Suspension bei Carbenicillinresistenz tragenden Vektoren direkt auf eine LB-Agarplatte, versetzt mit Carbenicillin zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterienzellen, ausplattiert. Bei Verwendung von *E. coli* des Stammes *BL21 CP* wurden LB-

Agarplatten mit Carbenicillin und Chloramphenicol verwendet. Bei Vektor-vermittelter Kanamycinresistenz wurde der Transformationsansatz zunächst eine Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend wie oben beschrieben auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Diese wurden im Brutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für Blau-Weiß-Selektionen wurden den Agarplatten 0,5 mM IPTG sowie 80 µg/ml X-Gal hinzu gesetzt. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien zum Animpfen von Übernachtkulturen gepickt, aus welchen die Plasmide wie unter 2.7.11 isoliert und auf ihre Richtigkeit überprüft. Von Kolonien mit korrektem Plasmid wurden wie unter 2.7.10 beschrieben Glycerolstocks angefertigt.

### 2.7.10 Glycerolstocks

In einem Kryogefäß wurden 200 µl reines Glycerol mit 800 µl Bakteriensuspension gemischt. Die Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.7.11 DNA-Minipräparation

Für Plasmidisolierungen im Minimaßstab wurden 3–5 ml LB-Medium (versehen mit den entsprechenden Antibiotika) mit einer einzelnen Kolonie transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert (Übernachtkultur, ÜNK).

Für die meisten Anwendungen erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA aus ÜNK mittels alkalischer Lyse und anschließender Fällung mit Ethanol, wobei alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Zunächst wurden 2-5 ml Bakteriensuspension 5 min lang bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl RNase-haltigem Resuspensionspuffer-Puffer (s. u.) resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lysispuffer zugegeben und dieser Ansatz nicht länger als 5 min inkubiert. Schließlich erfolgte die Zugabe von 150 µl Neutralisationspuffer. Nach einer 5 minütigen Inkubation wurde der Ansatz für 30 min bei 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert, um die denaturierten Proteine sowie die genomische DNA zu pelletieren. Die im Überstand vorhandene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 900 µl 100% Ethanol



gefällt, anschließend durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min (Biofuge pico, Heraeus) pelletiert und das erhaltene Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 30  $\mu$ l Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die Quantifizierungen von DNA-Mengen erfolgte relativ zu Standards (*MassRuler DNA Ladder*, Fermentas) mit Hilfe der QuantityOne-Software (Biorad).

Resuspensionspuffer-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNase A)

Lysispuffer: 200 mM NaOH, 1% SDS

Neutralisationspuffer: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

### 2.7.12 Präparative DNA-Isolierung

Plasmide wurden im präparativen Maßstab unter Verwendung des Plasmid Midi Kits (Qiagen) aus 50–100 ml Übernachtskultur entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer (s. u.) aufgenommen. Die Reinheit und Konzentration der DNA wurde spektroskopisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm in TE-Puffer bestimmt.

TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

### 2.7.13 Spektrale Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Bestimmung der Reinheit und der Konzentration von DNA und RNA Proben wurde die Absorption(A) der Proben bei 260 nm, 280 nm und 320 nm in TE-Puffer bestimmt. Hierzu wurde das Spektralphotometer „Cary 50 Scan“ der Firma Varian verwendet. Die erhaltenen Werte der Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurden durch die Subtraktion des Messwertes bei 320 nm korrigiert. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe der aus dem Lambert-Beerschen Gesetz abgeleiteten Formel:

$$\text{Konzentration}[\mu\text{g/ml}] = A(260\text{nm}) * \text{Faktor} * \text{Verduennung}$$

wobei der Faktor die spezifische Konzentration repräsentiert, bei der eine Probe einen Absorptionswert bei 260 nm von 1 aufweist. Bei doppelsträngiger DNA ist dies bei 50 ng/ $\mu$ l, bei einzelsträngiger RNA bei 40 ng/ $\mu$ l der Fall. Die Reinheit der Proben wurde durch den Quotienten (Ratio) aus den korrigierten Absorptionen bei 260 und 280 nm abgeleitet:

$$\text{Ratio} = A(260)/A(280)$$

Dieser Quotient sollte bei DNA bei etwa 1,8 und bei RNA bei 2,0 liegen.

## 2.8 Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast Two-Hybrid System*, Y2H) dient der Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen. Das Prinzip des hier verwendeten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ist mehrfach beschrieben worden (Fields und Song (1989); Vojtek *et al.* (1993); Clontech (2000)). Der Transkriptionsfaktor *GAL4* wurde in zwei funktionelle Untereinheiten, der DNA-Bindedomäne und der Aktivierungsdomäne zerteilt und diese in Vektoren eingebaut: der pAct2PD trägt die Aktivierungsdomäne während der pLexPD die DNA-Bindedomäne trägt. Zudem besitzt der pAct2PD-Vektor das *LEU2*-Gen zur Synthese von Leucin, der pLex-Vektor das *TRP1*-Gen zur Herstellung von Tryptophan. In diese Vektoren werden die zu untersuchenden cDNA-Fragmente, kodierend für die putativen Interaktionspartner, kloniert und in den Hefestamm L40 cotransformiert. Dieser Hefestamm ist Leucin-, Tryptophan- und Histidin-auxotroph. Zudem trägt dieser Hefestamm die Reportergene *lacZ* und *HIS3*, beide unter Kontrolle eines *GAL4*-sensitiven Promotors. Können die zu untersuchenden Proteine in den Hefen miteinander wechselwirken, so bringt diese Interaktion die beiden Untereinheiten des *GAL4*-Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe und sodass sie eine funktionelle Einheit bilden. Die Reportergene unter Kontrolle des *GAL4*-sensitiven Promotors werden abgeschrieben und die Translationsprodukte können nachgewiesen werden.

## 2.8.1 Transformation in L40

### 2.8.1.1 Prätransformation

Plasmidfreie L40-Hefen wurden über Nacht bei 30 °C in YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*, siehe Tab. 2.1) kultiviert. 1,5 ml der Kultur wurden pelletiert (5000 g, 5 min), in 500  $\mu$ l Transformationsmischung (s. u.) resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von 50  $\mu$ l DMSO wurden die Hefen einem Hitzeschock von 12 min bei 42 °C (Wasserbad) ausgesetzt, pelletiert, mit Wasser gewaschen und in 1 ml YPD-Medium für 1 h bei 30 °C geschüttelt. Die Hefen wurden erneut mit Wasser gewaschen, in 80  $\mu$ l TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen und auf entsprechende Selektionsmedien, DOB-L für pACT2, DOB-W für pLexPd, ausplattiert (*DOB = drop out base*). Nach 3–5 Tagen bei 30 °C wurden transformierte Kolonien sichtbar.

Transformationsmischung: 33,3 % (w/v) PEG-4000, 0,1 M LiAcetat, 200  $\mu$ g/ml ssDNA,  
2  $\mu$ g/ml Plasmid-DNA in TE-Puffer  
TE (10-fach): 100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5

### 2.8.1.2 Cotransformation gezielter Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente

Für die Cotransformation wurde eine prätransformierte L40 Kolonie in 50 ml Selektionsmedium (DOB-W) inokuliert und 12–20 h bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt, eine entsprechende Menge Kultur pelletiert und in 300 ml YPD resuspendiert, so dass eine Zelldichte von ca.  $5 \cdot 10^6$  /ml erreicht wurde. Die Hefen wurden bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^7$  /ml kultiviert (ca. 3–4 h), pelletiert und mit Wasser gewaschen.

Für gezielte Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente wurde das Pellet in 1,5 ml 100 mM LiAcetat aufgenommen. 100  $\mu$ l der Hefesuspension wurde zu 0,1 mg ssDNA und 0,1  $\mu$ g Plasmid-DNA gegeben und 600  $\mu$ l sterile PEG/LiAc-Lösung zugefügt. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C im Schüttler wurden 70  $\mu$ l DMSO hinzu gegeben und durch Schwenken vorsichtig gemischt. Danach erfolgte ein fünfzehn minütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, mit Wasser gewaschen und in 1 ml YPD resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 30 °C im Schüttler wurden die Hefen erneut

zentrifugiert und gewaschen. Das Pellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  sterilem TE resuspendiert auf entsprechende Selektionsplatten (DOB-LW) ausplattiert. Nach 5–7 Tagen bei 30 °C wurden cotransformierte Kolonien sichtbar.

## 2.8.2 Selektion auf Aminosäuremangelmedien

Die Abwesenheit von Leucin bzw. Tryptophan im Medium (DOB-L/DOB-W) wurde benutzt, um auf Transformation mit pACT2 bzw. pLexPd zu selektieren. Cotransformierte Hefen wurden auf DOB-LW selektiert.

## 2.8.3 Test auf Interaktion

### 2.8.3.1 Test auf Histidinauxotrophie

Cotransformierte Hefekolonien wurden zum Nachweis der Aktivierung des HIS3-Gens (Reportergenaktivierung) auf einer Dreifachselektionsplatte ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (DOB-LWH) ausgestrichen und diese bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Interagierten die zwei zu untersuchenden Bindungspartner, wuchsen die Hefen zu deutlich sichtbaren Kolonien heran.

### 2.8.3.2 Nachweis der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

Der Nachweis von  $\beta$ -Galaktosidase, dem Genprodukt des lacZ-Gens, dient als ein weiterer Hinweis auf Interaktion. Hierzu wurden 4–6 Hefekolonien auf eine Nitrozellulosemembran auf einer geeigneten Selektionsplatte überimpft und mehrere Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert bis die Hefekolonien eine geeignete Größe (Durchmesser >2 mm) hatten. Durch wiederholtes Eintauchen der Membran in flüssigen Stickstoff und anschließendes Auftauen wurden die Hefezellen lysiert. Danach wurde die Membran auf ein mit X-Gal-Färbelösung (s. u.) getränktes Filterpapier gelegt und bei 37 °C inkubiert. Bei Aktivierung des lacZ-Reportergens wurde die Blaufärbung nach 0,5–4 h sichtbar.

X-Gal-Färbelösung: 30  $\mu\text{l}$   $\beta$ -ME, 170  $\mu\text{l}$  X-Gal (50 mg/ml in DMF), 10 ml Z-Puffer  
Z-Puffer: 60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , pH 7,0

## 2.9 Biochemische Methoden

### 2.9.1 Proteinexpression in Bakterien

Für die Proteinexpressionen in Bakterien wurden modifizierte pET-Expressionsvektoren (Stratagene) verwendet (siehe Tabelle 2.5). Von mit pET-Plamiden transformierten Bakterien des Stammes *E. coli BL21 Codon Plus* oder alternativ *E. coli BL21(DE3)C43* wurden zunächst Übernachtskulturen angeimpft. Die Überprüfung auf Expression des rekombinanten Proteins erfolgte mit einer Mini-Expressionsanalyse (siehe 2.9.1.1).

#### 2.9.1.1 Mini-Expressionsanalyse

Von einer Übernachtskultur wurde 1 ml zu 4 ml frischem LB-Medium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, gegeben und eine Stunde bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Der Rest der Übernachtskultur wurde bei 4 °C gelagert. Zur Kontrolle (Negativkontrolle: vor Induktion der Proteinexpression) wurden 500 µl entnommen, abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (s. u.) resuspendiert. Die Proteinexpression wurde mit 0,02 mM Isopropyl-Thio-β-D-Galaktopyranosid (IPTG) induziert. Nach 2–3 Stunden wurde ein Aliquot von 1 ml zur Kontrolle (Positivkontrolle: nach Induktion der Proteinexpression) entnommen, zentrifugiert und anschließend in 100 µl zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer resuspendiert.

Die Kontrollproben wurden mit einem Ultraschallstab (UP100, Hielscher) sonifiziert (3 sec, 100 W) und 2 min bei 95°C denaturiert. Von beiden Kontrollproben wurden jeweils 3 µl mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (siehe 2.9.5). Bei erfolgreicher Expression wurde der Rest der Übernachtskultur dafür genutzt eine Expression im großen Maßstab durchzuführen (siehe 2.9.1.2) und einen Glycerolstock anzulegen (siehe 2.7.10).

SDS-Probenpuffer (5-fach): 5 mM EDTA, 30 % Glycerol, 60 mM Tris/HCl, 15 % SDS, 7,5 % β-ME, 0,1 % Bromphenolblau, pH 6,8

#### 2.9.1.2 Proteinexpression im größeren Maßstab

1 ml einer Übernachtskultur wurde in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und die Bakterien bis zu einer optischen Dichte von 0,6–0,8

(gemessen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600$  nm) bei 37 °C und 175 rpm in einem 500 ml Rundkolben im Schüttelinkubator herangezogen. Eine Negativkontrolle wurde wie oben genannt entnommen. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte, abhängig vom Protein, bei 20–37 °C. Nach 2–4 Stunden wurde eine Positivkontrolle entnommen und die Bakterienkultur bei 4500 rpm für 15 min bei 4 °C sedimentiert (Labofuge 400R, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

## 2.9.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien

Soweit nicht anders vermerkt, erfolgten alle nachfolgenden Schritte bei 4 °C.

### 2.9.2.1 Aufreinigung unter Verwendung des His6-Tags

Die Reinigung erfolgte mit Hilfe des *QiaExpressionist-Kits* (Qiagen) unter nativen Bedingungen. Das Bakterienpellet wurde aufgetaut (15 min), in 4 ml Lysispuffer (s. u.) resuspendiert und 30 min lysiert. Nach mehrfacher Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschallstab (UP100, Hielscher) für je etwa 10 sec bei 100 W zur Zerstörung der genomischen DNA, wurden unlösliche Bestandteile bei 4500 rpm für 45 min sedimentiert (Labofuge 400R, Heraeus). Der Überstand wurde in einem 15 ml Falcon mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Agarosekügelchen drei Mal mit 5 ml Waschpuffer (s. u.) gewaschen und gebundenes Protein mit 4x 500  $\mu$ l Elutionspuffer (s. u.) fraktionsweise über eine Leersäule (Mini columns, Evergreen Scientific) eluiert.

Als Schnelltest des Proteingehalts wurde von jeder Fraktion 1  $\mu$ l auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher&Schuell) gespottet und diese Ponceau-Rot gefärbt. Die Fraktionen mit den höchsten Proteingehalten wurden zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Der Erfolg der Reinigung wurde zudem mittels SDS-PAGE (siehe 2.9.5) überprüft, wozu jeweils 4  $\mu$ l der Elutionsfraktion versetzt mit 1  $\mu$ l 5-fach SDS-Probenpuffer aufgetragen wurden.

Ni-NTA-Lysispuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mg/ml Lysozym, pH 8,0
Ni-NTA-Waschpuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Ni-NTA-Elutionspuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

### 2.9.2.2 Aufreinigung unter Verwendung des GST-Tags

Zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgt die Lyse und Ultraschallbehandlung von Bakterienpellets wie unter 2.9.2.1 beschrieben (Lysispuffer s. u.). Vor der Zentrifugation wurde Triton X-100 zugegeben (Endkonzentration 1 %). Die lösliche Proteinfraction wurde mit 500  $\mu$ l GSH-Agarose (*Glutathione-Uniflow Resin*, Clontech) 1 h unter Schwenken inkubiert, dreimal mit 5 ml PBS gewaschen und gebundenes Protein mit 6x 250  $\mu$ l frisch angesetztem Elutionspuffer (s. u.) eluiert. Der Schnelltest zur Bestimmung der Fraktionen mit den höchsten Proteingehalten wurde wie in 2.9.2.1 beschrieben durchgeführt. Auch hier wurde der Erfolg der Reinigung mittels SDS-PAGE (siehe 2.9.5) überprüft.

GST-Lysispuffer:	1 mg/ml Lysozym in PBS
GST-Elutionspuffer:	5 mM GSH, 50 mM Tris/HCl, Proteaseinhibitoren, pH 8,0
PBS:	0,14 M NaCl, 3 mM KCl, 2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4

## 2.9.3 Herstellung von Zell- und Gewebeextrakten

### 2.9.3.1 SDS-Totalextrakte

Gefrorene Gewebeproben (Biopsiematerial) wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser pulverisiert und in SDS-Probenpuffer (2-fach, vorgewärmt auf 65 °C) aufgenommen.

Kultivierte Zellen wurden zweifach mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen nach Zugabe von vorgewärmten SDS-Probenpuffer (2-fach) mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst.

Anschließend wurde in beiden Fällen die Proben 15 min bei 65 °C inkubiert, mit einem Ultraschallstab (UP100, Hielscher) sonifiziert (10 sec, 100 W) und unlösliche Anteile durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min (Biofuge pico, Heraeus) abgetrennt. Die Extrakte wurden bei -20 °C gelagert.

## 2.9.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde das *Protein Assay Kit* (Bio-rad) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteine wurden in PBS verdünnt, mit Bradford-Reagenz (BioRad) versetzt und nach 5 min die OD bei 595 nm im ELISA-Reader (EL800, Bio-Tek Instruments) bestimmt. Als Kalibrierstandards dienten Verdünnungen von  $\gamma$ -Globulin in PBS (0–200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die ermittelten Extinktionswerte der Kalibrierstandards wurden mittels linearer Regression zur Erstellung einer Eichgeraden im Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft) benutzt. Zur Verringerung von Pipettierfehlern wurden routinemäßig Dreifachbestimmungen durchgeführt.

## 2.9.5 Gelelektrophorese: SDS-PAGE nach Laemmli

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-System (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Dazu wurden diskontinuierliche Gele (Trenngele 8 bis 14 % Polyacrylamid (PAA) (Roth), Sammelgel 3 % Polyacrylamid) verwendet. Die Protein-Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,25 Volumina 5-fach SDS-Probenpuffer versetzt und 2 min bei 95 °C denaturiert. Nach spannungskonstantem Lauf (100 V–200 V) wurden die Gele mit Coomassie G250 (Serva, Heidelberg) gefärbt oder die Proteine wie unter 2.9.6 auf Nitrozellulosemembranen transferiert.

PAA für Trenngele:	30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)
PAA für Sammelgele:	30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (19:1)
Trenngel-Puffer:	375 mM Tris/HCl, 0,2 % SDS, pH 8,8
Sammelgel-Puffer:	125 mM Tris/HCl, 0,2 % SDS, pH 6,8
Laemmli-Puffer:	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,8
Coomassie-Färbelösung:	0,1 % Coomassie G250, 50 % (v/v) Methanol, 20 % (v/v) Essigsäure
Entfärber:	10 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure



## 2.9.6 Proteintransfer

### 2.9.6.1 Semidry-Methode

Der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher&Schuell) im Semidry-Verfahren (Towbin *et al.* (1979)) erfolgte zwischen mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren (Whatman, Roth; 20 % (v/v) Methanol in Laemmlipuffer) 90 min lang bei 1 mA pro  $cm^2$  Gel. Die Überprüfung der Effizienz des Transfers erfolgte durch Färbung mit Ponceau-Rot (s. u.).

### 2.9.6.2 Tankblot-Methode

Für einen besonders effizienten Transfer und für anschließende Quantifizierungen am *Odyssey® Infrared Imaging System* (LI-COR) (> 100 kD) wurde ein Tankblotpuffer-System (s. u.) bei 4 °C verwendet. Die Stromstärke und Transferdauer wurden an die Proteingröße angepasst (z. B. 3 h bei 300 mA für Proteine bis zu 100 kD sowie über Nacht bei 250 mA für größere Proteine).

Ponceau-Rot-Färbelösung: 0,1 % (w/v) Ponceau-Rot, 3 % (w/v) Trichloressigsäure  
Tankblotpuffer: 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 192 mM Glycin, 0,01 % SDS

## 2.9.7 Immundetektion

Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembranen zunächst etwa 1 h mit Magermilchpulver blockiert (4 % (w/v) in TBST, Roth). Nach Inkubation mit primärem Antikörper (verdünnt in Blockierlösung oder TBST; RT 1 h oder 4 °C über Nacht) wurde mehrfach mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT mit adäquater Sekundärantikörperlösung inkubiert, wobei zumeist Meerrettichperoxidase-Konjugate (*horse-raddish peroxidase* HRPO) verdünnt in TBST Anwendung fanden. Nach weiterem Waschen wurde die konjugierte Peroxidase durch Chemilumineszenz (*enhanced chemiluminescence* ECL) detektiert. Verwendet wurde das SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology Inc., USA) nach Angaben des Herstellers. Die Membran wurde mit frisch angesetzter ECL-Lösung benetzt, 5 min inkubiert und mit einer Folie umschlossen. Dann wurde die Membran in

einer Dunkelkammer auf einem Röntgen-Film (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, England oder RP New, CEA; Hamburg, Deutschland) exponiert. Die Dauer wurde durch eine Probelichtung von 1 min abgeschätzt. Der belichtete Film wurde anschließend mit Hilfe einer Entwicklermaschine (Curix, Agfa) entwickelt und zur Dokumentation eingescannt.

Für Quantifizierungen von Proteinmengen sowie zur simultanen Detektion zweier Proteine wurde der Blot mit Infrarot-Fluorophor (*IRDye*® *Infrared Dyes*) gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert, wie oben beschrieben gewaschen und anschließend am *Odyssey*® *Infrared Imaging System* (LI-COR) eingelesen. Zur Auswertung wurde die Software *Odyssey Version 3.0.16* verwendet.

TBST: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,9

### 2.9.8 Western Blot-Overlay-Experimente

Für Western Blot-Overlay-Experimente wurden die zu untersuchenden Proteine (etwa 5  $\mu\text{g}$ ) durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.9.5) und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe Abschnitt 2.9.6).

Nach Blockierung mit Magermilchpulver für etwa 1 h bei RT (siehe Abschnitt 2.9.7) wurden die Membranen mit dem potentiellen Bindungspartner, vorliegend als gereinigtes rekombinantes Protein (20-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS mit 4 % Milchpulver), über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert, anschließend die Membranstreifen dreifach mit TBST gewaschen und gebundenes Protein über den durch den jeweiligen Vektor vermittelten Immunotag (siehe Tabelle 2.5) nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.9.7).

### 2.9.9 Dotblot-Overlay-Experimente

Für Dotblot-Overlay-Experimente wurden 1  $\mu\text{l}$  des zu untersuchenden Proteine (etwa 5  $\mu\text{g}$ ) auf eine Nitrozellulosemembran gespottet.

Nach Blockierung mit Magermilchpulver für etwa 1 h bei RT wurde die Membran mit dem potentiellen Bindungspartner, vorliegend als gereinigtes rekombinantes Protein (20-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS mit 4 % Milchpulver), über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln

inkubiert, anschließend wurden die Membranstreifen dreifach mit TBST gewaschen und gebundenes Protein über den Immunotag (siehe Tabelle 2.5) nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.9.7).

### 2.9.10 Coimmunpräzipitation

Für Coimmunpräzipitationsexperimente wurden rekombinant exprimierte Proteine (je 1-10  $\mu\text{g}$ ) und Antikörper (ca. 1  $\mu\text{g}$ ) in IP-Puffer (s. u.) gemischt und bei 4 °C 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  Protein-G gekoppelten magnetischen Kügelchen (Dynabeads, Dynal Biotech, Hamburg) wurde weitere 30 min bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. In einem Magnetständer wurden die Proben anschließend dreifach mit Waschpuffer-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine mit 20  $\mu\text{l}$  2-fachem SDS-Probenpuffer eluiert.

IP-Puffer: 1 % BSA, 0,05 % Triton X-100, Proteaseinhibitoren in PBS  
 Wasch-Puffer: 0,05 % Triton X-100 in PBS

### 2.9.11 *in vitro* Phosphorylierungen

Die Kinasen, die für *in vitro* Phosphorylierungen zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 2.8 zusammengefasst.

Tabelle 2.8: Proteinkinasen

Kinase	Menge	Hersteller
MAPK1 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1)	21 ng	Invitrogen, Karlsruhe
PKA (cAMP-abhängige Kinase)	37 ng	Invitrogen, Karlsruhe
PKC $\alpha$ (Proteinkinase C $\alpha$ )	11 ng	Invitrogen, Karlsruhe

Für *in vitro* Phosphorylierungen wurden in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  5  $\mu\text{g}$  rekombinantes, gereinigtes Myopodinfragment und die zu untersuchende Kinase (siehe Tabelle 2.8) in dem entsprechenden Kinasepuffer (s. u.) versetzt mit Proteaseinhibitoren und in Gegenwart von 1  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ]ATP für 45 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7  $\mu\text{l}$  5x SDS-Probenpuffer und anschließender Denaturierung bei 95 °C für 2 min abgestoppt. Nach elektrophoretischer Auftrennung via SDS-PAGE und anschließendem Semidry-Blotten wurde der Marker mit [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ]ATP markiert und die

Membran für 20 bis 60 Stunden autoradiographiert. Die Auswertung erfolgte mit dem *Cyclone Storage Phosphor Screen* (Packard, USA) und der Software „OptiQuant“. Zur Kontrolle wurde auf diesem Blot nachträglich das eingesetzte Myopodinfragment über dessen T7-Immunotag nachgewiesen.

5x MAPK1-Puffer:	250 mM Tris/HCl (pH7,4), 10 mM DTT, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 0,5 mM ATP, 1,25 µg/ml Pepstatin A
5x PKA-Puffer:	100 mM Tris/HCl (pH7,4), 25 mM DTT, 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> , 2,5 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 0,5 mM ATP, 1,25 µg/ml Pepstatin A, 0,05 mM cAMP
5x PKCα-Puffer:	100 mM Tris/HCl (pH7,4), 25 mM DTT, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 2,5 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 0,5 mM ATP, 1,25 µg/ml Pepstatin A, 0,4 mg/ml Phosphatidyl-Serin, 20 µg/ml PMA

## 2.9.12 Surface Acoustic Wave (SAW) Messungen

### 2.9.12.1 Geräte und Versuchsaufbau

Die Messung der Bindungsstärke zweier Proteine erfolgte durch Surface Acoustic Wave (akustische Oberflächenwellen) Messungen. Diese Arbeiten wurden in der AG Bendas am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Bonn durchgeführt. Der in dieser Arbeit verwendete akustische Oberflächenwellensensor S-Sens<sup>®</sup> K5 wird von der Biosensor GmbH in Bonn hergestellt. Die zentrale Messeinheit besteht aus einem kompakten Chip-Lesegerät, in das Quarzsensoren in einer Mikroflussszelle eingebaut werden können. Die Mikroflussszelle unterteilt die goldbeschichtete Quarzoberfläche in fünf Messkammern, durch die ein Pufferfluss mäanderförmig durchgeleitet wird. Bindungsereignisse können in jeder einzelnen Messkammer unabhängig voneinander und in Echtzeit detektiert werden. Jede Messkammer hat eine aktive Sensoroberfläche von 6 mm<sup>2</sup> und ein Volumen von 4 µl. Als Detektionsgrenze gibt der Hersteller 0,8 pg/mm<sup>2</sup> an. Die Messeinheit wird durch ein Peltier-Element mit einer Genauigkeit von 0,001 K temperiert. Konstante laminare Flussbedingungen über die Sensoroberfläche werden durch eine Gewinde-Kolbenpumpe gewährleistet. Die Probenzuführung erfolgt durch einen HPLC-Autosampler. Durch eine entsprechende elektronische Schaltung können die Änderungen von Phase und Amplitude einer akustischen Oberflächenwelle (hier einer Love-Welle) detektiert werden, die sich innerhalb der Führungsschicht aus Siliziumdioxid bewegt. Hier wurden die Phasen-

veränderungen, verursacht durch Masseauflagerungen auf der Oberfläche des Sensors, detektiert und zur Bestimmung der Bindungsstärke ausgewertet.

Die verwendeten Quarzsensoren des S-Sens<sup>®</sup> K5-Biosensors werden unter Reinraumbedingungen (Biosensor GmbH, Bonn) hergestellt. Das genaue Herstellungsprotokoll kann bei Schlensog *et al.* (2004) nachgelesen werden. Vor jedem Versuch wird die Funktionalität der Quarzsensoren durch Aufnahme eines Schwingungsspektrums im Frequenzbereich von 142-154 MHz überprüft. Anhand dieser Messung wird auch die optimale Schwingfrequenz der Führungsschicht zur Ausbildung der Love-Scherwelle bestimmt.

### 2.9.12.2 Immobilisierung von Proteinen am Biosensor

Die Immobilisierung von Proteinen auf der Sensoroberfläche wurde mit EDC/NHS erreicht. Zunächst wurde der Quarz mit 11-Mercaptoundecansäure (MUA) beschichtet. Die Anlagerung von MUA erfolgt spontan (*Self-Assembling* von Thiolgruppen an Gold) während einer Inkubation in 10 ml Mercaptoundecansäure-Lösung (s. u.) über Nacht. Anschließend werden die Goldsensoren in 10 ml Ethanol für 5 min im Ultraschallbad sonifiziert. Der MUA-beschichtete Quarz wird in den S-Sens<sup>®</sup> K5-Biosensor eingebaut und mit entgastem Wasser bei einer Flussrate von 40  $\mu\text{l}/\text{min}$  äquilibriert. Die Immobilisierung erfolgte mit Wasser als Flussmittel bei einer Flussrate von 40  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Reihenfolge der Reagenzien für die Immobilisierung sind der Tabelle 2.9 zu entnehmen.

11-Mercaptoundecansäurelösung (MUA):	2 M 11-Mercaptoundecansäure in Ethanol
Phosphatpuffer nach Sörensen Lösung A:	
Phosphatpuffer nach Sörensen Lösung B:	
Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,4:	18,2 ml Lösung A und 81,8 ml Lösung B
EDC-Lösung:	0,4 M in Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,4
NHS-Lösung:	0,1 M in Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,4
Ammoniumacetatlösung:	10 M in Wasser
Ethanolamin:	1 M in Wasser, pH 8,5

### 2.9.12.3 Messung der Bindungsstärke

Der putative Bindungspartner, verdünnt in PBS zur Verhinderung von Phasenverschiebungen aufgrund eines Pufferwechsels, wird in der mobilen Phase über die immobilisierte Schicht gespült. Die Proben werden in den Autosampler eingestellt und mithilfe der Software *SequenceMaster6* wird eine Injektionsabfolge mit aufsteigenden Konzentrationen

Tabelle 2.9: Immobilisierung von Proteinen auf der Sensoroberfläche

Reagenz	Volumen/Zeit	Effekt
EDC/NHS-Lösung (1:1)	120 $\mu$ l	Aktivierung der Carboxylgruppen der MUA
Wasser	5 min	Waschen
Proteinlösung	20 $\mu$ g/300 $\mu$ l für 5 min	Immobilisierung des Proteins
Wasser	5 min	Waschen
Ethanolamin/ Ammoniumacetat (1:1)	120 $\mu$ l	Absättigung von Carboxylgruppen, die keine Proteinbindung eingegangen sind
Wasser	5 min	Waschen
5% Glycerollösung	80 $\mu$ l	Bestimmung von Viskoelastizitätseffekten
PBS		Umpuffern für die Messung

erstellt. Kommt es zu Wechselwirkungen in Form nichtkovalenter Bindungen zwischen Molekülen der mobilen Phase und dem an der Goldoberfläche immobilisierten Protein, so können diese über das schon beschriebene Messprinzip detektiert werden. Zunächst wird eine Messung zur Ermittlung des relevanten Konzentrationsbereichs durchgeführt. Hierzu wird ein Konzentrationsspektrum von  $10^{-10}$  bis  $10^{-4}$  M des mobilen Proteins eingesetzt. Aus den Ergebnissen dieses Experiments kann ein Konzentrationsbereich herausgefiltert werden, der eine ausreichende Bindung des Proteins, aber wenig unspezifische Bindung zeigt. Für diesen Bereich werden dann mehrere Konzentrationen vermessen.

#### 2.9.12.4 Auswertung der SAW-Messungen

Die SAW-Technik bietet nicht nur die Möglichkeit, die Affinität zweier Proteine als Änderung der Masse zu detektieren und somit eine Aussage über das Gesamtausmaß der Bindung zu treffen, sie ermöglicht es darüber hinaus, den zeitlichen Verlauf dieser Interaktion zu verfolgen und aus den erhobenen Daten Bindungskonstanten für die jeweilige Interaktion zu bestimmen. Durch die Vermessung von Konzentrationsreihen können Bindungsereignisse in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten vermessen werden. Nicht-lineare Kurvenregression ermöglicht die Anpassung des tatsächlichen Kurvenverlaufs an idealisierte Bindungskurven aus mathematischen Modellen. Für die Auswertung der hier durchgeführten Messungen fand das 1:1 Bindungsmodell mit Residual-

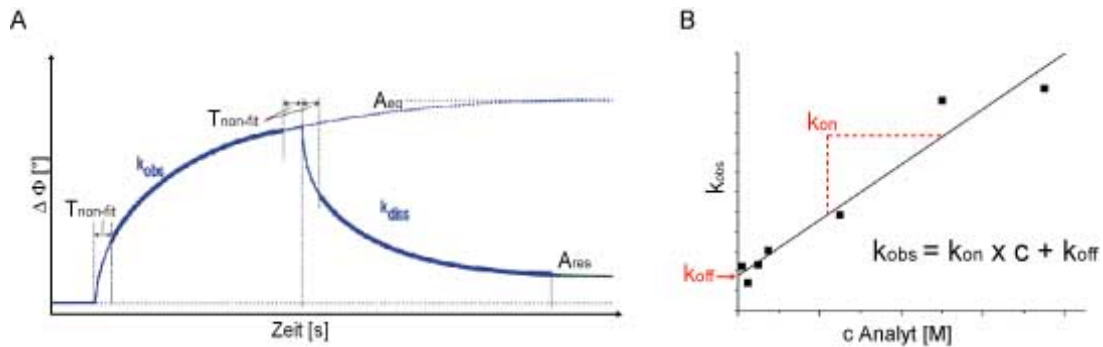


Abbildung 2.1: **Modell zur Errechnung kinetischer Bindungskonstanten aus einem SAW-Experiment.** A: Gezeigt ist ein einfaches 1:1-Bindungsmodell mit Residualberücksichtigung.  $k_{obs}$  ist die Assoziationskonstante bei einer bestimmten Konzentration,  $k_{Diss}$  die Dissoziationskonstante.  $A_{eq}$  ist die Phasenverschiebung, die durch Bindung des Analyten im Gleichgewichtszustand erreicht würde,  $A_{res}$  ist die Phasenverschiebung, die nach Dissoziation des Analyten verbleibt, da nicht alle Moleküle im Verlauf des Experiments dissoziieren.  $T_{non-fit}$  sind Bereiche der Bindungskurve, die im Modell nicht einbezogen werden, um Einfüsse wie Pufferwechsel oder Pumpenschalten nicht mit zu berechnen. B: Lineare Regression zur Ermittlung von  $k_{Ass}$  und  $k_{Diss}$ .

berücksichtigung Anwendung, das Vorgänge beschreibt, bei dem der Analyt nicht während der Versuchszeit komplett wieder von der Oberfläche des Sensors dissoziiert, sondern zu einem gewissen Anteil dort verbleibt (Abb. 2.1, A). Aus dieser nichtlinearen Regression kann der  $k_{obs}$ -Wert, also die Assoziationskonstante einer bestimmten Konzentration, ermittelt werden.  $k_{obs}$  steht in einer linearen Abhängigkeit zur Konzentration des Analyten (Abb. 2.1, B). Die lineare Regression der Auftragung der ermittelten  $k_{obs}$ -Werte gegen die eingesetzten Konzentrationen des Analyten führt zu einer Geradengleichung, die die Berechnung von den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{Ass}$  und  $k_{Diss}$  ermöglicht:

$$k_{obs} = k_{Ass} \times c + k_{Diss}$$

Aus diesen beiden Geschwindigkeitskonstanten lässt sich schließlich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  berechnen:

$$K_D = \frac{k_{Ass}}{k_{Diss}}$$

### 2.9.13 Aktinbindungassays

Zur Untersuchung der Aktinbindungseigenschaften wurden *high-speed-Cosedimentationen* zur Charakterisierung der Bindung an F-Aktin und *low speed Cosedimentationen* zum Nachweis von Aktinbündelungsaktivitäten durchgeführt. Das für diese Anwendungen eingesetzte G-Aktin wurde aus Hühnerbrustmuskeln isoliert.

### 2.9.14 G-Aktin-Präparation

#### Herstellung von Acetonpuder

500 g gehackter Hühnerbrustmuskel wurden mit 1,5 l eiskaltem Hochsalz-Extraktionspuffer (s. u.) gemischt. Nach Zugabe von 1,5 l eiskaltem Wasser wurde das Hühnerfleisch homogenisiert und bei 3500 g und 4 °C für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 Vol Waschpuffer (s. u.) und 0,5 Vol Wasser erneut homogenisiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in eiskaltem Wasser homogenisiert und abzentrifugiert. Auch dieser Waschschrift wurde mehrfach wiederholt, wobei die letzte Zentrifugation auf 30 min ausgedehnt wurde. Zur Entfernung des Wassers wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 3 Vol eiskaltem Aceton versetzt, homogenisiert und anschließend zentrifugiert, wobei dies dreimal wiederholt wurde. Abschließend wurde das Pellet nochmals in eiskaltem Aceton homogenisiert. Das Aceton wurde über eine Vakuumpumpe, Fritte und Filterpapier vom Pellet abgetrennt und verworfen. Das Pellet wurde zerkleinert und zur weiteren Trocknung über Nacht auf Filterpapier ausgelegt. Der fertige, neben Aktin auch diverse Aktin-bindende Proteine wie Tropomyosin und  $\alpha$ -Aktinin enthaltende Acetonpuder wurde bei -20 °C gelagert.

Hochsalz-Extraktionspuffer: 300 mM KCl, 150 mM KHPO<sub>4</sub>, 20 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
1 mM ATP, pH 6,5

Waschpuffer: 40 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,5 mM EGTA,  
10 mM Imidazol, 10 mM TRIS, pH 6,5

#### Präparation von G-Aktin aus Acetonpuder

Es wurden 1 g Acetonpuder in 50 ml eiskaltem G-Aktin-Puffer (s. u.) für 30 min bei 4 °C vermischt. Der Ansatz wurde anschließend bei 100000 g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert und



der Überstand durch Glaswolle filtriert und das Volumen bestimmt. Zur Anreicherung von G-Aktin, wurde es einem Zyklus von Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation unterzogen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  (Endkonzentration 2 mM) und KCl (Endkonzentration 50 mM) induziert und für 45 min bei RT gerührt, bis die Lösung viskos wurde. Anschließend wurde dem Ansatz nochmals KCl zugesetzt (Endkonzentration 0,6 M) um das Tropomyosin vom F-Aktin zu lösen. Bei vorsichtigem Rühren wurde der Ansatz für 30 min bei 4 °C und auf Eis inkubiert. Das F-Aktin wurde durch eine Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 2 h bei 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde mit einem Spatel herausgekratzt und mit 20 ml G-Aktin-Puffer in einen Glashomogenisator überführt und homogenisiert. Die Suspension wurde für 3 Tage gegen 2 l G-Aktin-Puffer dialysiert, wobei das F-Aktin depolymerisierte. Der Dialysepuffer wurde jeden Tag erneuert. Bei anschließender Zentrifugation bei 100000 g für 2 h bei 4 °C wurde das restliche F-Aktin pelletiert, das gewünschte G-Aktin befand sich im Überstand. Die Konzentration wurde mittels Bradford-Bestimmung ermittelt.

G-Aktin-Puffer: 0,2 mM ATP, 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8.0

### 2.9.15 Aktin *high speed Cosedimentationsassays*

Der Aktin *high speed Cosedimentationsassay* erlaubt die Analyse von Proteinen bzw. Proteinfragmenten auf ihre mögliche F-Aktin bindenden Eigenschaften. Er folgt folgendem Prinzip: G-Aktin wird zunächst polymerisiert, anschließend wird das Protein von Interesse hinzugegeben und der Ansatz bei 100.000 g zentrifugiert. Hierbei wird das F-Aktin und alle gebundenen Proteine pelletiert, nicht gebundene Proteine befinden sich im Überstand. Die *high speed Cosedimentationsassays* wurden in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  angesetzt, wobei eine konstante Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  G-Aktin eingesetzt wurde.

Das G-Aktin wurde in einem Mastermix in Polymerisationspuffer (s. u.) für 45 min bei RT polymerisiert. In der Zwischenzeit wurde eine Konzentrationsreihe (0-10  $\mu\text{M}$  in 30  $\mu\text{l}$ ) des zu untersuchenden Proteins, welches zuvor gegen Polymerisationspuffer dialysiert wurde, angefertigt und in die Zentrifugenröhrchen (1,5 ml, Beckmann) vorgelegt. Das polymerisierte Aktin wurde hinzugegeben (Endkonzentration: 5  $\mu\text{M}$ , Endvolumen 100  $\mu\text{l}$ ), der

Ansatz gemischt und weitere 45 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 45 min und bei 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 25  $\mu$ l 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde vorsichtig einmal mit Polymerisationspuffer gespült und anschließend in 100  $\mu$ l Polymerisationspuffer resuspendiert und mit 25  $\mu$ l 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse der Pellet- und Überstand-Proben wurde durch eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte am *Odyssey® Infrared Imaging System* der Firma LI-COR und anschließender Bearbeitung mit Hilfe der Odyssey 3.0 Software. Hierbei wurden die Intensitäten der Banden bestimmt und ausgewertet. Die Bindung wurde schließlich durch die Auftragung des Quotienten aus gebundenem Protein(-fragment) und F-Aktin gegen die eingesetzte Gesamtkonzentration des Protein(-fragments) von Interesse analysiert. Diese Kurve sollte bei spezifischer Bindung den Verlauf einer Sättigungskurve zeigen. Mit einer nichtlinearen Regression mithilfe der Software *GraphPad Prism4* konnte so das molare Bindungsverhältnis des untersuchten Protein(-fragments) an F-Aktin bestimmt werden.  $B_{max}$ , der Grenzwert besagt somit, wie viele Proteinmoleküle an einem Aktinmolekül binden. Der ermittelte  $K_D$ -Wert entspricht der Konzentration des Protein(-fragments), bei der die halbmaximale Bindung erreicht wird und ist somit ein Maß für die Bindungsstärke.

Polymerisationspuffer: 2 mM ATP, 10 mM EGTA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M KCl,  
200 mM Imidazol, pH 7,5

### 2.9.16 Aktin *low speed Cosedimentationsassays*

Der Aktin *low speed Cosedimentationsassay* entspricht in Prinzip und Durchführung dem des Aktin *high speed Cosedimentationsassays*. Der Ansatz wird jedoch zur Sedimentation der Aktinbündel und den damit assoziierten Proteine nur bei 10.000 g zentrifugiert. Besitzt das eingesetzte Protein(-fragment) Aktin-bündelnde Eigenschaften, so sollte mit steigender Konzentration des Proteins auch steigende Mengen Aktin im Pellet detektiert werden. Zeitgleich muss die Aktinmenge im Überstand abnehmen. Die Quantifizierung erfolgte wiederum am *Odyssey® Infrared Imaging System* (LI-COR) und anschließender Bearbeitung mithilfe der Odyssey 3.0 Software. Zur Bestimmung der Aktinbündelungsaktivität

wurde der prozentuale Anteil an gebündeltem Aktin in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration des Protein(-fragments) analysiert.

## 2.10 Zellbiologische Methoden, Indirekte Immunfluoreszenz und Mikroskopie

### 2.10.1 Zellkultur

Standard-Zellkulturtechniken wie das Auftauen, Passagieren und Einfrieren wurden nach Freshney (2000) und den Empfehlungen der *European Collection of Animal Cell Culture (ECACC)* durchgeführt. Alle verwendeten Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Die verwendeten Kulturmedien sind in Tab. 2.10 angegeben.

Tabelle 2.10: Zellkulturmedien

Name	Zusammensetzung
Ptk2-Medium	15 % FCS (Sigma), 1 % Pen/Strep, 2 % Natriumpyruvat, 1 % NEAA in DMEM Glutamax
A7r5-Medium	10 % FCS (PAA), 1 % Pen/Strep, 2 % L-Glutamin in DMEM ohne Phenolrot
Hek293-Medium	10 % FCS (Gibco), 1 % Pen/Strep in DMEM Glutamax
C2/C2C12-Proliferationsmedium	15 % FCS (Sigma), 1 % Pen/Strep, 2 % Natriumpyruvat, 1 % NEAA in DMEM Glutamax
C2/C2C12-Differenzierungsmedium	2 % HS (Sigma), 1 % Pen/Strep, 1 % NEAA in DMEM Glutamax
Hskm-Proliferationsmedium	20 % FCS (Sigma), 1 % Pen/Strep, 20 µg/ml Dexamethason, 2 ng/ml HGF, 2 % Natriumpyruvat, 1 % NEAA in DMEM Glutamax
Hskm-Differenzierungsmedium	1 % Pen/Strep, Transferrin, Insulin in DMEM Glutamax

### 2.10.2 Kultivierung von Hskm- und C2/C2C12-Zellen

Humane Skelettmuskelzellen (Hskm-Zellen) und C2/C2C12-Mausmuskelzellen wurden in nährreichem Proliferationsmedium vermehrt und bei Bedarf durch Wechsel in nährstoffarmes Differenzierungsmedium zur Differenzierung angeregt (Medien siehe Tab. 2.10). Bei den C2-Zellen zeigte es sich, abhängig von der verwendeten Charge, am geeignetsten, die Differenzierung bei etwa 80 % oder bei 100 % Konfluenz zu beginnen. Vor dem Mediumwechsel wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Bei erfolgreicher Differenzierung konnte das Kontrahieren der C2/C2C12-Zellen am Tag 4 oder 5 beobachtet werden. Sollten die Zellen anschließend mikroskopiert werden, wurden sie auf Matrigelbeschichteten Deckgläschen herangezogen.

Die Hskm-Zellen wurden für 6-8 Tage differenziert, leider war die terminale Differenzierung der Hskm-Zellen nicht möglich, da sich reifere Myotuben vermutlich aufgrund von Kontraktionen von den Deckgläsern ablösten.

### 2.10.3 Transiente Transfektionen

Für transiente Transfektionen wurde das Transfektionsreagenz FuGene6 (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden bei 80 % Konfluenz transfiziert. Dazu wurde ein Gemisch aus 1  $\mu\text{g}$  der zu übertragenden DNA mit 3  $\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz in 100  $\mu\text{l}$  DMEM in das Kulturmedium gegeben. Nach 12–24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf Deckgläschen in 35 mm Kulturschalen herangezogen, für SDS-Totalextrakte wurden 6 oder 10 cm Schalen verwendet. Die Expressionsanalyse der gewünschten Proteine erfolgte 36–48 h nach Transfektion. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Deckgläschen mit Paraformaldehyd (siehe Abschnitt 2.10.4) oder Methanol-Aceton (siehe Abschnitt 2.10.5) fixiert und mit entsprechenden Antikörpern immungefärbt. Die Expressionskontrolle der Extrakte erfolgte über SDS-PAGE, anschließendem Proteintransfer und Immundetektion des jeweiligen Vektor-vermittelten Immunotags.

#### **2.10.4 Paraformaldehyd-Fixierung von Zellen**

Auf Deckgläsern kultivierte Zellen wurden zweifach mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit 4 (v/v) % Formaldehyd aus Paraformaldehyd in PBS 15 min bei RT fixiert. Für die Immunfärbung intrazellulärer Strukturen schloss sich nach dem Waschen mit PBS eine Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,5 (v/v) % Triton X-100 in PBS (10 min bei RT) an. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und schließlich direkt immungefärbt oder kurzfristig bei 4 °C gelagert.

#### **2.10.5 Methanol-Aceton-Fixierung von Zellen**

Auf Deckgläsern kultivierte Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen und mit einer Methanol-Aceton-Lösung (1:1) 3 min bei -20 °C fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen direkt immungefärbt oder kurzfristig bei 4 °C gelagert.

#### **2.10.6 Gefrierschnitte von Geweben**

Es wurden 5–10 µm dicke Kryoschnitte an einem Gefriermikrotom bei -20 °C angefertigt, diese auf Objektträger überführt, 30 min bei RT getrocknet und bis zur Fixierung bei -80 °C gelagert.

#### **2.10.7 Methanol-Aceton-Fixierung von Gefrierschnitten**

Kryoschnitte wurden 2 min in -20 °C kaltem Methanol und direkt anschließend 30 sec in -20 °C kaltem Aceton fixiert. Danach wurden die Schnitte kurz getrocknet und mit einem Fettstift („Liquid blocker“ Super PAP Pen, Science Services, München) umrandet. Anschließend wurden die Schnitte durch eine 10 minütige Inkubation in PBS rehydriert. Die weitere Immunfärbung erfolgte wie in Abschnitt 2.10.8 beschrieben in einer feuchten Kammer.

## 2.10.8 Indirekte Immunfluoreszenz

In der Regel wurden Doppelmarkierungen bzw. Dreifachmarkierungen durchgeführt. Die dazu verwendeten primären Antikörper sind in Tab. 2.4 zusammengefasst. Die Spezies- und z. T. auch Ig-Subklassen-spezifischen Sekundärantikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren, sind in Tab. 2.5 aufgelistet.

### 2.10.8.1 Indirekte Immunfluoreszenz von Zellen

Fixierte Zellen auf Deckgläsern wurden mit PBS gewaschen und für 30 min bei RT mit Blockierlösung (s. u.) abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in Arbeitslösung (s. u.), erfolgte für eine 1 h bei RT. Nach zweifachem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit geeigneten Sekundärantikörper-Konjugaten, verdünnt in Arbeitslösung (s. u.), für 1 h bei RT inkubiert, erneut gewaschen und mit Mowiol+NPG (s. u., Calbiochem, Heidelberg) eingebettet. Nach Trocknung über Nacht konnten die Präparate mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Nikon Eclipse TE-2000E oder Zeiss Axio Imager M1) analysiert werden.

### 2.10.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten

Kryoschnitte von Geweben wurden mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit Blockierlösung (s. u.) abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in Arbeitslösung (s. u.), erfolgte mindestens für 3 h bei 37 °C, über Nacht bei 4 °C. Nach dreifachem Waschen mit PBST wurden die Proben mit geeigneten Sekundärantikörper-Konjugaten, verdünnt in Arbeitslösung (s. u.), für mindestens 2 h bei RT inkubiert, erneut mehrfach mit PBST gewaschen und mit Mowiol+NPG (Calbiochem, Heidelberg) (s. u.) eingebettet. Nach Trocknung über Nacht konnten die Präparate mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops (LSM 510 oder 710, Zeiss) analysiert werden.

Blockierlösung	10 % NGS, 3 % BSA in PBS
Arbeitslösung	1 % BSA in PBS
PBST	0,5 % Tween in PBS
Mowiol+NPG:	10 % Mowiol 4-88, 25 % Glycerol, 0,1 M Tris/HCl, 0,4 % N-propyl-gallat, pH 8,5

### 2.10.9 Mikroskopische Auswertung

Im Institut für Zellbiologie existieren verschiedene Mikroskope, die zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen benutzt wurden. Färbungen von Zellen wurden zunächst an Epifluoreszenzmikroskopen (Nikon Eclipse TE-2000E oder Zeiss Axio Imager M1) dokumentiert und bei Bedarf zusätzlich mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 510 oder LSM 710, Zeiss) analysiert. Die Auswertung von Gewebeschnitten erfolgte aufgrund ihrer Dicke generell konfokal.

Tabelle 2.11: Epifluoreszenzmikroskope

Mikroskop	Objektive	Filter (EX/DM/BA)	Kamera
Nikon Eclipse TE-2000E	Plan Neo (20x/0,5)	UV-2E/C (340-380/400/435-485)	gekühlte, monochrome, CCD-Kamera
	Plan Neo (40x/0,6)	B-2E/C (465-495/505/515-555)	(1412AM-FW-TE,
	Plan Apo (60x/1,4 Öl)	G-2E/C (528-553/556/578-633)	DVC, Austin, USA)
	Plan Apo (100x/1,4 Öl)		
Zeiss Axio Imager M1	Pln N (10x/0,3)	(335-383/395/420-470)	monochrome
	Pln N (20x/0,5)	(450-490/495/500-550)	CCD-Kamera
	Pln N (63x/1,25 Öl)	(538-562/570/570-640)	Axiocam MRm
	Pln N (100x/1,3 Öl)	(540-580/585/593-668) (625-655/660/665-715)	D10ZNC

Tabelle 2.12: konfokale Laserscanningmikroskopie

<b>Mikroskop</b>	<b>Objektive</b>	<b>Laser</b>	<b>Detektion</b>
LSM 510	EC Plan-Neofluar	Argon Laser	META-Scanmodul
Carl Zeiss,	<i>(10x/0,3)</i>	458/488/514 nm	mit zwei
Jena	EC Plan-Neofluar	HeNe-Laser 543 nm	Einzeldetektoren und
	<i>(40x/1,3)</i> Oil	HeNe-Laser 633 nm	einem polychromatischen
	EC Plan-Apochromat		Multikanal-Detektor
	<i>(63x/1,4)</i> Oil		
LSM 710	EC Plan-Neofluar	Laserdiode 405 nm CW	Scanmodul mit
Carl Zeiss,	<i>(10x/0,3)</i> M27	Argon Laser Multiline	34 spektralen
Jena	EC Plan-Neofluar	458/488/514 nm	Detektions-
	<i>(40x/1,3)</i> Oil DIC M27	DPSS-Laser 561 nm	kanälen
	EC Plan-Apochromat	HeNe-Laser 594 nm	
	<i>(63x/1,4)</i> Oil DIC M27	HeNe-Laser 633 nm	Durchlichtdetektor
	$\alpha$ Plan-Apochromat		T-PMT
	<i>(100x/1,46)</i> Oil DIC M27		



# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Die genomische Struktur der Podine und daraus resultierende Isoformen

Die Podin-Proteinfamilie umfasst drei Mitglieder: Synaptopodin, Myopodin und Tritopodin, welche von den Genen *SYNPO*, *SYNPO2* und *SYNPO2L* kodiert werden. Alle Genprodukte unterliegen alternativen Spleißvorgängen aus denen unterschiedliche Isoformen resultieren. Synaptopodin wurde bereits ausführlich von Mundel *et al.* charakterisiert (siehe Abschnitt 1.3.1), weshalb sich der Fokus dieser Arbeit auf Myopodin und Tritopodin richtete.

#### 3.1.1 Alternative Spleißvorgänge und zwei Transkriptionsstarts resultieren in sechs putative Myopodinisformen

Das *SYNPO2*-Gen, welches für Myopodin kodiert, besteht aus sechs Exons, die durch Introns unterschiedlicher Länge getrennt sind. In der Literatur sind drei lange Myopodinisformen, Myopodin 1, 2 und 3, in dieser Arbeit a, b und c genannt, beschrieben (de Ganck *et al.*, 2008), die durch alternative Spleißvorgänge im 3'-Bereich entstehen. Außerdem beschrieben Lin *et al.* (2001) eine mRNA von 4,2 kb, welche aufgrund ihrer Größe keiner der vorhergesagten langen Myopodinvarianten entspricht. Zusätzlich gaben

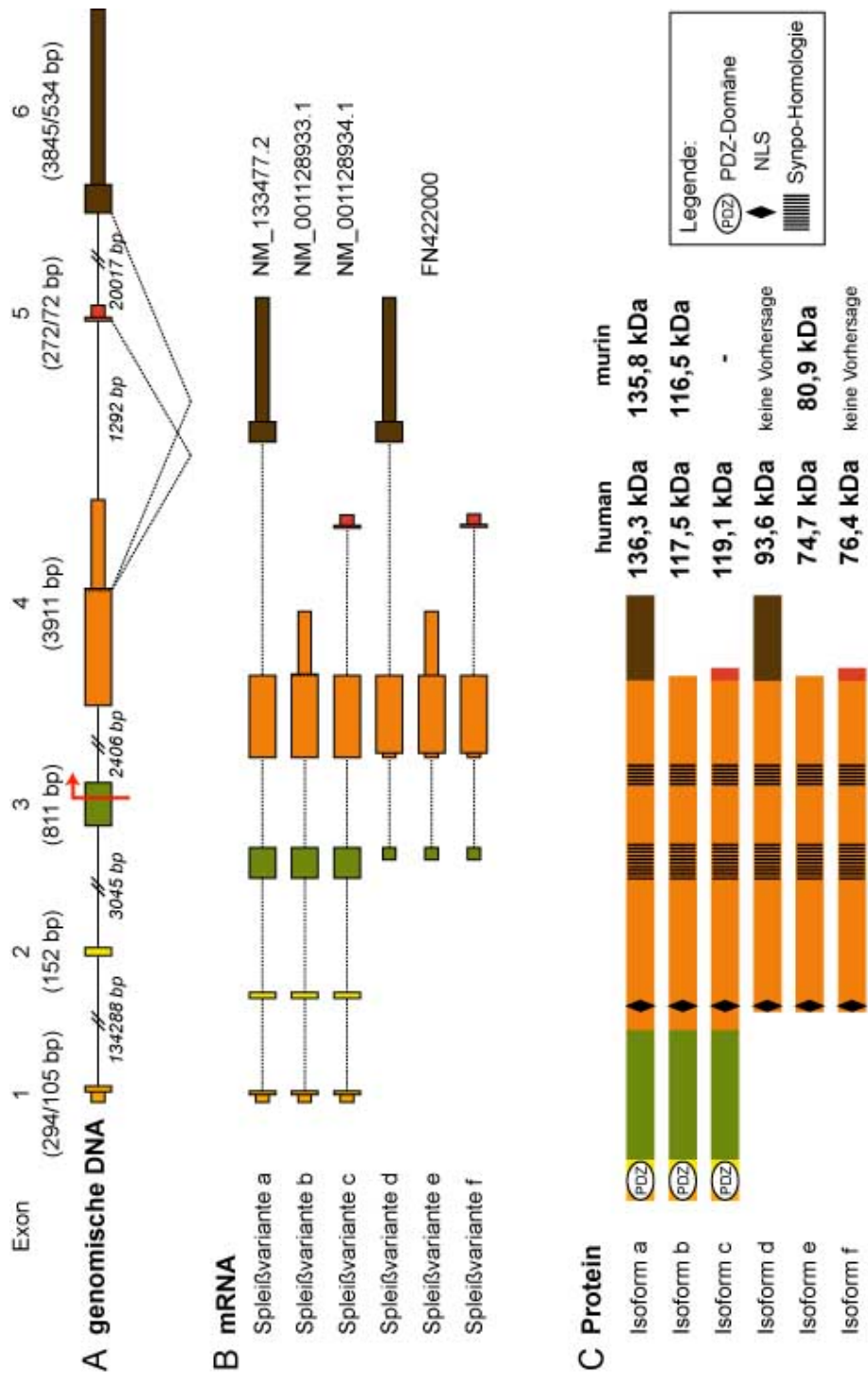


Abbildung 3.1: Organisation des humanen Myopodin-Gens (*SYNPO2*) und daraus resultierende Spleißvarianten bzw. Isoformen. A: Exon-Intron-Struktur der genomischen DNA. Die Exons sind als farbgefüllte Balken dargestellt, wobei translatierte Bereiche dicker veranschaulicht sind als nicht-translatierte. Die Introns sind als Linien gezeigt. Die Zahlen ober- bzw. unterhalb zeigen die Länge der Exons, bzw. Introns. Alternative Spleißvorgänge sind durch punktierte Linien verdeutlicht. Der rote Pfeil markiert den alternativen Transkriptionsstart in Exon 3. B: mRNA-Varianten mit entsprechenden Referenzsequenzen, die aus den oben gezeigten Spleißvorgängen, sowie aus dem alternativen Transkriptionsstart resultieren. C: Protein-Isoformen mit den aus der Aminosäurezusammensetzung berechneten molekularen Massen für humanes und murines Myopodin. Hervorgehoben sind die in den langen Isoformen vorhandene PDZ-Domäne sowie zwei homologe Regionen, die in allen Podinen zu identifizieren sind. NLS = putatives Kernlokalisationssignal.

ESTs Hinweise auf kurze Varianten, denen die Exons 1 und 2 sowie Teile des Exon 3 fehlen, was durch einen alternativen Transkriptionsstart im dritten Exon zu erklären wäre. Erste *Cap-Fishing*-Experimente mit mRNA aus humanem Uterus bestätigten die Existenz solcher kurzen mRNA-Transkripte (Linnemann, 2005). Einen weiteren Hinweis für die Existenz dieser kurzen Varianten lieferten Affymetrix-Daten, die über die *All-Exon-Chip-Analyse* die Expression einzelner Exons und Spleißvorgänge verschiedenster mRNAs untersuchten. Hier wies Myopodin vor allem im Skelettmuskel keine Expression der Exons 1, 2 und 6 sowie des 5'-Bereichs des dritten Exons auf (Abb. B.2, D). Die Expression dieser mRNA beginnt in Exon 3 und endet mit der Transkription des gesamten vierten Exons. Im Herzen und in der Prostata wurde ebenfalls die Expression der Exons 1 bis 4 beschrieben. Eine Zusammenfassung dieser Daten befindet sich im Anhang (Abb. B.2). Werden die drei durch Spleißen verursachten 3'-Enden mit den beiden Transkriptionsstarts kombiniert, so ergeben sich sechs putative Myopodinisoformen. Eine vollständige Zusammenfassung aller möglichen Myopodinvarianten zeigt Abbildung 3.1.

### 3.1.1.1 Expressionsanalyse humaner Myopodinvarianten auf mRNA-Ebene

Um zu klären, welche Myopodinisoformen tatsächlich in verschiedenen Geweben exprimiert werden, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Die RNA wurde aus humanen Geweben (Herz, Skelettmuskel und Uterus) bzw. aus differenzierten humanen Skelettmuskelzellen gewonnen und in cDNA umgeschrieben, welche in PCR Ansätzen als *Templates* dienten. Die Primer wurden so kreiert, dass die erwarteten PCR-Produkte eine Länge von etwa 150 bis 300 bp besitzen sollten und wenn möglich, über zwei Exons reichten, wodurch eine Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte. Die verwendeten Primerkombinationen sind in Abbildung 3.2 A schematisch dargestellt. Die Primerkombinationen I, II und III, welche in Exon 1 und 2, bzw. im 5'-Bereich des dritten Exons binden, dienten dem Nachweis der langen Myopodinisoformen a bis c. Das Primerpaar IV, welches ein Fragment vom Ende des dritten Exons bis zum Exon 4a amplifiziert, sollte alle, auch die N-terminal trunkierten Varianten d bis f nachweisen. Die Primerpaare V, VI und VII wurden zur Bestimmung der exprimierten 3'-Variante

des Myopodins benutzt. Primerpaar V ist spezifisch für Spleißvarianten a bzw. d, also für den Spleißvorgang von Exon 4 zu Exon 6, Primerpaar VI für die Varianten b und e, also Exons 4a und b, Primerpaar VII für die Spleißvarianten c oder f, also Exons 4 und 5 (Abb. 3.2, A). Als Positiv- und Ladekontrolle wurden PCR-Ansätze mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-spezifischen Primern durchgeführt.

Mit cDNA aus humanem Herzmuskel- und Uterusgewebe konnten mit allen eingesetzten Primerpaaren mit Ausnahme des Primerpaares VII, große Mengen an PCR-Produkt erzielt werden (Abb. 3.2, B und C). Dies deutet darauf hin, dass sowohl im Herzen als auch im Uterus lange Myopodinvarianten, inklusive Exon 1, 2 und 3, sowie Varianten mit Exon 4b und Exon 6 exprimiert werden. Allerdings scheint die Expression von Exon 6 im Herzen eher schwach zu sein. Die Expression der Spleißvariante c und f konnte dagegen in diesen Geweben nicht nachgewiesen werden. In humanem Skelettmuskelgewebe konnte mit Primern spezifisch für Exons 1, 2 und 3 nur sehr wenig PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abb. 3.2, D). Mit den Primerpaaren IV und VI wurden jedoch große Mengen an PCR-Produkt erhalten. Das Primerpaar V zur Amplifikation des sechsten Exons führte dagegen zu keinen Amplifikationsprodukten. Die Expression der Isoformen a und d kann demnach ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Skelettmuskel, neben einer geringen Expression einer langen Isoform, vermutlich Isoform b, hauptsächlich die kurze Variante e exprimiert wird (Abb. 3.2, D). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass in dem für die RNA-Isolierungen verwendeten Gewebestück auch andere Zelltypen, wie z. B. Epithel- oder Glattmuskelzellen aus Blutgefäßen, vorhanden waren, in welchen die lange Variante exprimiert sein könnte. Um dies auszuschließen, wurden RT-PCR Experimente mit differenzierten humanen Skelettmuskelzellen (Hskm-Zellen) durchgeführt (Abb. 3.2, E), wobei das gleiche Expressionsmuster wie im adulten Skelettmuskelgewebe beobachtet wurde. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass im Skelettmuskelgewebe hauptsächlich die Variante e exprimiert wird.

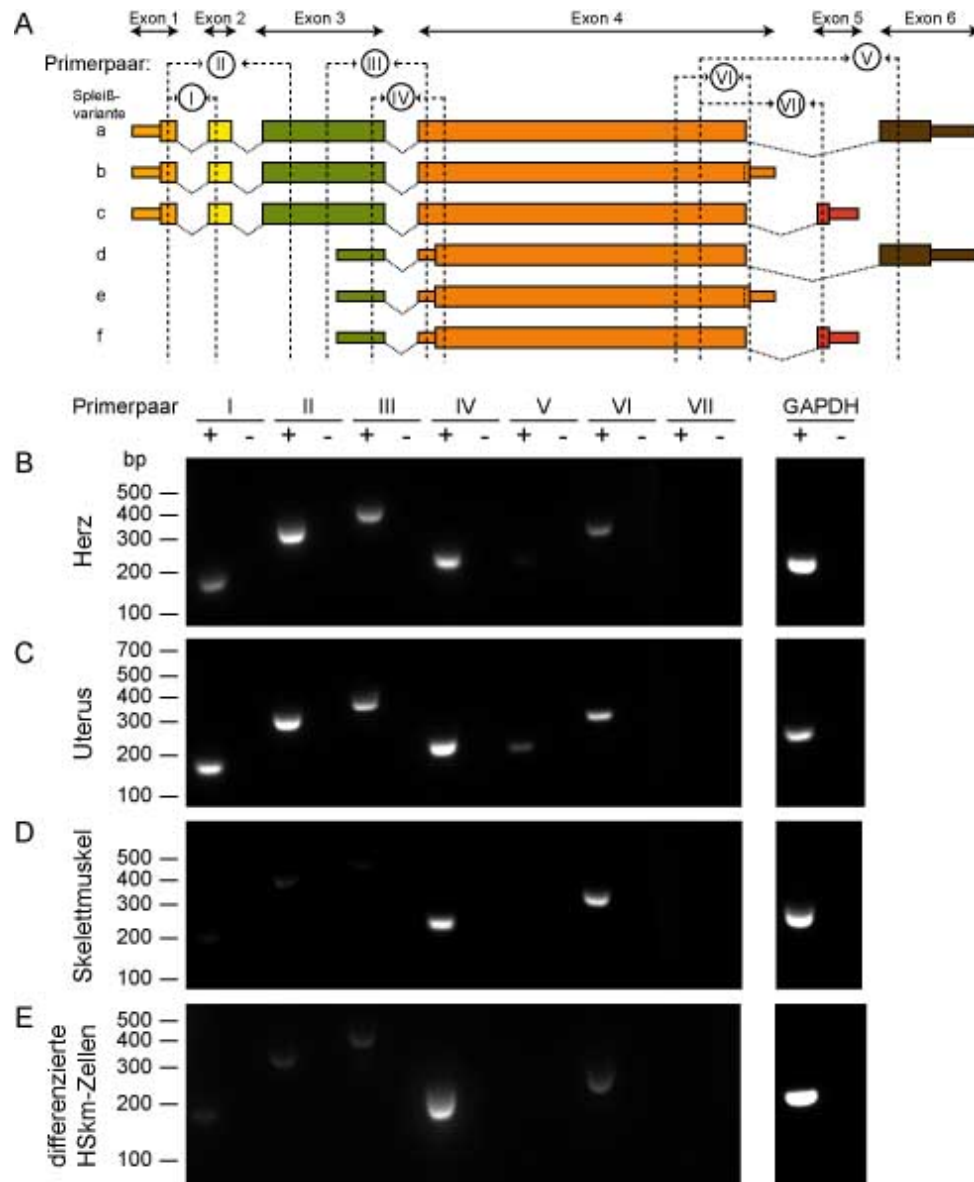


Abbildung 3.2: **Expressionsanalyse humaner Myopodinvarianten auf mRNA-Ebene.** A: Übersicht der verwendeten Primerpaare für RT-PCR-Experimente zur Amplifikation humanen Myopodins. Dargestellt sind alle putativen Spleißvarianten, die punktierten Linien geben die Lage der Primer an, die römischen Zahlen die Primerkombinationen, welche für RT-PCR-Experimente auf humaner cDNA verwendet wurden. B-E: Ergebnisse der RT-PCRs zur Amplifikation humanen Myopodins aus den angegebenen Geweben und differenzierten Hskm-Zellen. Der Größenstandard ist links angegeben, wobei die Zahlen der Länge in bp entsprechen. Die verwendeten Primerpaare sind dem Schema in A zu entnehmen. Als Kontrolle wurde je eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt. (+) kompletter PCR-Ansatz, (-) Kontrollansatz ohne Template.

### 3.1.1.2 Bestätigung der Expression der kurzen Myopodinisformen in Hskm-Zellen auf mRNA-Ebene

Um die Existenz des umstrittenen alternativen Transkriptionsstarts zu belegen, wurden 5'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA-Ends*) Experimente durchgeführt. Hierzu wurde zunächst RNA aus differenzierten Hskm-Zellen isoliert und diese anschließend unter Verwendung des „5'-RACE, Version 2.0 (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe zweier Myopodin-spezifischer *reverse*-Primer („GSP1: Myop 391r“ und „GSP2: Myop 1185r“, Sequenzen siehe C.4), die im 5'-Ende des vierten Exons binden (Abb. 3.3, A), konnten so je zwei spezifische PCR-Produkte mit einer Länge von etwa 500 bp bzw. 250 bp, erhalten werden (Abb. 3.3, B). Diese wurden über T/A-Klonierung in den Vektor pGEM-T inseriert und in *E.coli* transformiert. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA mehrerer Kolonien des größeren Fragments ergab, dass dieses im dritten Exon beginnt (Abb. 3.3, C). Auch Datenbankanalysen zeigen viele ESTs, die im Exon 3 starten. Drei dieser ESTs (AL713538, DB269106 und DB288412) beginnen mit exakt derselben Base, wie die erhaltenen Fragmente des 5'-RACE-Produktes (Abb. B.2, C). Einen weiteren Hinweis für die Existenz der kleinen Isoform ergab die Suche nach putativen Promotorregionen (Kim *et al.*, 2005). So konnte eine TAF1-Bindungsstelle an Position -190 von dem Startpunkt des 5'-RACE-Produktes, bzw. der ESTs AL712538, DB269106 und DB288412 ermittelt werden (Abb. B.2, E). In Kombination mit einem Hefe-Zwei-Hybrid-Klon, der den polyA-Schwanz enthielt und dessen 3'-Ende der Myopodinisform b (oder den mRNA Sequenzen AL832031 und AL832363) entsprach, konnte die gesamte Sequenz der im Skelettmuskel exprimierten Isoform ermittelt werden. Diese wurde in der EMBL-Datenbank mit der *Accession Number* FN422000 hinterlegt. Das entsprechende Protein hat die *Accession Number* CAZ66141 (Sequenz siehe Anhang C.1).

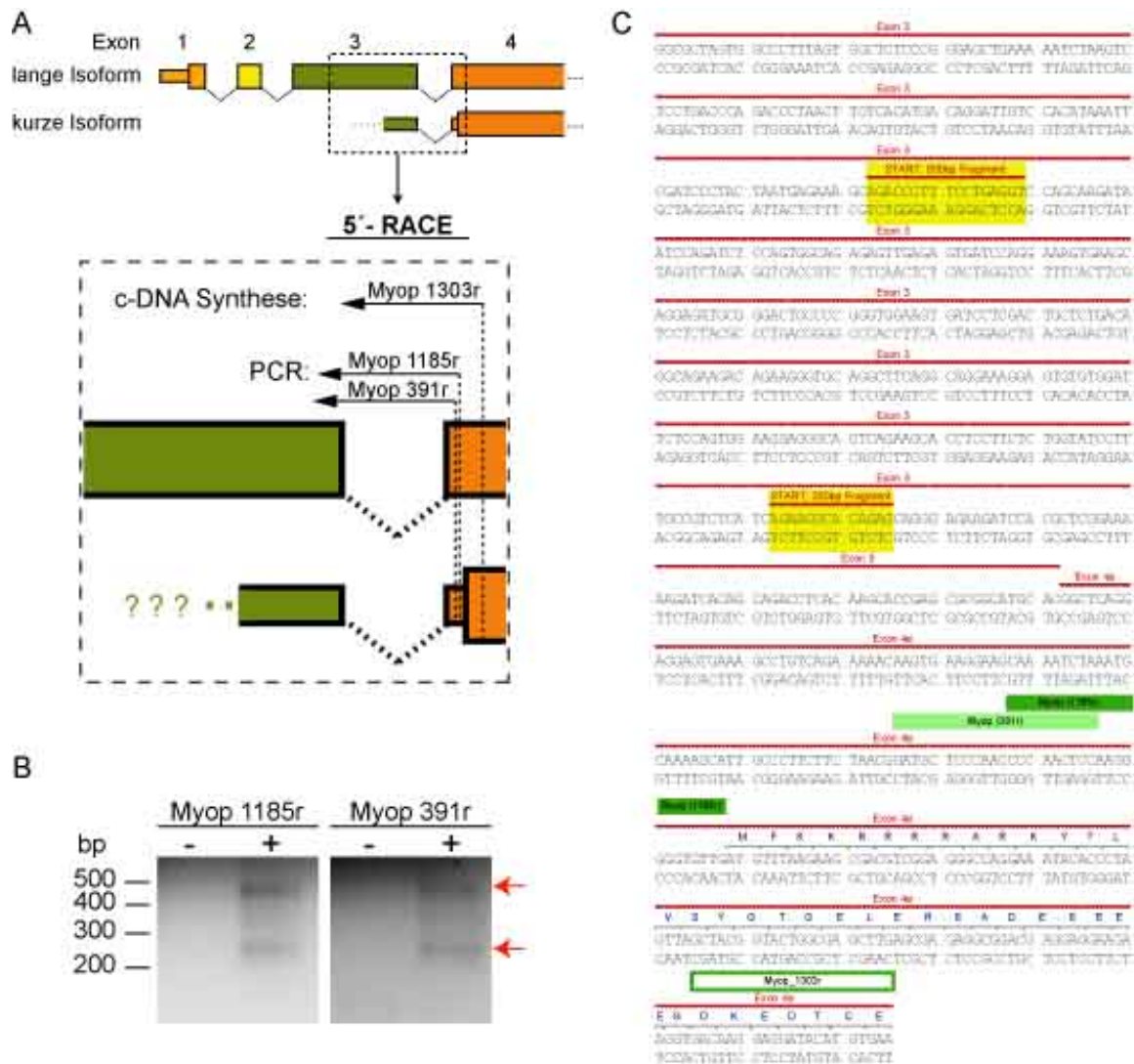


Abbildung 3.3: 5'-RACE zur Bestätigung der Existenz der kleinen Myopodinisiform in humanen Skelettmuskelzellen. A: Schematische Darstellung des 5'-Bereichs der langen und kurzen Myopodinisiformen. Der für die 5'-RACE interessante Teil ist vergrößert und die Position der für die 5'-RACE verwendeten Primer eingezeichnet. B: Die Agarosegele der 5'-RACE mit den Primern Myop 391r und Myop 1185r zeigen die Amplifikation von je einem 500 bp-Fragment sowie einem 250 bp-Fragment. Die Negativkontrollen (-) ohne Zugabe von Template zeigen keine Amplifikationsprodukte. C: Ausschnitt aus der mRNA-Sequenz des Myopodins. Der Beginn des 500 bp-Fragmentes sowie des 250 bp-Fragmentes sind gelb, die verwendeten Primer grün hervorgehoben.

### 3.1.2 Die Isoformen des Myopodins zeigen teils gewebespezifische Expression

Um die Expression des Myopodins und dessen unterschiedliche Isoformen auch auf Proteinebene ausführlich studieren zu können, war die Herstellung spezifischer Antikörper notwendig. Im Folgenden wird die Herstellung und Charakterisierung der Myopodinantikörper genauer beschrieben. Die Lage der Epitope sowie alle relevanten Daten sind in Abbildung 3.4 zusammengefasst.

#### 3.1.2.1 Herstellung spezifischer Antikörper gegen Myopodin

Wie bereits in 1.3.2 beschrieben, gibt es widersprüchliche Angaben über die Expression des Myopodins in verschiedenen Zell- und Gewebetypen. Um eigene Untersuchungen zur Klärung der Expressionsmuster sowie der Lokalisation in verschiedenen Zelltypen durchführen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene spezifische Antikörper generiert. Neben dem bereits beschriebenen monoklonalen Antikörper HH9 (Vakeel, 2006) wurde ein polyklonaler Myopodinantikörper (M2) generiert, welcher sein Epitop im N-terminalen Bereich der kurzen Varianten hat und somit, ebenso wie der HH9, alle Isoformen erkennen sollte (Abb. 3.4). Hierzu wurden zwei Kaninchen (Tiernummern 1593 und 1594) mit einem Myopodinfragment immunisiert, welches die Aminosäuren 405 bis 663 umfasste. Die Spezifität der so erhaltenen Seren wurde durch einen Western Blot auf dem entsprechenden Antigen getestet, wobei die Seren beider Tiere eine starke Reaktivität zeigten (Daten nicht gezeigt).

Zur Unterscheidung der unterschiedlichen Myopodinvarianten wurden zusätzlich zwei isoformspezifische Antikörper generiert. Der Myopodin  $\alpha$ -PDZ Antikörper wurde durch Immunisierung mit dem Fragment Myop 268-391 erhalten (Abb. 3.4). Dieser Bereich liegt direkt C-terminal der PDZ-Domäne und ist somit zum einen spezifisch für die langen Isoformen, zum anderen sollte er aber keine Homologie mit anderen PDZ-tragenden Proteinen aufweisen. Auch hier wurden zwei Kaninchen (Tiernummern 2326 und 2327) immunisiert und die Spezifität der so erhaltenen Seren wie oben angegeben getestet, wobei wiederum die Seren beider Tiere eine starke Reaktivität zeigten (Daten nicht gezeigt).



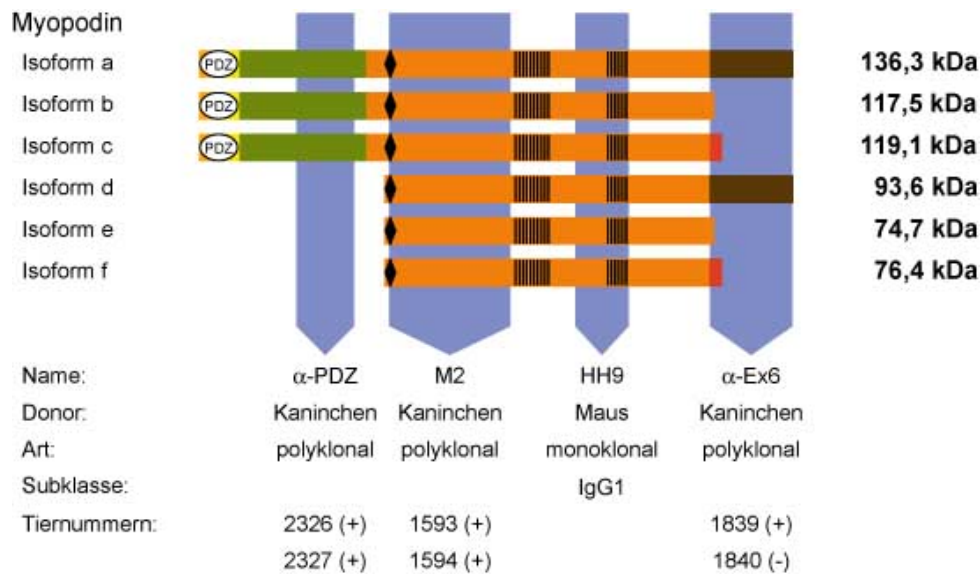


Abbildung 3.4: **Schematische Darstellung der Lage der Epitope der Myopodinantikörper.** Gezeigt sind die sechs putativen Myopodinisoformen mit der charakteristischen PDZ-Domäne sowie den Podin-Homologiebereichen und den berechneten molekularen Massen. Die Epitope der Antikörper sind mit blauen Balken unterlegt. Die Tabelle gibt Auskunft über den Namen, den Donororganismus, die Art, bzw. Subklasse sowie die Tiernummern der immunisierten Kaninchen. (+) Test des Serums durch einen Western Blot auf dem entsprechenden Antigen positiv, (-) Test des Serums durch einen Western Blot auf dem entsprechenden Antigen negativ.

Weiterhin sollte durch Immunisierung mit dem vom Exon 6 kodierten Proteinfragment ein Antikörper erzeugt werden, der spezifisch für die Isoformen a und d ist (Abb. 3.4). Zunächst wurde versucht eine Maus mit einem T7-tag versehenen Proteinfragment zu immunisieren. Der Test des Serums auf Western Blots fiel dabei positiv aus. Es wurde sowohl das rekombinante Protein als auch spezifische Banden auf Gewebeextrakten erkannt. Die Überstände der durch Fusion erhaltenen Hybridoma-Zellen reagierten jedoch nicht mehr positiv. Deshalb wurden zusätzlich zwei Kaninchen mit dem vom Exon 6 kodierten Proteinfragment immunisiert (Tiernummer 1839 und 1840). Die erhaltenen Seren wurden wie oben angegeben getestet, allerdings zeigte nur das Serum des Tieres 1839 eine starke Reaktivität auf diesen Blots (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde ausschließlich mit dem Serum dieses Tieres gearbeitet.

### 3.1.2.2 Expressionsanalyse humaner Myopodinvarianten auf Proteinebene

Die oben beschriebenen Myopodin-spezifischen Antikörper wurden zunächst auf humanen Gewebeextrakten verwendet. Hierzu wurden SDS-Totalextrakte von humanen Geweben

hergestellt, diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die anschließende Immundetektion der Herz-, Skelettmuskel- und Prostatagewebe zeigte mit beiden pan-Myopodinantikörpern identische Banden (Abb. 3.5, A), was die Spezifität der beiden Antikörper unterstreicht. Die Doppelfärbung mit beiden pan-Myopodinantikörpern und Detektion mit dem Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR) bestätigte dies (Abb. 3.5, B). Zu bemerken war, dass die Immunfärbung in Kombination mit herkömmlicher ECL besonders die langen Isoformen besser visualisierte als die Detektion mit dem Odysseyscanner. Die Blots (Abb. 3.5, A und B) zeigten in humanem Skelettmuskel eine einzelne prominente Bande bei etwa 90 kDa, was der Vermutung entspricht, dass im Skelettmuskel die Isoform e exprimiert wird (siehe Abschnitte 3.1.1.1 und 3.1.1.2). Bei langen Belichtungszeiten (Abb. 3.5, A), war zusätzlich ein Signal bei etwa 160 kDa zu beobachten, welches jedoch im Vergleich zur 90 kDa Bande deutlich schwächer erschien. Bei kurzen Belichtungszeiten wurde diese Isoform nicht beobachtet (Abb. 3.5, C, Spur 2). Im Herzen war eine Bande bei etwa 150 kDa zu beobachten, was ebenfalls der Erwartung entspricht, dass in Herzmuskelzellen eine lange Myopodinvariante mit PDZ-Domäne exprimiert wird. Allerdings könnte dies auch eine Doppelbande darstellen, die aufgrund der zu geringen Laufstrecke nicht aufgetrennt wurde. In der Prostata, welche einen großen Anteil an Glattmuskelzellen besitzt, war sowohl eine große Isoform von etwa 160 kDa als auch eine kleine von etwa 90 kDa zu beobachten. Die Färbung mit dem M2 Antikörper zeigte eine Doppelbande bei etwa 160 bzw. 200 kDa. Dabei könnte es sich um unterschiedliche Isoformen oder um durch Proteolyse verursachte Banden handeln. Die kleine Isoform der Prostata ist möglicherweise etwas größer als die des Skelettmuskels, eventuell ein Hinweis, dass es sich um Isoform f handelt.

Um die Zuordnung der Isoformen zu bestätigen, wurden Western Blots mit den polyklonalen isoformspezifischen Antikörpern  $\alpha$ -PDZ und  $\alpha$ -Ex6 gefärbt (Abb. 3.5, C). Hierbei wurde zusätzlich zu den humanen Gewebeextrakten ein Zellextrakt von differenzierten Hskm-Zellen, sowie von A7r5-Zellen aufgetragen, die die Myopodinisoformen d bzw. e, markiert mit einem Myc-Tag exprimieren (A7r5 Myop e und Myop d). Diese Kontrollen dienten zum einen dem Beweis der Spezifität der eingesetzten Antikörper, zum anderen

ermöglichen sie den Größenvergleich der im Gewebe exprimierten Isoformen mit den ektopisch exprimierten Proteinen.

Die Kontrollfärbung mit dem HH9-Antikörper zeigte die erwarteten, bereits beschriebenen Banden bei den humanen Gewebeextrakten (siehe oben). Auch in den differenzierten Hskm-Zellen konnte die erwartete Bande von etwa 90 kDa beobachtet werden. Bei den transfizierten A7r5 Zellen war jeweils eine spezifische Bande bei etwa 120 kDa für Myopodin e und 140 kDa für Myopodin d zu beobachten (Abb. 3.5, C), was auch mit der Kontrollfärbung gegen den Myc-Tag beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Obwohl alle bisherigen Ergebnisse auf die Expression der Myopodinisiform e im Skelettmuskel hindeuten, entsprach die Laufhöhe der ektopisch exprimierten Isoform e nicht der Skelettmuskelvariante. Auch die Größe der Isoform d entspricht keiner der in den untersuchten Geweben exprimierten Isoformen. Die Beobachtung, dass ektopisch exprimiertes Myopodin ein abnormales Laufverhalten zeigt, konnte auch von de Ganck *et al.* (2008) gemacht werden, wobei die Autoren diese Größendifferenz auf mögliche posttranslationale Modifikationen in Geweben zurückführten.

Die Färbung mit dem  $\alpha$ -PDZ-Antikörper ergab im Herzen eine einzelne Bande bei etwa 160 kDa (Abb. 3.5, D). Im Skelettmuskel konnte ebenfalls eine einzelne Bande bei ca. 160 kDa detektiert werden. In der Prostata trat eine Doppelbande bei etwa 160 bzw. 200 kDa auf. In den Hskm-Zellen und den transfizierten A7r5-Zellen konnte dagegen kein spezifisches Signal detektiert werden. Dies bestätigt die Spezifität des Antikörpers, denn die beiden überexprimierten kurzen Isoformen d und e enthalten nicht die antigene Sequenz für den verwendeten  $\alpha$ -PDZ-Antikörper. Auffallend war, dass die Detektion mit dem  $\alpha$ -PDZ-Antikörper eine erhebliche Färbung des oberen Drittels des Western Blots verursachte, die immer mit den Seren beider immunisierter Kaninchen auftrat.

Die Färbung mit dem  $\alpha$ -Ex6-Antikörper ergab im Herzen eine einzelne Bande bei etwa 160 kDa, während im Skelettmuskel kein Signal detektiert werden konnte (Abb. 3.5, E). Im Prostatagewebe erschien eine Bande bei etwa 160 kDa, die einen starken proteolytischen Abbau aufwies. In den Extrakten von Hskm-Zellen bzw. mit Myopodinisiform e transfizierten A7r5-Zellen konnte kein spezifisches Signal detektiert werden. In dem Extrakt mit Myopodinisiform d transfizierter A7r5-Zellen wurde dagegen eine spezifische

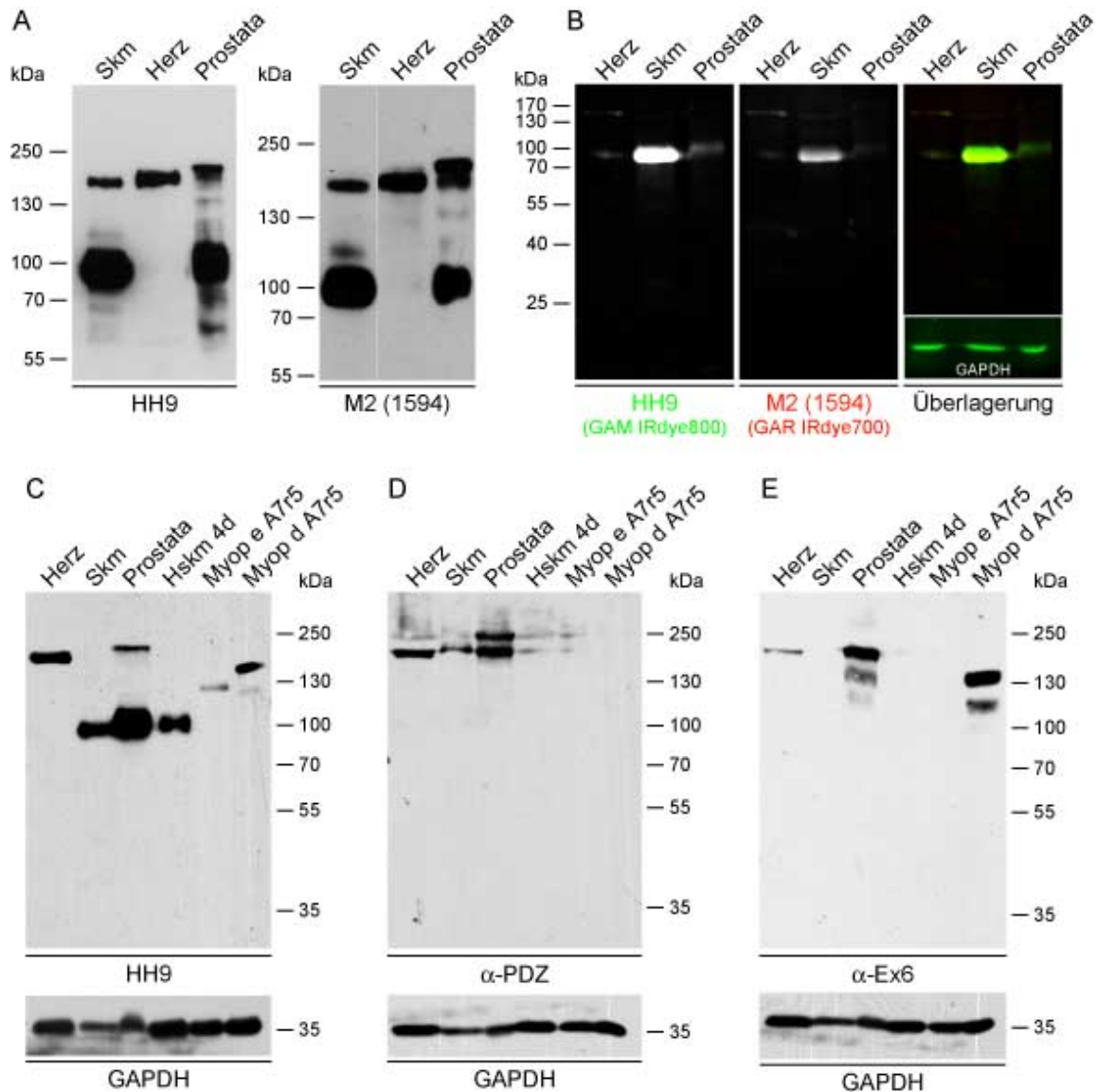


Abbildung 3.5: **Expressionsanalyse humaner Myopodinisoformen auf Proteinebene.** A: Western Blots von Extrakten aus humanem Skelettmuskel-, Herz- und Prostatagewebe gefärbt mit den Myopodin-spezifischen Antikörpern HH9 und M2. B: Doppelfärbung mit HH9 und M2, Detektion mittels IRDye-gekoppelter Sekundärantikörper. Gezeigt sind die Einzelkanäle, das entsprechende Zweikanalbild sowie die Ladekontrolle mit GAPDH. Beide Myopodin-Antikörper zeigen identische Färbungen. C-E: Western Blots von humanen Gewebeeextrakten, Zellextrakten differenzierter Hskm-Zellen, sowie von A7r5-Zellen transfiziert mit Myopodinisoform d (Myop d) und Myopodinisoform e (Myop e). Die Färbungen mit den den Antikörpern HH9 (C),  $\alpha$ -PDZ (D) und  $\alpha$ -Ex6 (E) zeigen die teils gewebespezifische Expression verschiedener Myopodinisoformen. Die jeweilige Ladekontrolle mit GAPDH ist darunter gezeigt. Die Zahlen geben die molare Massen der Markerproteine in kDa an.

Bande von etwa 140 kDa nachgewiesen. Da die ektopisch exprimierte Isoform d das Antigen des Antikörpers  $\alpha$ -Ex6 beinhaltet, die Variante e hingegen nicht, bestätigte dies die Spezifität des Antikörpers. Die Größe der transfizierten Isoform d entspricht der, die mit dem pan-Myopodin Antikörper HH9 nachgewiesen werden konnte.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die verwendeten Antikörper spezifisch die entsprechenden Myopodinvarianten erkennen. Die Färbungen mit den isoformspezifischen Antikörpern ergaben, dass im Herzen eine lange Myopodinisiform exprimiert wird, die den vom Exon 6 kodierten Bereich umfasst, also Myopodin a. Im Prostatagewebe wird ebenfalls diese Variante exprimiert. Die Bedeutung der zweiten Bande bei etwa 200 kDa, die ausschließlich mit der Färbung des  $\alpha$ -PDZ-Antikörpers zu beobachten war, bleibt allerdings unklar. Die kurze Isoform von etwa 90 kDa im Skelettmuskel beinhaltet weder die PDZ-Domäne noch den vom Exon 6 kodierten Bereich, was zusammen mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene (siehe Abschnitte 3.1.1.1 und 3.1.1.2) für die Isoform e sprechen würde. Allerdings zeigte die Kontrolle mit der ektopisch exprimierten Isoform e, dass diese in der SDS-Gelelektrophorese eine deutlich größere scheinbare Masse besitzt (siehe oben).

### 3.1.2.3 Expressionsanalyse muriner Myopodinisiformen auf Proteinebene

Nachdem die Myopodin-spezifischen Antikörper erfolgreich gegen humane Extrakte eingesetzt waren, sollte deren Reaktivität auch auf murinen Extrakten getestet werden. Hierzu wurden SDS-Totalextrakte verschiedener muriner Gewebe im Western Blot verwendet. Die Färbung mit dem polyklonalen Antikörper M2 zeigte Doppelbanden bei etwa 160 bzw. 200 kDa in den Geweben von Prostata, Uterus, Darm und Blase (Abb. 3.6, A). Im Herzen konnte dagegen eine einzelne Bande bei etwa 160 kDa detektiert werden. Im Extrakt aus Lungengewebe konnte ebenfalls ein schwaches Signal bei ca. 160 kDa nachgewiesen werden. Auffallend war, dass mit dem M2-Antikörper die kleinen Myopodinisiformen nicht bzw. im Skelettmuskelgewebe nur schwach, nachgewiesen werden konnten. In den neuronalen Geweben des Gehirns (Großhirn, Kleinhirn, Bulbus olfaktorius) konnte eine Große Bande von etwa 160 kDa detektiert werden, wobei lange

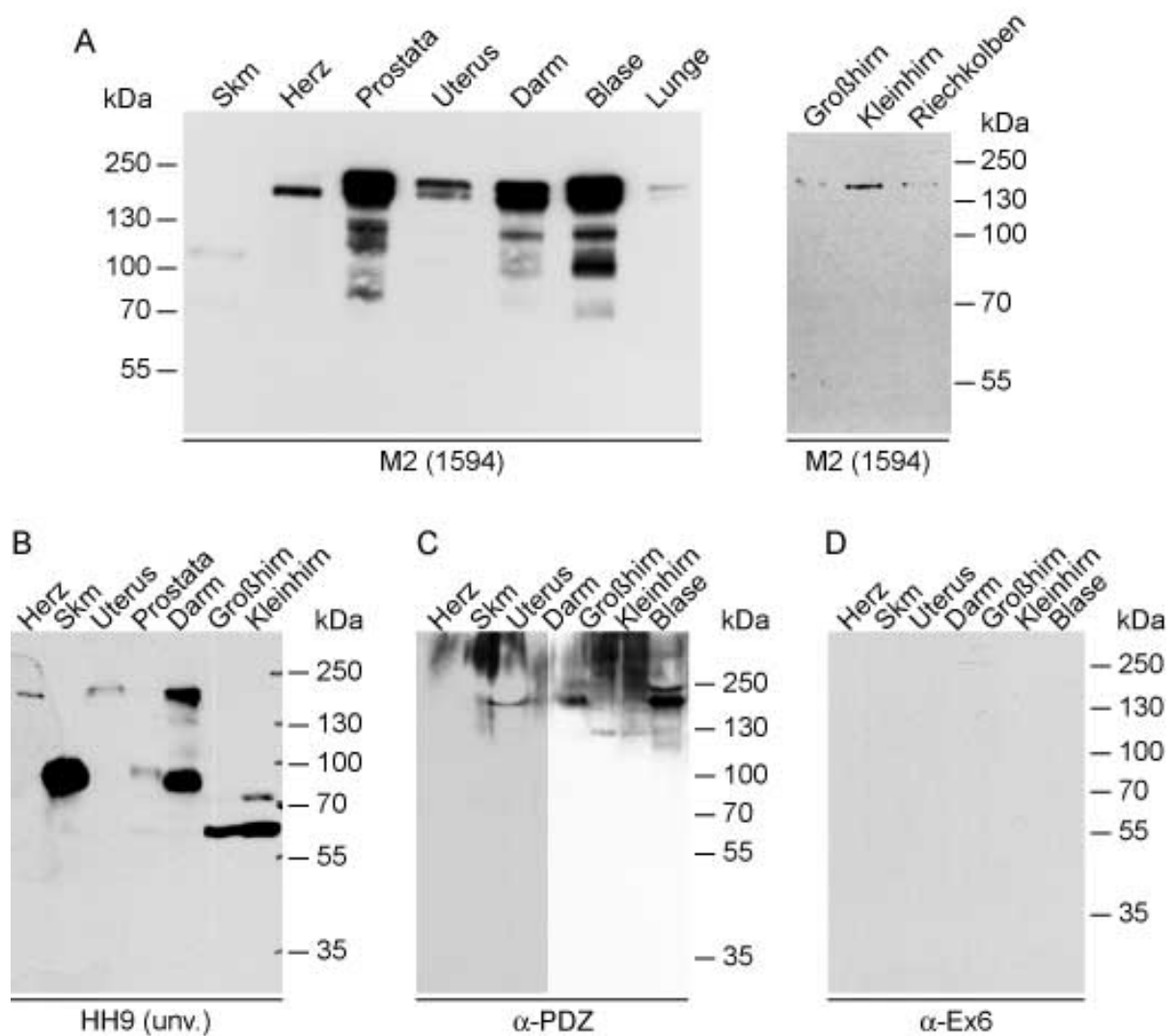


Abbildung 3.6: **Expressionsanalyse muriner Myopodinvarianten auf Proteinebene.** Western Blots von Extrakten aus verschiedenen Mausgeweben gefärbt mit dem Myopodin-spezifischen Antikörpern M2 (A), HH9 (B) sowie mit den isoformspezifischen Antikörpern  $\alpha$ -PDZ (C) und  $\alpha$ -Ex6 (D). Die Färbungen bestätigen die teils gewebespezifische Expression verschiedener Myopodinisoformen. Die Zahlen geben die molare Massen der Markerproteine in kDa an.

Belichtungszeiten ein zusätzliches Signal bei etwa 60 kDa lieferten (Albinus, 2008).

Da die Immunfärbung mit dem HH9-Antikörper in der für humane Extrakte verwendeten Antikörperverdünnung viele Banden zeigte, die wie die Kontrolle ohne den primären Antikörper von der Kreuzreaktivität des sekundären Antikörpers GAMPO mit den murinen Gewebeextrakten herrührten (Daten nicht gezeigt), wurde der Antikörper 50 x konzentrierter eingesetzt (Abb. 3.6, B). Somit konnte im Skelettmuskel, in der Prostata sowie im Darm eine Myopodinisiform von etwa 90 kDa nachgewiesen werden. Im Darm konnte zusätzlich eine lange Myopodinisiform von etwa 160 kDa detektiert werden, während im Uterusgewebe ausschließlich diese Isoform beobachtet wurde. Im Herzen konnte die Expression einer 150 kDa Isoform nachgewiesen werden. In den getesteten neuronalen Geweben des Groß- und Kleinhirns wurde jeweils eine Bande von ca. 60 kDa detektiert, im Kleinhirn erschien zusätzlich ein Signal von etwa 75 kDa. Diese Banden entsprechen zwar keiner vorhergesagten Myopodinisiform, sie konnten aber mit beiden pan-Myopodinantikörpern nachgewiesen werden. Bei der Detektion der murinen Myopodinisiformen mit dem HH9-Antikörper musste dieser wie bereits erwähnt wesentlich konzentrierter eingesetzt werden als für die Detektion humaner Myopodinisiformen. Vermutlich ist die Affinität des Antikörpers zum murinen Myopodin nicht so hoch wie zu humanem Myopodin.

Die entsprechenden Extrakte wurden auch mit Hilfe des  $\alpha$ -PDZ-Antikörpers auf die Expression der langen, PDZ-Domänen tragenden Myopodinisiformen untersucht. Die Immunfärbung zeigte, dass der obere Teil des Blots eine erhebliche Schwarzfärbung aufwies, die es schwierig machte, spezifische Signale in diesem Bereich zu erhalten (Abb. 3.6, C). Diese Beobachtung wurde bereits mit den humanen Immunoblots gemacht (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Dennoch waren im Darm und in der Blase, aber auch im Skelettmuskel Banden bei etwa 160 kDa zu beobachten, die für eine Expression einer langen Myopodinvariante mit PDZ-Domäne sprechen.

Die Immunfärbung der Western Blots muriner Extrakte mit dem  $\alpha$ -Ex6-Antikörper zeigte keinerlei spezifische Signale (Abb. 3.6, D). Vermutlich ist die Affinität dieses Antikörpers für murines Myopodin zu gering.

### 3.1.2.4 Expressionsanalyse von Myopodinisformen in Rattengeweben

Die Myopodin-spezifischen Antikörper wurden auch auf Western Blots von SDS-Totalextrakten aus Geweben der Ratte getestet. Abbildung 3.7, A zeigt die Immunfärbung mit dem polyklonalen Myopodinantikörper M2. Wie schon bei den humanen und murinen Geweben beobachtet, wurden auch in den Rattengeweben mit hohem Glattmuskelanteil (Blase, Uterus, Prostata, Samenleiter, Darm, Thymus und Milz) die langen Myopodinisformen von ca. 160 kDa exprimiert. Auch im Herzen konnte eine lange Myopodinvariante detektiert werden, ebenso im Lungengewebe. Die kleinen Isoformen von etwa 90 kDa ließen sich mit dem M2-Antikörper, mit Ausnahme des Skelettmuskelgewebes, nicht nachweisen. Die gleiche Beobachtung konnte bei der Detektion mit dem M2-Antikörper muriner Myopodinisformen gemacht werden. Der Skelettmuskel wies zudem auch eine Bande von etwa 120 kDa auf, deren Ursprung unbekannt ist. Im Gehirn konnte mit dem polyklonalen Antikörper kein Myopodin nachgewiesen werden.

Der Einsatz des monoklonalen Antikörpers HH9 zeigte die Expression der kleinen Myopodinisformen im Skelettmuskel, der Zunge, Darm und Blase (Abb. 3.7, B). In der Zunge konnte zusätzlich eine Bande von etwa 45 kDa detektiert werden. Auch die Expression der großen Isoformen in den glattmuskelreichen Geweben und im Herzen konnte nachgewiesen werden. Im Kleinhirn wurde eine Bande bei etwa 60 kDa detektiert, deren Ursprung zwar nicht bekannt ist, die aber auch in den murinen Extrakten zu finden war (vgl. Abbildung 3.6, B).

Die Immundetektion mit dem isoformspezifischen Antikörper  $\alpha$ -PDZ ergab die gleiche Schwarzfärbung des oberen Drittels des Blots, die schon bei den Mausextrakten beobachtet werden konnte (Abb. 3.7, C). Auch hier gestaltete es sich deshalb schwierig spezifische Banden zu identifizieren. Die langen Isoformen konnten aber wie erwartet in den glattmuskelreichen Geweben Uterus, Prostata, Darm und Blase aber auch in der Lunge nachgewiesen werden. In der Zunge konnte wiederum eine Bande von 45 kDa beobachtet werden. Da diese Bande sowohl mit HH9 als auch mit dem  $\alpha$ -PDZ-Antikörper detektiert wurde, könnte dies für eine bislang unbekannte Isoform sprechen.

Immunoblots mit dem  $\alpha$ -Ex6-Antikörper erbrachten erst nach sehr langer Belichtungszeit Banden in Skelettmuskel, Zunge und Blase und waren bei einer molekularen Masse von



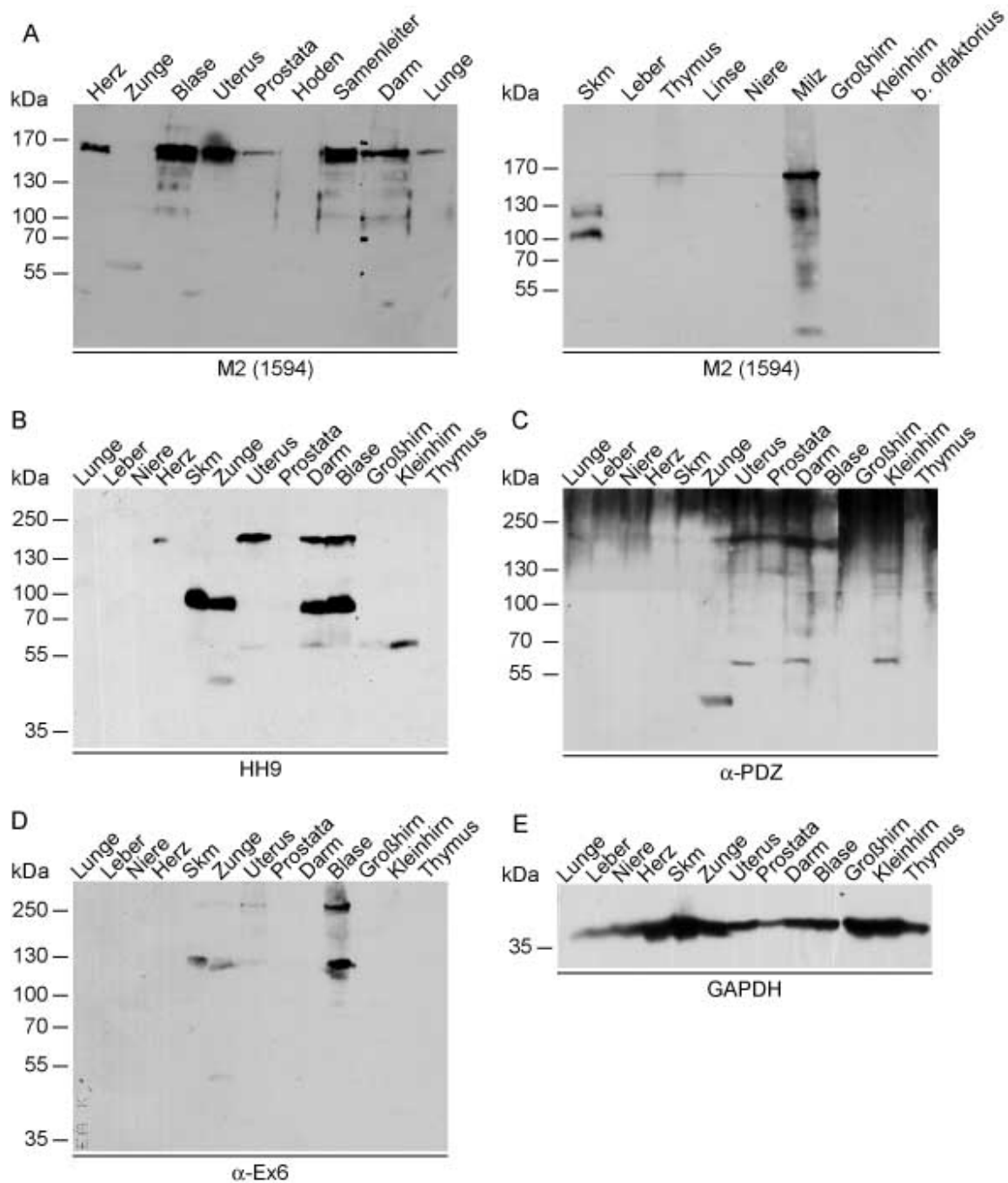


Abbildung 3.7: **Expressionsanalyse von Myopodinisoformen in Rattengewebe auf Proteinebene.** A-D: Western Blots von Extrakten aus verschiedenen Rattengewebe gefärbt mit den Myopodin-spezifischen Antikörpern M2 (A), HH9 (B) sowie den isoformspezifischen Antikörpern  $\alpha$ -PDZ (C) und  $\alpha$ -Ex6 (D). Die Färbungen zeigen die teils gewebespezifische Expression verschiedener Myopodinisoformen. E: Ladekontrolle mittels Nachweis der GAPDH. Die Zahlen geben die molare Massen der Markerproteine in kDa an.

etwa 130 kDa, in der Blase zusätzlich bei 250 kDa erkennbar. Da diese Signale nicht den erwarteten Molekülmassen entsprechen, wurden sie als unspezifisch eingestuft.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es ein breites Spektrum am Myopodinisiformen gibt, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Die Expressionsanalysen zeigten, dass in Glattmuskelgeweben die Myopodinisiform a und im Skelettmuskelgewebe die Isoform e exprimiert wird. Allgemein war bei den Western Blot Analysen auffällig, dass große Mengen von den Extrakten geladen werden mussten, um spezifische Signale zu erhalten.

### **3.1.3 Alternatives Spleißen und zwei Transkriptionsstarts resultieren in mehrere putative Tritopodinisiformen**

Das humane *SYNPO2L*-Gen, welches für Tritopodin kodiert, besteht aus fünf Exons, die durch unterschiedlich lange Introns getrennt sind. Datenbank-Analysen (UCSC Genome Browser, EMBL) ergaben zwei putative, differentielle Spleißvorgänge. Spleißvorgang 1 führt zum Herausschneiden des vierten Exons, während der intraexonische Spleißvorgang 2 zum Verlust des zentralen Bereichs des fünften Exons führt. Aus diesen Spleißvorgängen und einem alternativen Transkriptionsstart resultieren drei putative Isoformen: Tritopodin a, b und c. Eine vollständige Zusammenfassung aller möglichen Tritopodinisiformen zeigt Abbildung 3.8. Affymetrix *All-Exon-Chip-Analysen* deuten auf eine Expression der Tritopodin mRNA in den quergestreiften Muskeln der Skelett- und Herzmuskulatur, aber auch in dem glattmuskelreichen Gewebe der Prostata, hin. Das murine Tritopodin besteht ebenfalls aus fünf Exons (Beqqali *et al.*, 2010). Auch hier deuten Datenbanken darauf hin, dass das Exon 4 herausgespleißt wird, es gibt jedoch keine Hinweise auf den im humanen Tritopodin beschriebenen zweiten Spleißvorgang. Basierend auf zwei alternativen Transkriptionsstarts werden daher für das murine Tritopodin zwei Isoformen vorausgesagt (Abb. 3.9, A).

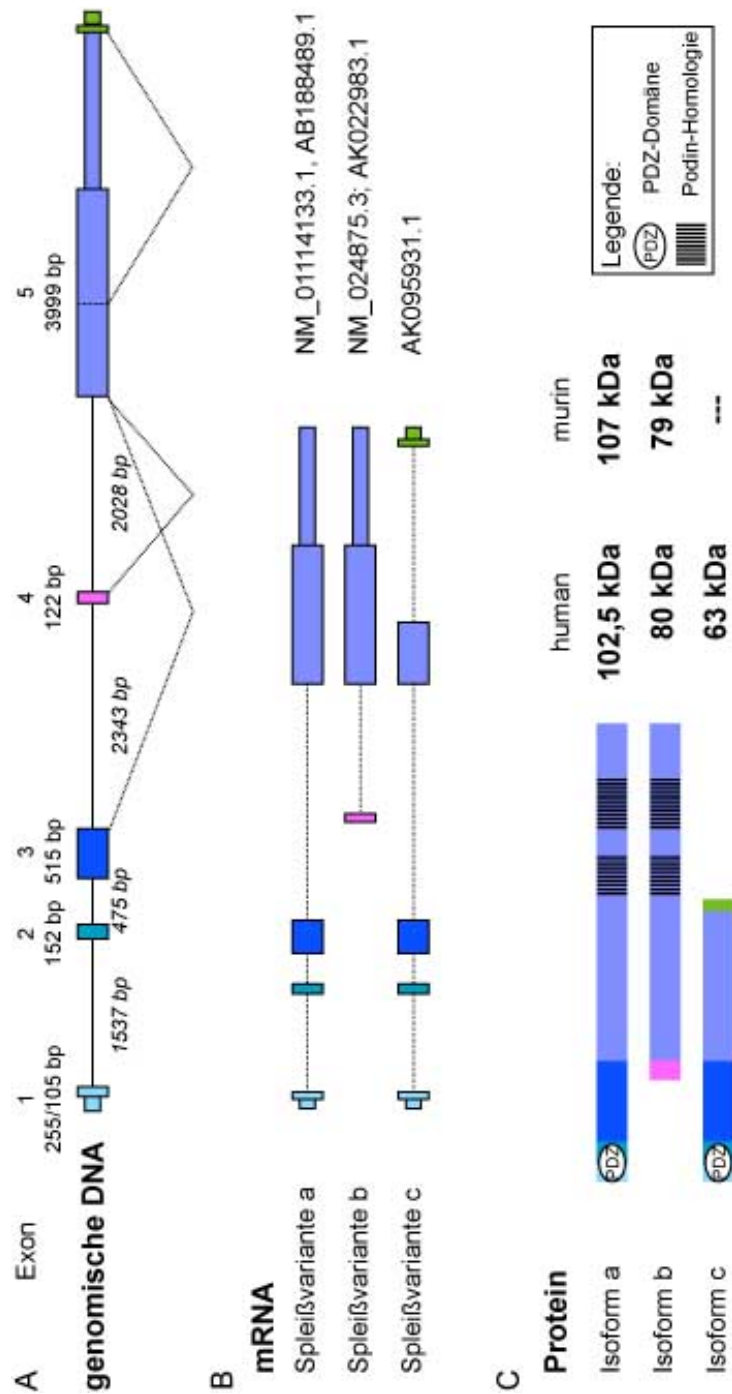


Abbildung 3.8: Organisation des humanen Tritopodin-Gens (*SYNPO2L*) und daraus resultierende Spleißvarianten bzw. Isoformen. A: Exon-Intron-Struktur der genomischen DNA. Die Exons sind als farbgefüllte Balken dargestellt, wobei translatierte Bereiche dicker veranschaulicht sind als nicht-translatierte. Die Introns sind als Linien eingezeichnet. Die Zahlen ober- bzw. unterhalb zeigen die Länge der Exons, bzw. Introns. Alternative Spleißvorgänge sind durch punktierte Linien verdeutlicht. B: mRNA-Varianten mit entsprechenden Referenzsequenzen, die aus den oben gezeigten Spleißvorgängen, sowie aus dem alternativen Transkriptionsstart resultieren. C: Protein-Isoformen mit den aus der Aminosäurezusammensetzung berechneten molekularen Massen für humanes und murines Tritopodin. Hervorgehoben sind die in den langen Isoformen vorhandene PDZ-Domäne sowie zwei homologe Regionen, die in allen Podinen zu identifizieren sind.

### 3.1.3.1 Expressionsanalyse muriner Tritopodinvarianten auf mRNA-Ebene

Um zu bestimmen, welche der putativen Isoformen in welchen Geweben exprimiert werden, wurden RT-PCR Experimente mit cDNAs aus verschiedenen murinen Geweben durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden wie in Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben kreiert. Für Primer, die nicht exonübergreifend amplifizierten, wurde eine zusätzliche Kontrolle mit RNA als Matrize durchgeführt, um auch hier die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Die verwendeten Primerkombinationen sind in Abbildung 3.9 A schematisch dargestellt. Die Primerkombinationen I, II und III, welche in Exon 1 und 2, bzw. im 5'-Bereich des dritten Exons binden, dienten dem Nachweis der langen Tritopodinisofom a. Die Primerpaare IV und V, welche ein Fragment vom Ende des zweiten Exons bis zum Exon 4, bzw. vom Exon 3 bis Exon 4 amplifizierten, sollten bei den vorhergesagten Isoformen keine PCR-Produkte zur Folge haben. Anhand des PCR-Produktes des Primerpaares VI, welches von Exon 3 zu Exon 5 amplifiziert, sollte erkennbar sein, ob das Exon 4 wider Erwarten enthalten ist. Primerpaar VII wurde zum Nachweis der Isoform b eingesetzt. Primerpaar VIII diente der Vervielfältigung des Exon 5, welches in beiden putativen Varianten gleichermaßen exprimiert werden sollte.

Die RT-PCR-Versuche zeigten, dass Tritopodin vor allem in den quergestreiften Muskeln von Skelettmuskulatur und Zunge, aber auch im Herzen und im Großhirn exprimiert wird. In all diesen Geweben wurden die Exons 1, 2, 3 und 5 nachgewiesen. Im Skelettmuskel, in der Zunge und im Großhirn konnte mit dem Primerpaar VII zudem das Exon 4 nachgewiesen werden. Da das Primerpaar VI im Skelettmuskel und der Zunge ein PCR-Produkt ergab, welches der Fragmentgröße ohne Exon 4 entspricht, ist anzunehmen, dass in diesen Geweben auf RNA-Ebene beide Isoformen exprimiert werden. Auch im Großhirn scheinen beide Isoformen zu existieren, im Herzen wird dagegen die Isoform Tritopodin a exprimiert.

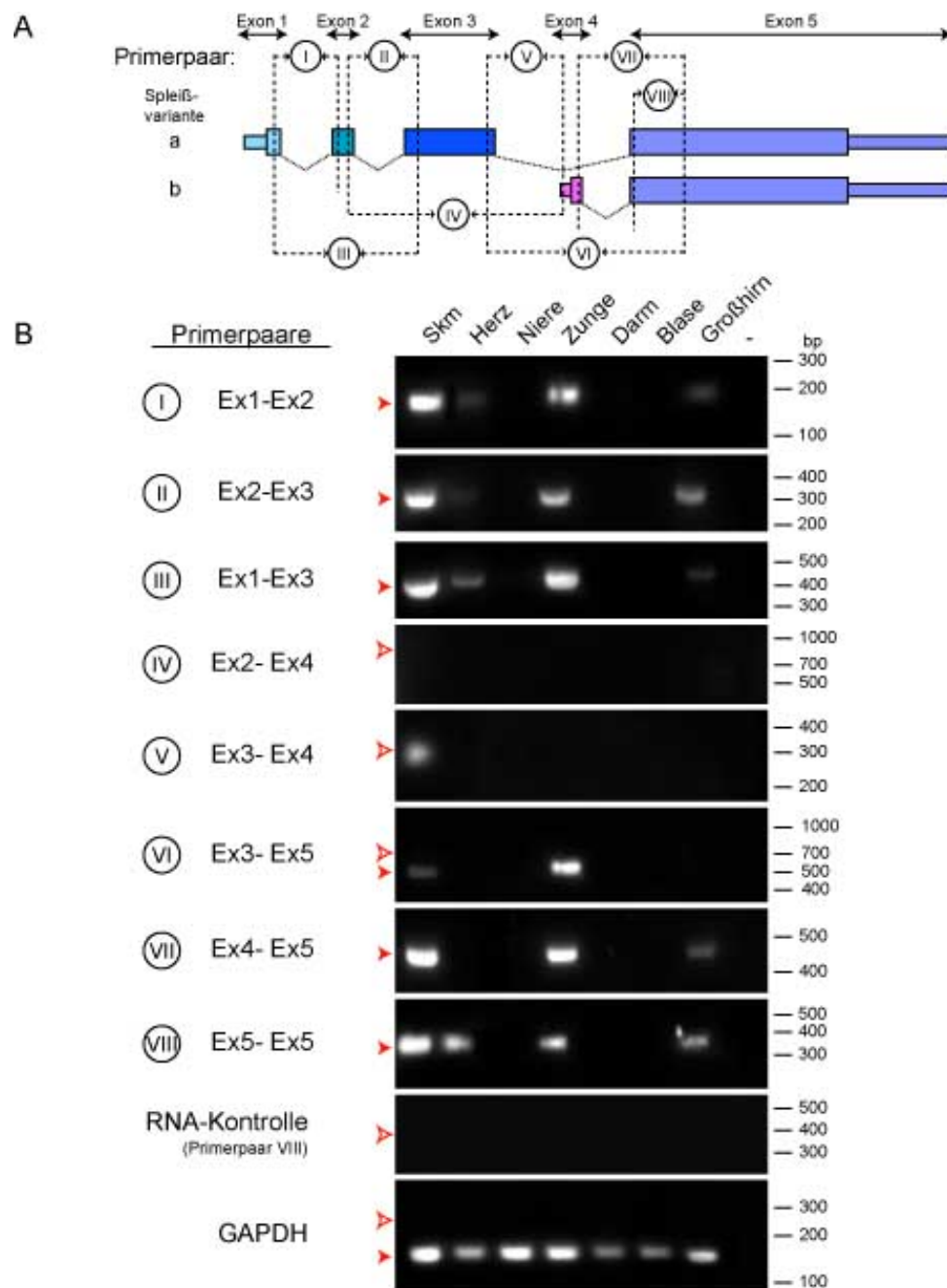


Abbildung 3.9: **Expressionsanalyse muriner Tritopodinvarianten auf mRNA-Ebene.** A: Übersicht der verwendeten Primerpaare für RT-PCR-Experimente zur Amplifikation murinen Tritopodins. Die schwarzen Pfeile zeigen die Lage der Primer, die römischen Zahlen die für RT-PCR-Experimente auf muriner cDNA verwendeten Primerkombinationen. B: Ergebnisse der RT-PCRs zur Amplifikation murinen Tritopodins aus verschiedenen Geweben. Die Primerpaare sind dem Schema zu entnehmen. Tritopodin-mRNA konnte im Skelettmuskel, der Zunge und im Großhirn nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde je eine PCR mit GAPDH spezifischen Primern durchgeführt. Die rot gefüllten Pfeilköpfe geben die erwartete Fragmentgröße an, die nicht gefüllten die Größe alternativer Fragmente. - Kontrollansatz ohne Zugabe von cDNA.

### 3.1.4 Tritopodin ist auf Proteinebene nur in quergestreiften Muskeln nachweisbar

#### 3.1.4.1 Herstellung spezifischer Antikörper gegen Tritopodin

Um die Expression des Tritopodins so detailliert studieren zu können, wie die des Myopodins, wurden Tritopodin-spezifische Antikörper hergestellt. Bei der Expression verschiedener Fragmente zur Immunisierung von Mäusen oder Kaninchen fiel auf, dass Tritopodin extrem proteolyseempfindlich ist (Gläsker, 2009). Dies machte es schwierig, genügend Protein herzustellen, das für die Immunisierungen verwendet werden konnte. Durch die Immunisierung von Kaninchen (Tiernummer 1595 und 1596) mit dem Fragment Trito 1-198 wurde jedoch ein Antikörper (ML1), spezifisch für die langen Isoformen des Tritopodins, generiert (Abb. 3.10). Die Seren wurden wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben auf die Erkennung der antigenen Sequenz getestet, wobei beide Seren starke Reaktivität zeigten (Daten nicht gezeigt). Da das Immunisierungsfragment die PDZ-Domäne des Tritopodins beinhaltet, wurde der Antikörper zusätzlich auf Kreuzreaktivität mit der sehr homologen PDZ-Domäne des Myopodins untersucht. Der MLI-Antikörper zeigte allerdings keine Reaktivität in diesen Western Blots (Albinus, 2008). Die Herstellung

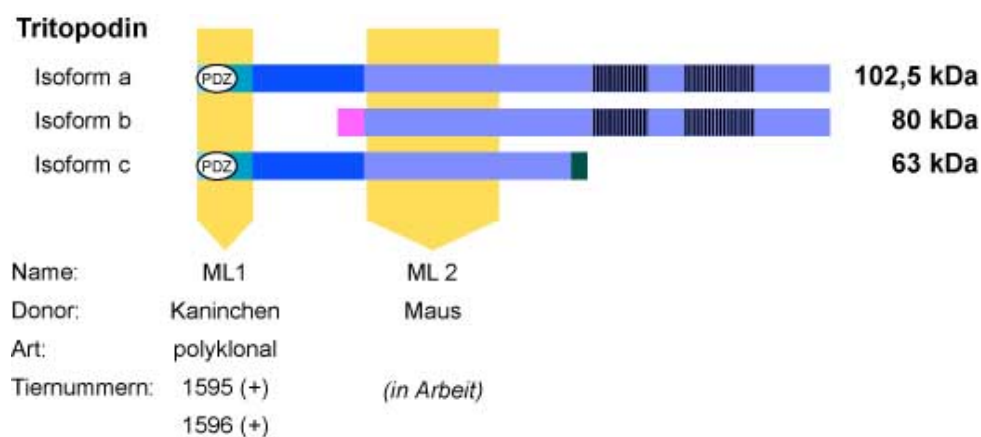


Abbildung 3.10: **Schematische Darstellung der Lage der Epitope der Tritopodinantikörper.** Gezeigt sind die drei putativen Tritopodinisofomen mit der charakteristischen PDZ-Domäne sowie den Podin-Homologiebereichen und den berechneten molekularen Massen. Die Epitope der Antikörper sind mit gelben Balken unterlegt. Die Tabelle gibt Auskunft über den Namen, den Donororganismus, die Art, bzw. Subklasse sowie die Tiernummern der immunisierten Kaninchen. (+) Test des Serums durch einen Western Blot auf dem entsprechenden Antigen positiv, (-) Test des Serums durch einen Western Blot auf dem entsprechenden Antigen negativ.

des pan-Tritopodin-Antikörpers ML2 wurde aufgrund der starken Proteolyse dieses Fragmentes als cDNA mit Hilfe einer sogenannten *gene gun* vorgenommen. Hierzu wurde das Fragment Trito(b) 40-206 in den Vektor pCI TPA kloniert. Die Immunisierungsarbeiten wurden von der *UP Transfer Projektgruppe HYBROTEC* an der Universität Potsdam durchgeführt. Erste Tests mit dem Serum der immunisierten Maus haben bereits viel versprechende Ergebnisse geliefert (Rieck, 2010). Zur Zeit wird an der Fusion zur Erlangung der Hybridomzellen gearbeitet.

### 3.1.4.2 Expressionsanalyse humaner und muriner Tritopodinisoformen auf Proteinebene

Immunblots mit dem ML1-Antikörper aus humanen Gewebeextrakten zeigten die Expression von Tritopodin im Skelettmuskel und im Herzen (Abb. 3.11, A). In der Prostata konnte kein Tritopodin nachgewiesen werden. Im Skelettmuskel betrug die scheinbare molekulare Masse etwa 125 kDa, im Herzen etwa 140 kDa. Diese Größen entsprachen damit zwar nicht den theoretisch berechneten molekularen Massen, aber den Größen die von (Beqqali *et al.*, 2010) beschrieben wurden. Zudem war auch beim Myopodin zu beobachten, dass es in der SDS-Gelelektrophorese deutlich höher läuft als erwartet. Der Nachweis von Tritopodin in murinen Gewebeextrakten zeigte ebenfalls die Expression im Skelett-

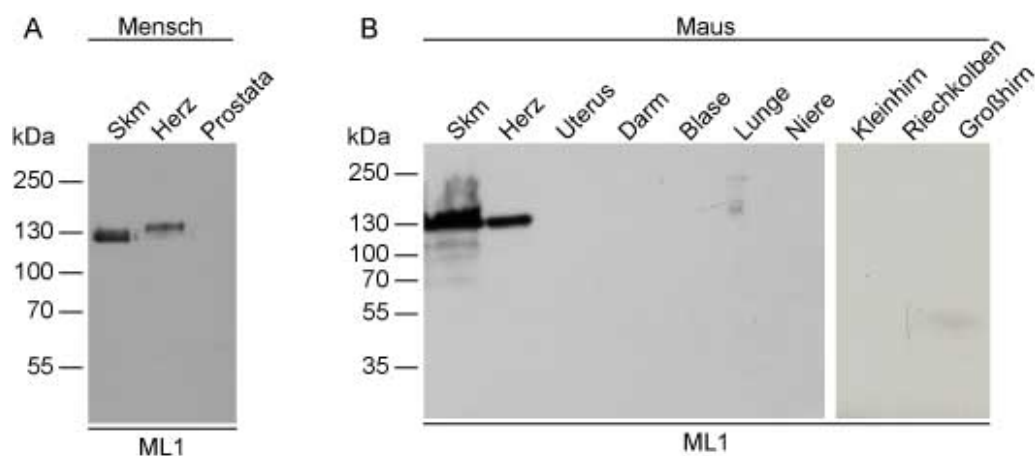


Abbildung 3.11: **Expressionsanalyse humanen und murinen Tritopodins auf Proteinebene.** Western Blots von Extrakten aus humanen (A) und murinen Geweben (B), gefärbt mit dem Antikörper ML1, zeigen die Expression des Tritopodins in quergestreiften Muskelgeweben. Die Zahlen geben die molekularen Massen der Markerproteine in kDa an.

muskel und im Herzen, nicht aber in den anderen getesteten Gewebeextrakten (Abb. 3.11, B). Die scheinbaren Größen betragen in beiden quergestreiften Muskeln etwa 130 kDa. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass Tritopodin spezifisch in quergestreiften Muskelzellen exprimiert wird.

## 3.2 Die Podine während der Muskeldifferenzierung

Die Expression von Myopodin und Tritopodin in adultem Skelettmuskelgewebe, warf die Frage auf, welche Isoformen der Podine wann im Verlauf der Muskeldifferenzierung exprimiert werden. Deshalb wurde die Expression des Myopodins und des Tritopodins auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht. Zudem wurde die Lokalisation der Proteine während der Differenzierung sowie in adulten Geweben über indirekte Immunfluoreszenzstudien bestimmt, wobei als Modellsystem humane Skelettmuskelzellen (Hskm-Zellen) sowie die murine Skelettmuskelzelllinie C2C12 dienten.

### 3.2.1 Myopodin wird bereits in frühen Differenzierungsstadien exprimiert

#### 3.2.1.1 Expressionsanalyse der Myopodinvarianten auf mRNA-Ebene

Um mittels RT-PCR zu untersuchen, wann welche Isoformen in differenzierenden Muskelzellen exprimiert werden, wurde RNA aus Hskm- und C2C12-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien isoliert. Die daraus hergestellte cDNA fand Einsatz in PCR-Experimenten mit verschiedenen Primerpaaren, welche in Abbildung 3.12 A dargestellt sind. An Tag 0 konnte, unabhängig vom Primerpaar, nur sehr wenig PCR-Produkt detektiert werden, mit voranschreitender Differenzierung stieg jedoch die DNA-Menge bei einigen Primerpaaren an (Abb. 3.12, B). Auch hier war, ähnlich wie bei humanem Skelettmuskelgewebe, zu beobachten, dass mit Primerpaaren spezifisch für Exon 1 und 2 nahezu kein PCR-Produkt erhalten werden konnte, während Primerpaare für Exon 3 und 4 vom ersten Tag der Differenzierung an große Mengen amplifizierter cDNA



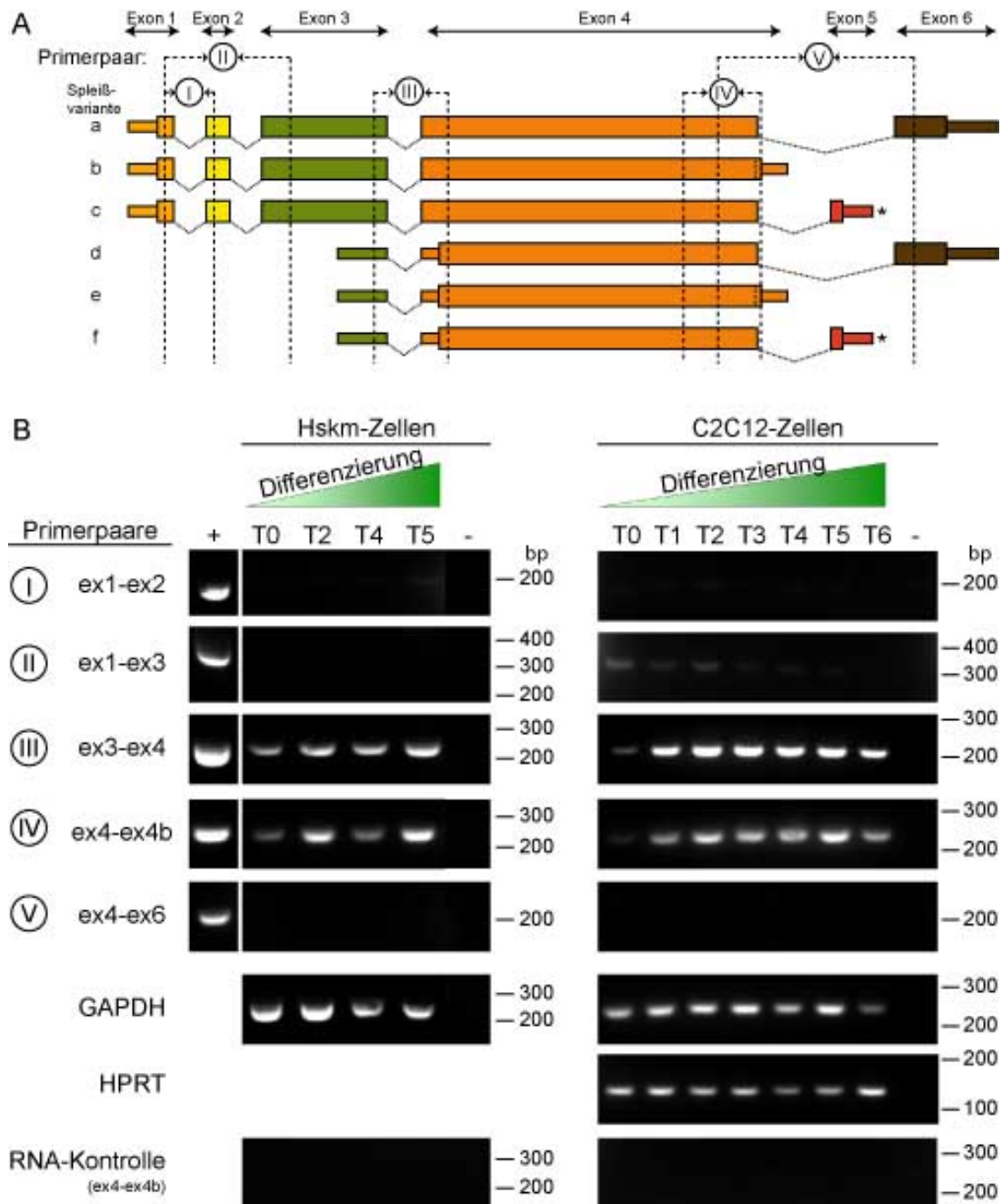


Abbildung 3.12: **Expressionsanalyse verschiedener Myopodinvarianten in differenzierenden Skelettmuskelzellen auf mRNA-Ebene.** A: Übersicht der Position der verwendeten Primerpaare für RT-PCR-Experimente zur Amplifikation verschiedener Myopodinvarianten. \*Isoformen c und f wurden nur für humanes Myopodin gefunden. B: Ergebnisse der RT-PCRs zur Amplifikation von Myopodin aus Hskm-Zellen (linke Spalte) bzw. aus C2C12-Zellen (rechte Spalte) verschiedener Differenzierungsstadien (T = Tag nach Beginn der Differenzierung). Als Positivkontrolle (+) wurde eine PCR mit adäquater Plasmid-DNA durchgeführt, die Negativkontrolle (-) enthielt keine cDNA als Template. Um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen, wurde eine PCR mit RNA als Template durchgeführt (unten). Als Ladekontrollen dienten PCRs mit GAPDH- und HPRT-spezifischen Primern. Die Zahlen geben die Länge des Größenstandards in bp an.

zeigten. Dies bestätigt die Vermutung, dass in humanen und murinen Skelettmuskelzellen hauptsächlich die Myopodinisiforme e exprimiert wird.

### 3.2.1.2 Expressionsanalyse der Myopodinisiformen auf Proteinebene

Zur Analyse der Expression des Myopodins in differenzierenden Muskelzellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung SDS-Totalextrakte von Hskm-Zellen hergestellt, diese über eine SDS-Gelelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Tankblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Immunfärbung des Blots mit dem monoklonalen Myopodinantikörper HH9 zeigte, dass Myopodin zwar nicht in proliferierenden Zellen, aber bereits zu Beginn der Differenzierung („Tag 0“), an dem die Zellen konfluent sind und in einzelnen Bereichen spontane Differenzierung zeigen, nachweisbar war (Abb. 3.13, A). Die Expression des Myopodins stieg mit fortschreitender Differenzierung an. Um eine Vergleichsmöglichkeit zu haben, wurde auch die Expression der muskelspezifischen Proteine  $\alpha$ -Aktinin und Filamin untersucht. Sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin, detektiert mit dem Antikörper A653, konnte ebenso wie Myopodin mit Beginn der Differenzierung nachgewiesen werden, wobei ab dem dritten Tag die Expression anstieg (Abb. 3.13, B). Die Färbung mit dem Filamin C-spezifischen Antikörper  $\alpha$  d1-2 zeigte die Expression ab Tag 1 nach Beginn der Differenzierung (3.13, C). Auch hier wurden mit voranschreitender Differenzierung steigende Mengen Filamin C detektiert. Die Färbung mit dem RR90-Antikörper, der sowohl Filamin A als auch C erkennt, wies Expression von Filamin bereits ab Differenzierungsbeginn nach. Ab Tag 2 nach Beginn der Differenzierung nimmt die Expression des Filamins deutlich zu. Vermutlich ist die frühe Detektion des Filamins auf die Expression von Filamin A und der Expressionsanstieg am Tag 2 auf die zusätzlichen Expression von Filamin C zurückzuführen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression von Myopodin und sarkomerspezifischem  $\alpha$ -Aktinin in ähnlichen Differenzierungsstadien induziert wird, Filamin C hingegen etwa einen Tag später.

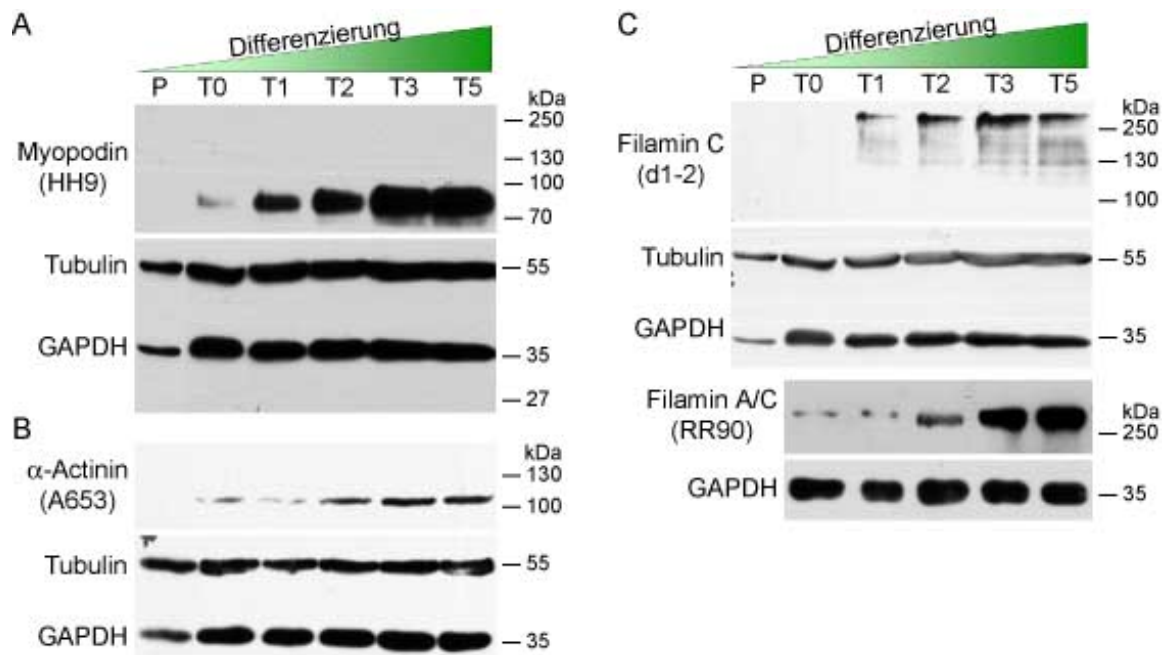


Abbildung 3.13: **Expressionsanalyse von Myopodin in differenzierenden humanen Skelettmuskelzellen durch Western Blots.** Aufgetragen wurden Extrakte aus Hskm-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien: proliferierende Zellen (P), bzw. Tag 0-5 nach Beginn der Differenzierung (T0-5). A: Die Immundetektion von Myopodin zeigt die Expression der 90 kDa Isoform bereits ab Tag 1 nach Beginn der Differenzierung. B: Die Immundetektion von sarkomerspezifischem  $\alpha$ -Aktinin zeigt die Expression ab Tag 1 der Differenzierung. C: Analyse der Expression von Filamin. Die Färbung mit dem Filamin C-spezifischen Antikörper  $\alpha$  FlnC d1-2 zeigt die Expression ab Tag 1 der Differenzierung. Die Färbung mit dem Antikörper RR90 gegen Filamin A und C einer anderen Differenzierungsreihe zeigt bereits ab Beginn der Differenzierung Expression von Filamin A. Die Zahlen geben die molekularen Massen der Markerproteine in kDa an. Als Ladekontrolle dienen Färbungen mit Antikörpern gegen Tubulin und GAPDH.

### 3.2.1.3 Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in differenzierenden Skelettmuskelzellen

Um die Lokalisation des Myopodins über indirekte Immunfluoreszenz in differenzierenden Hskm-Zellen untersuchen zu können, wurden die Zellen auf Deckgläschen herangezogen und differenziert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden diese fixiert und mit den pan-Myopodinantikörpern HH9 und M2 in Kombination mit verschiedenen anderen Antikörpern gegen potentielle Interaktionspartner des Myopodins markiert. Eine ausführliche Studie hierzu wurde bereits von Albinus (2008) vorgelegt. An dieser Stelle werden daher nur die konfokal analysierten Immunfärbungen mit dem monoklonalen Myopodinantikörper HH9 und mit dem sarkomerspezifischen  $\alpha$ -Aktinin-Antikörper A653 gezeigt. In noch undifferenzierten humanen Skelettmuskelzellen (Tag 0) war Myopodin bereits

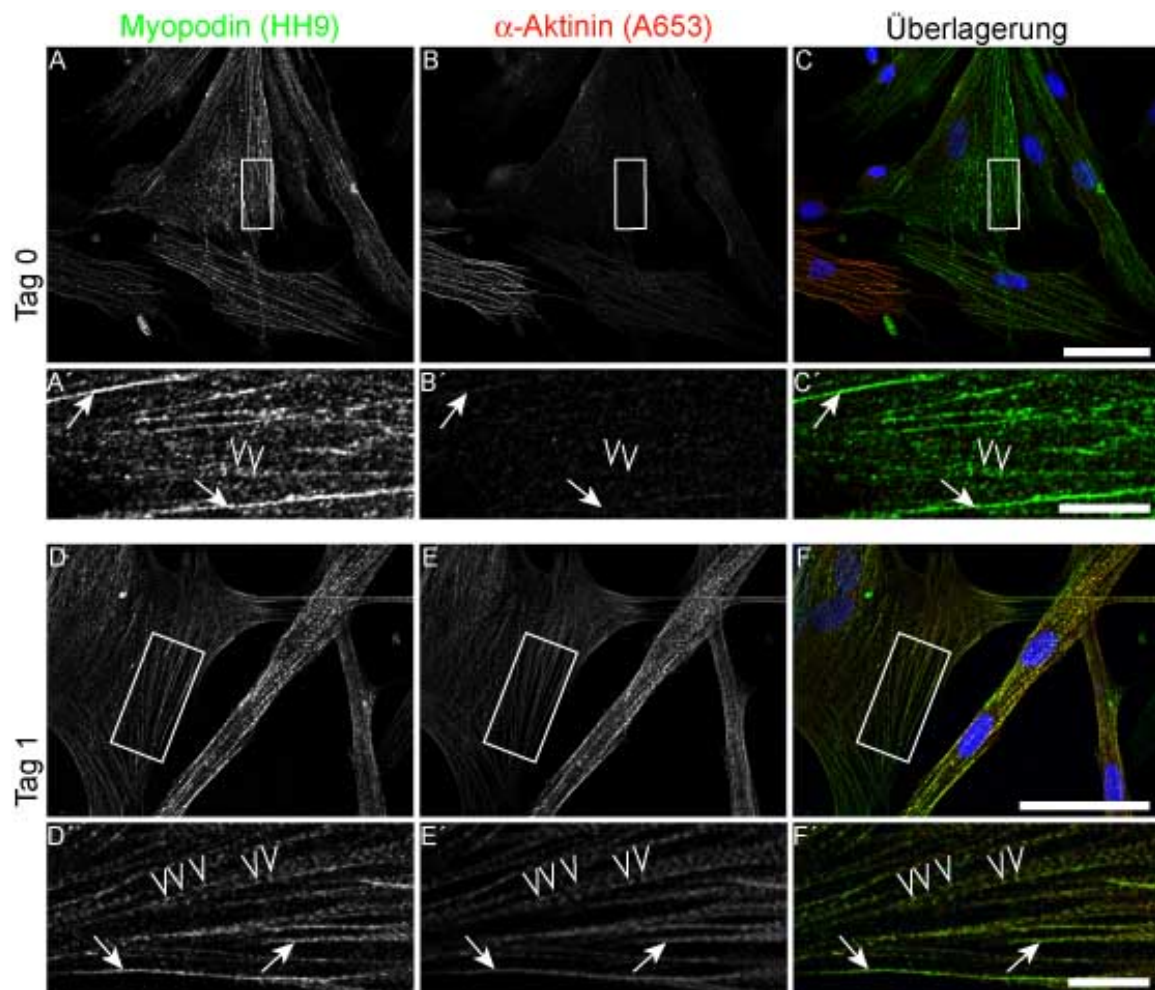


Abbildung 3.14: **Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in Hskm-Zellen früher Differenzierungsstadien.** An Tag 0 der Differenzierung (A, B, C) wird Myopodin bereits exprimiert (A) und ist im Bereich der Stressfasern (Pfeile) sowie in den *Z-bodies* (Pfeilköpfe) lokalisiert, während sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin (B) noch nicht nachweisbar ist. An Tag 1 der Differenzierung (D, E, F) wird dagegen sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin exprimiert (E), das mit Myopodin vollständig im Bereich der Stressfasern sowie in den *Z-bodies* colokalisiert. Die Überlagerungsbilder (C, F) zeigen zudem die Färbung der Zellkerne (blau). Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$ , Detailansicht 10  $\mu\text{m}$ .



Abbildung 3.15: **Statistische Auswertung zur Expression von Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin in undifferenzierten Hskm-Zellen.** Das Auszählen von drei konfokalen Übersichtsbildern zeigte, dass Myopodin in etwa 20 % und sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin in etwa 7 % aller Zellen exprimiert wird. Die statistische Beurteilung durch einen T-Test ergab, dass dieses Ergebnis zweifach signifikant ist.

punktförmig (Abb. 3.14, A bis C, offene Pfeilköpfe), teilweise auch durchgehend entlang von Aktinfasern (Abb. 3.14, A bis C, Pfeile), aber auch diffus im Zytoplasma lokalisiert. Die Gegenfärbung mit einem Antikörper gegen sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin zeigte, dass dieses in den meisten Zellen noch nicht detektierbar war. Die Beobachtung, dass Myopodin und in einzelnen Fällen auch sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin in diesem Differenzierungsstadium exprimiert werden, lässt vermuten, dass diese Zellen nicht mehr reine Myoblasten, sondern dass einzelne Zellen bereits in die Differenzierung eingetreten waren. Trotzdem war auffallend, dass es deutlich mehr Zellen gab, die bereits an Aktinfasern lokalisiertes Myopodin aufwiesen („Myopodin positiv“), als sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin. Um diesen Eindruck zu verifizieren, wurden konfokale Übersichtsbilder hinsichtlich der Myopodin- und sarkomerspezifischen  $\alpha$ -Aktinin-positiven Zellen ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde durch das Zählen der mit DAPI angefärbten Zellkerne bestimmt. Insgesamt wurden 578 Zellen ausgezählt. Die Zählungen ergaben, dass etwa 20 % aller Zellen „Myopodin positiv“ ( $19.81\% \pm 1.533$ ) jedoch nur 7 % „ $\alpha$ -Aktinin positiv“ ( $6.950\% \pm 0.8670$ ) waren. Die statistische Auswertung dieses Ergebnisses anhand eines T-Testes ergab eine zweifache Signifikanz ( $p$ -Wert = 0,0019). Allerdings müssten für eine aussagekräftige Statistik mehrere unabhängige Experimente ausgezählt werden. Einen Tag nach Beginn der Differenzierung zeigten bereits mehrere Zellen die Expression von sarkomerspezifischem  $\alpha$ -Aktinin und Myopodin, welche vor allem punktförmig entlang der Stressfasern, in den

sogenannten *Z-bodies* colokalisierten (Abb. 3.14, D bis F, offene Pfeilköpfe). Die meisten Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt zwei bis drei Zellkerne, einzelne dieser Zellen besaßen bereits eine längliche Form.

Drei Tage nach Beginn der Differenzierung waren die Zellen mehrfach fusioniert und enthielten demzufolge mehrere Zellkerne, die allerdings noch zentral im Zellinneren vorlagen. Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin zeigten weiterhin Colokalisation in den *Z-bodies* (Abb. 3.16, A bis C, offene Pfeilköpfe). Ab dem vierten Tag nach Beginn der Differenzierung waren vereinzelt, vor allem in den Randbereichen der jungen Myotuben, Z-Scheiben-Vorläuferstrukturen zu beobachten (Abb. 3.16, D bis F, Pfeilköpfe). Sowohl  $\alpha$ -Aktinin als auch Myopodin waren in diesen Strukturen zu finden. Die anderen Bereiche der Myotuben wiesen weiterhin die Lokalisation von Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin in den *Z-bodies* entlang der Prämyofibrillen auf (Abb. 3.16, D bis F, offene Pfeilköpfe). Am fünften und damit letzten hier untersuchten Tag der Hskm-Differenzierung waren in einzelnen Myotuben bereits lateral fusionierte Z-Scheiben zu beobachten, wobei  $\alpha$ -Aktinin und Myopodin in diesen Strukturen colokalisierten (Abb. 3.16, G bis H, Pfeilköpfe). Andere Bereiche der selben Myotube zeigten, ähnlich wie Zellen an Tag 3 und 4, eher punktförmige Verteilung der beiden Proteine in Prämyofibrillen (Abb. 3.16, G bis H, offene Pfeilköpfe). Auch die Zellkerne waren zu diesem Zeitpunkt noch im Zellzentrum zu finden. Eine Analyse terminal differenzierter Hskm-Zellen war allerdings nicht möglich, da sich reifere Myotuben vermutlich aufgrund von Kontraktionen von den Deckgläsern ablösten. Während der gesamten Differenzierung war weder mit dem HH9- noch mit dem M2-Antikörper eine Färbung der Zellkerne zu beobachten.

Die Betrachtung der Myotuben zeigte weiterhin, dass innerhalb einer Zelle alle Arten der Aktinstrukturen, die während der Differenzierung zu finden sind, in einer Myotube auftreten können (Abb. 3.17, A). Zu bemerken ist, dass Myopodin stets und vollständig mit  $\alpha$ -Aktinin colokalisierte (Abb. 3.17, B bis S).



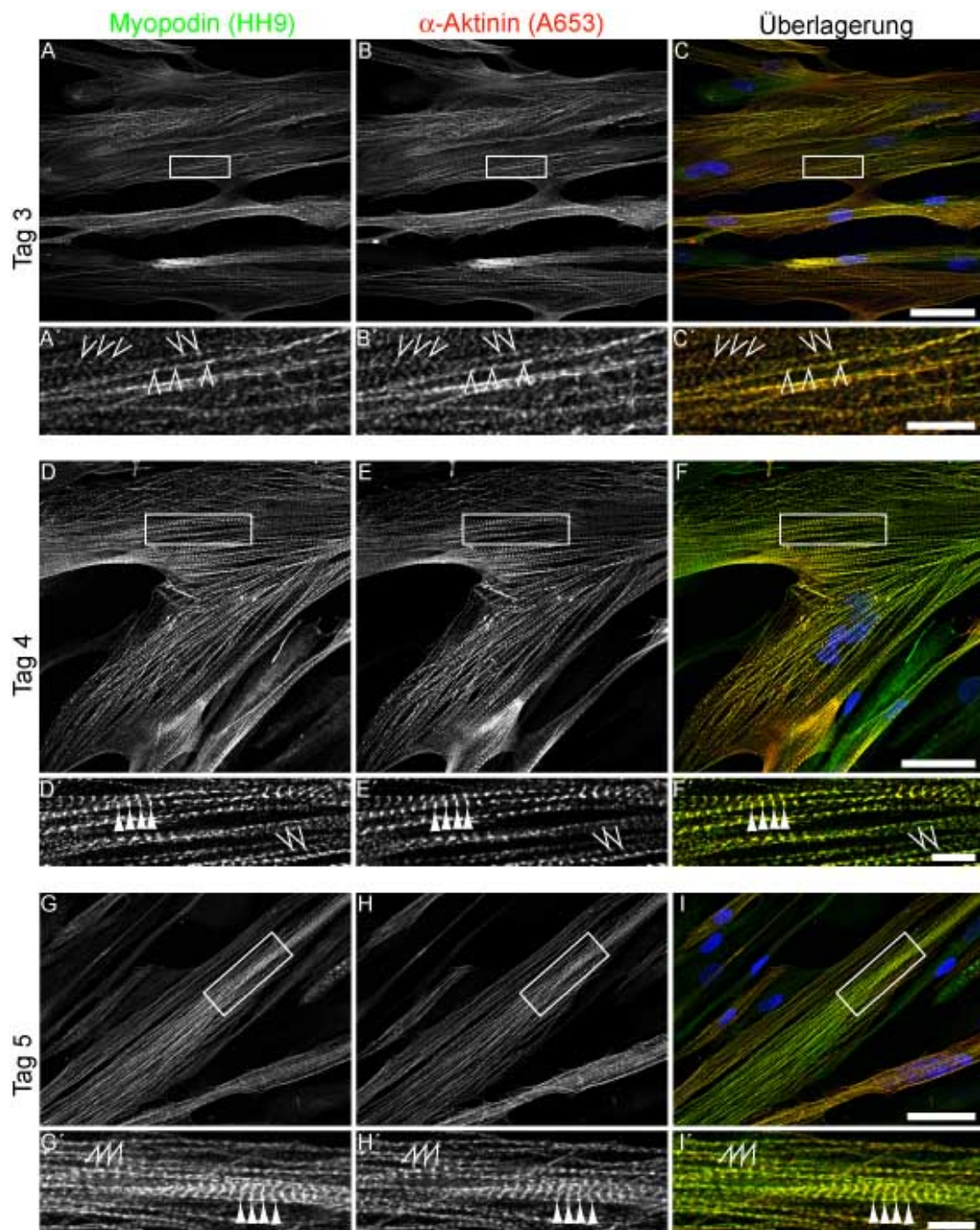


Abbildung 3.16: **Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in Hskm-Zellen später Differenzierungsstadien.** An Tag 3 (A, B, C) und Tag 4 (D, E, F) der Differenzierung ist Myopodin (A, D) in den *Z-bodies* (offene Pfeilköpfe) und in den Z-Scheibenvorläuferstrukturen (Pfeilköpfe) lokalisiert, wo es mit  $\alpha$ -Aktinin (B, E) colokalisiert. An Tag 5 (G, H, I) der Differenzierung colokalisieren Myopodin (G) und  $\alpha$ -Aktinin (H) in den Z-Scheiben (Pfeilköpfe). Die Überlagerungsbilder (C, F, I) zeigen zudem die Färbung der Zellkerne (blau). Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$ , Detailansicht: 10  $\mu\text{m}$ .

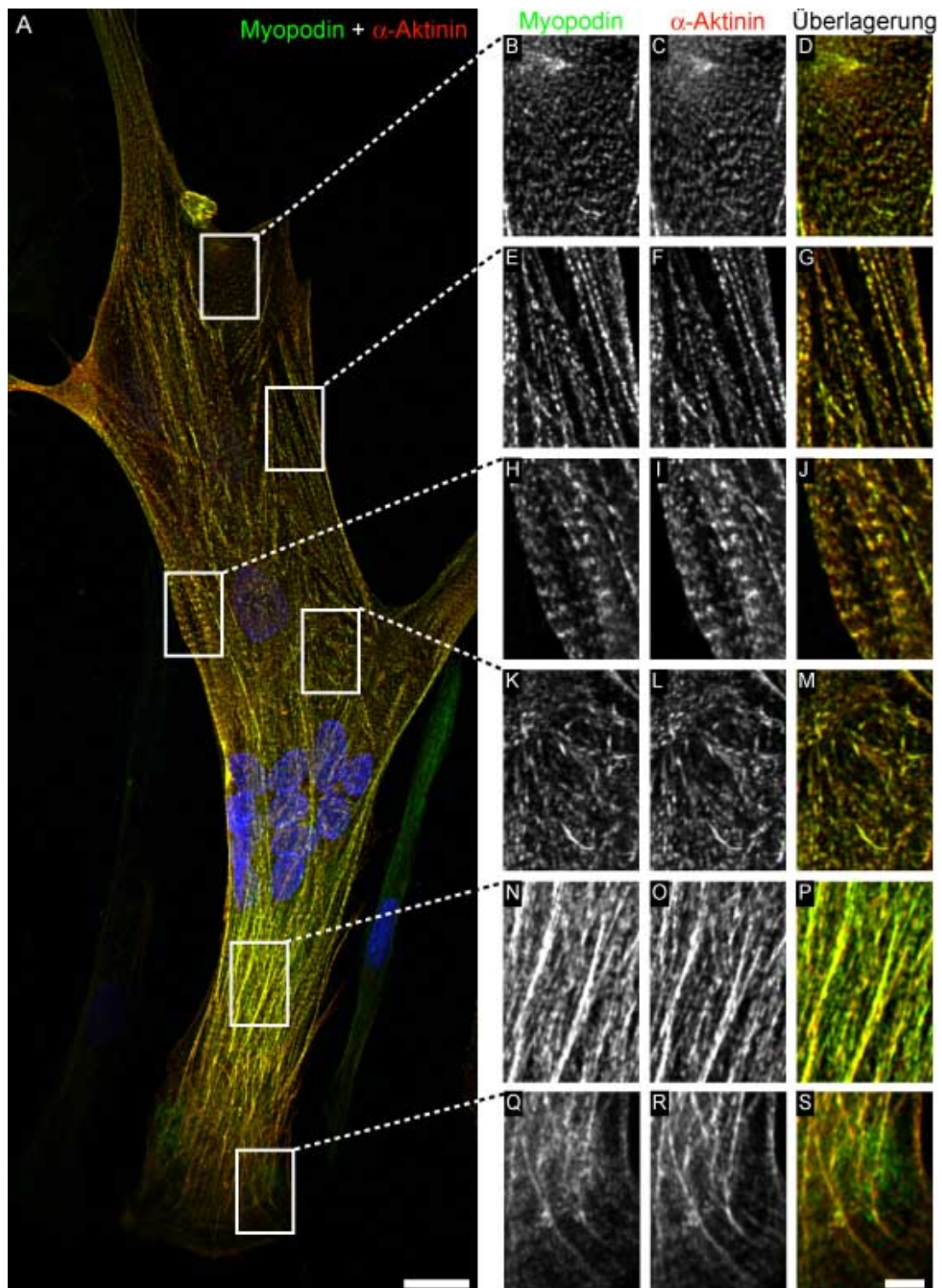


Abbildung 3.17: **Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung einer Hskm-Myotube.** Die Immunfärbung mit dem Myopodinantikörper HH9 (grün) und dem  $\alpha$ -Aktinin-Antikörper A653 (rot) zeigt unterschiedlich weit ausgebildete Bereiche des Kontraktionsapparates (A). Die Detailansichten (B-S), in Einzelkanälen und als Überlagerung dargestellt, zeigen, dass Myopodin immer mit  $\alpha$ -Aktinin colokalisiert. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$  Detailansicht: 5  $\mu\text{m}$ .



Da die Analyse reifer Hskm-Zellen nicht möglich war, wurden zusätzlich Differenzierungsreihen mit C2C12-Zellen gemacht. C2C12-Zellen wiesen im Vergleich zu Hskm-Zellen in undifferenzierten und in frühen Differenzierungsstadien ein wesentlich schlechter ausgebildetes Aktinzytoskelett auf. Dennoch konnte prinzipiell eine ähnliche Lokalisation des Myopodins wie in Hskm-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.18). In undifferenzierten C2C12-Zellen zeigte Myopodin noch eine zufällige punktförmige Lokalisation im Zytoplasma (Abb. 3.18, A bis C), aber schon ab Tag 1 nach Beginn der Differenzierung war es zusammen mit  $\alpha$ -Aktinin entlang der Stressfasern zu finden (Abb. 3.18, D bis F). Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen zumeist noch einkernig, wiesen aber bereits eine gestreckte Form auf. An Tag 3 nach Beginn der Differenzierung konnten erste fusionierte Zellen, also junge Myotuben mit Prämyofibrillen beobachtet werden (Abb. 3.18, G bis I). Zu diesem Zeitpunkt colokalisierten  $\alpha$ -Aktinin und Myopodin teils punktförmig (offene Pfeilköpfe), teils aber auch durchgängig (Pfeile) entlang der Prämyofibrillen. Ab Tag 5 der Differenzierung fanden sich junge Myotuben mit sogenannten *Z-bodies* und Z-Scheiben-Vorläuferstrukturen, wobei Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin in diesen Strukturen colokalisierten (Abb. 3.19, A bis C, offene Pfeilköpfe). Ab Tag 6 der Differenzierung waren terminal differenzierte, kontrahierende Myotuben, zu beobachten, in welchen sowohl Myopodin als auch  $\alpha$ -Aktinin in den Z-Scheiben lokalisiert waren (Abb. 3.19, D bis F, Pfeilköpfe).

Auch in differenzierten H2k-Zellen, welche ebenso wie C2C12-Zellen eine murine Skelettmuskelzelllinie darstellen, wurde die Colokalisation von Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin beobachtet. In Myotuben, die noch nicht terminal differenzierte Bereiche aufwiesen, waren Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin in punktförmigen Strukturen entlang der Aktinfilamente colokalisiert (Abb. 3.20, A bis C). In terminal differenzierten Myotuben waren beide Proteine in den Z-Scheiben zu finden (Abb. 3.20, D bis F).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin in allen untersuchten Skelettmuskelzelltypen eine ähnliche Verteilung zeigten und in jedem Differenzierungsstadium colokalisierten. Myopodin konnte zu keinem Differenzierungszeitpunkt in keiner der getesteten Zelllinie im Zellkern nachgewiesen werden.

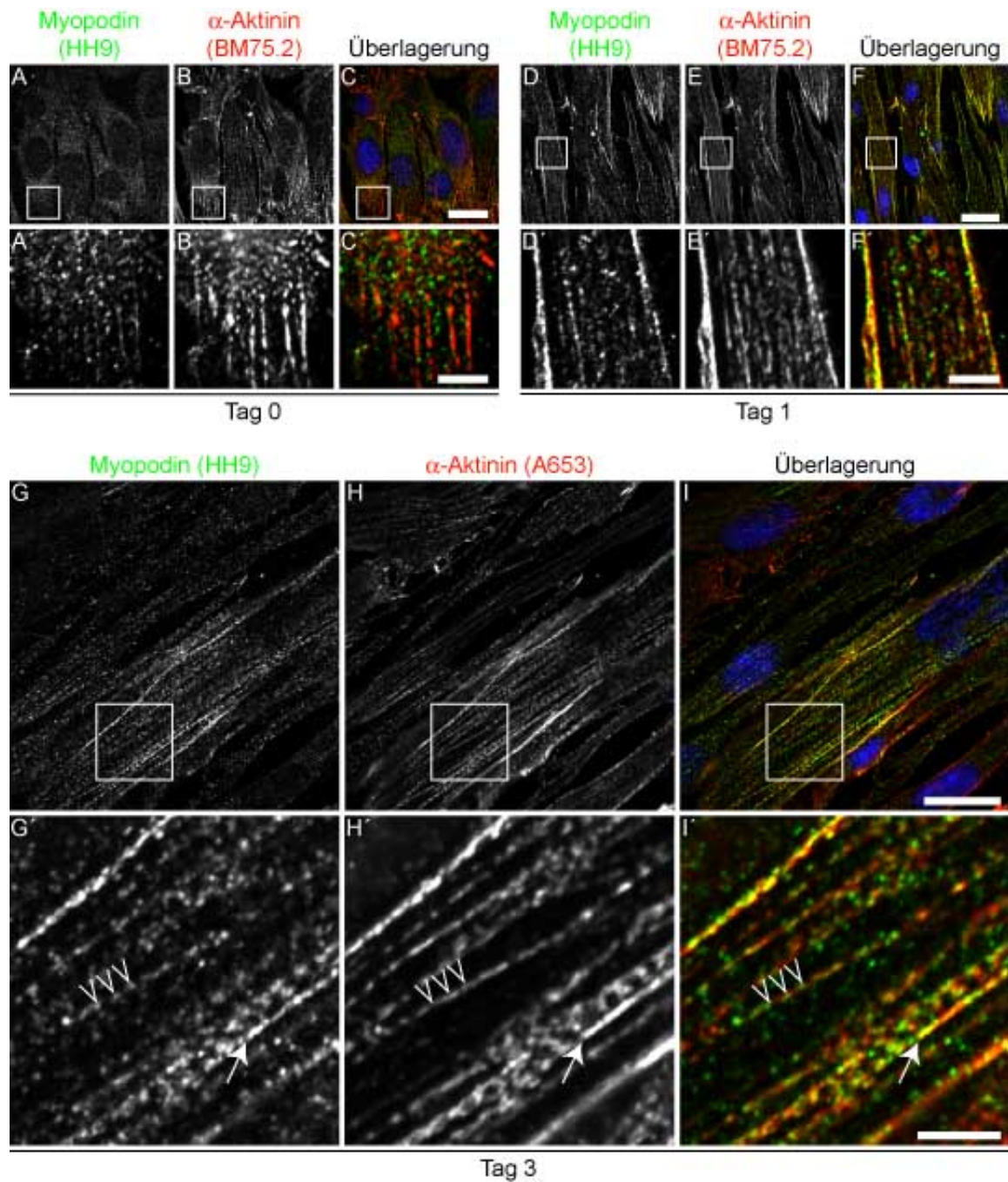


Abbildung 3.18: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in C2C12-Zellen früher Differenzierungsstadien. In undifferenzierten C2C12-Zellen (A, B, C) zeigt Myopodin (A) überwiegend eine punktförmige Verteilung im Zytoplasma, während die Färbung mit dem pan- $\alpha$ -Aktinin-Antikörper BM75.2 (B) die punktförmige Lokalisation entlang der Stressfasern und in den Fokalkontakten zeigt. An Tag 1 der Differenzierung (D, E, F) zeigt Myopodin (D) Colokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin (E) im Bereich der Stressfasern sowie den *Z-bodies*. An Tag 3 der Differenzierung (G, H, I) colokalisieren Myopodin (G) und sarkomerspezifischem  $\alpha$ -Aktinin (H) im Bereich der Stressfasern sowie den *Z-bodies*. Die Überlagerungsbilder (C, F, I) zeigen zudem die Färbung der Zellkerne (blau). Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detailansicht 5  $\mu\text{m}$ .

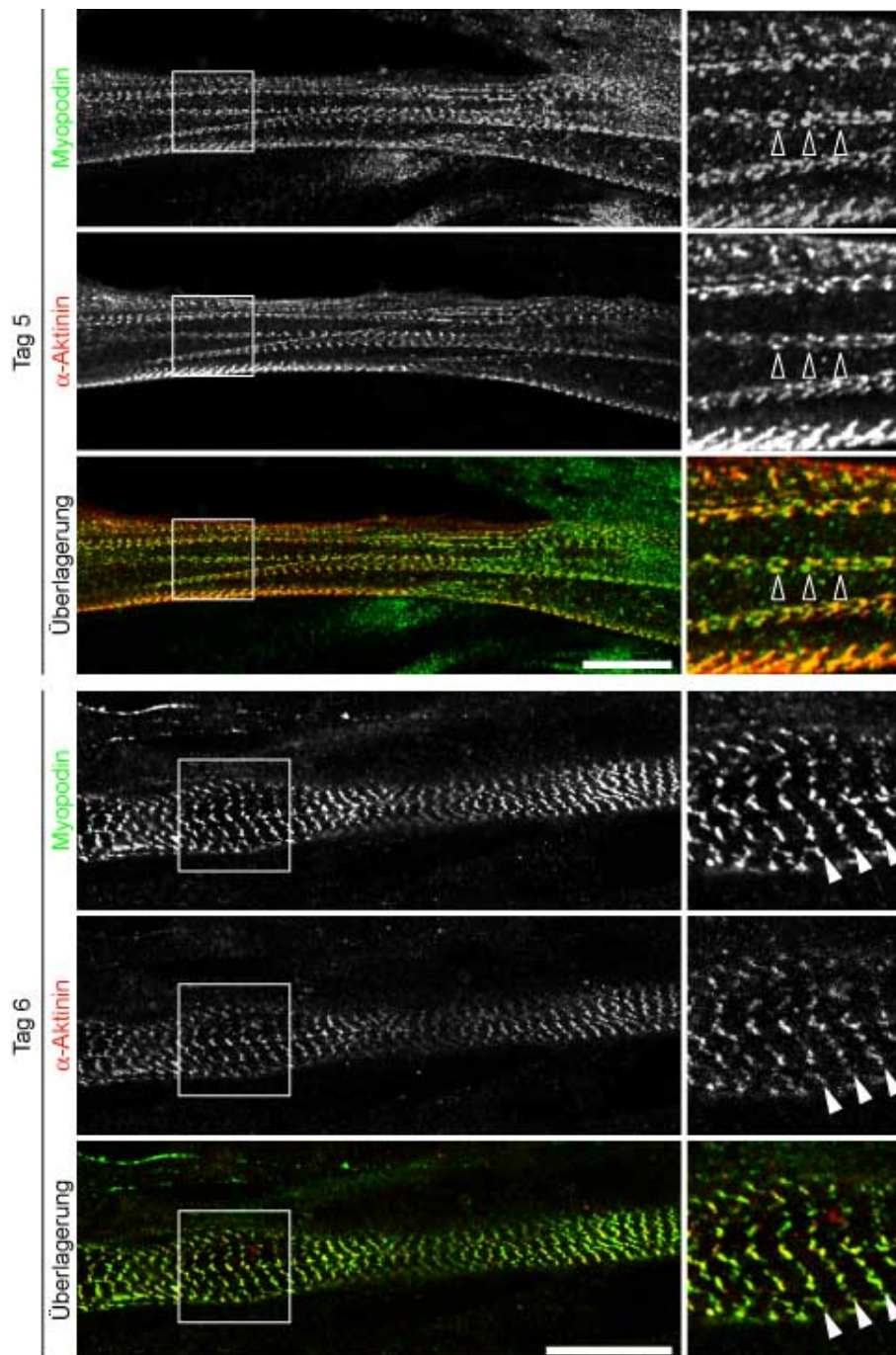


Abbildung 3.19: **Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in C2C12-Zellen später Differenzierungsstadien.** An Tag 4 (A, B, C) und Tag 5 (D, E, F) der Differenzierung zeigt Myopodin (A, D) Colokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin (E, F) im Bereich der Z-Scheibenvorläuferstrukturen (offene Pfeilköpfe) sowie den Z-Scheiben (Pfeilköpfe). Die Überlagerungsbilder (C, F) zeigen zudem die Färbung der Zellkerne (blau). Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detailansicht 5  $\mu\text{m}$ .



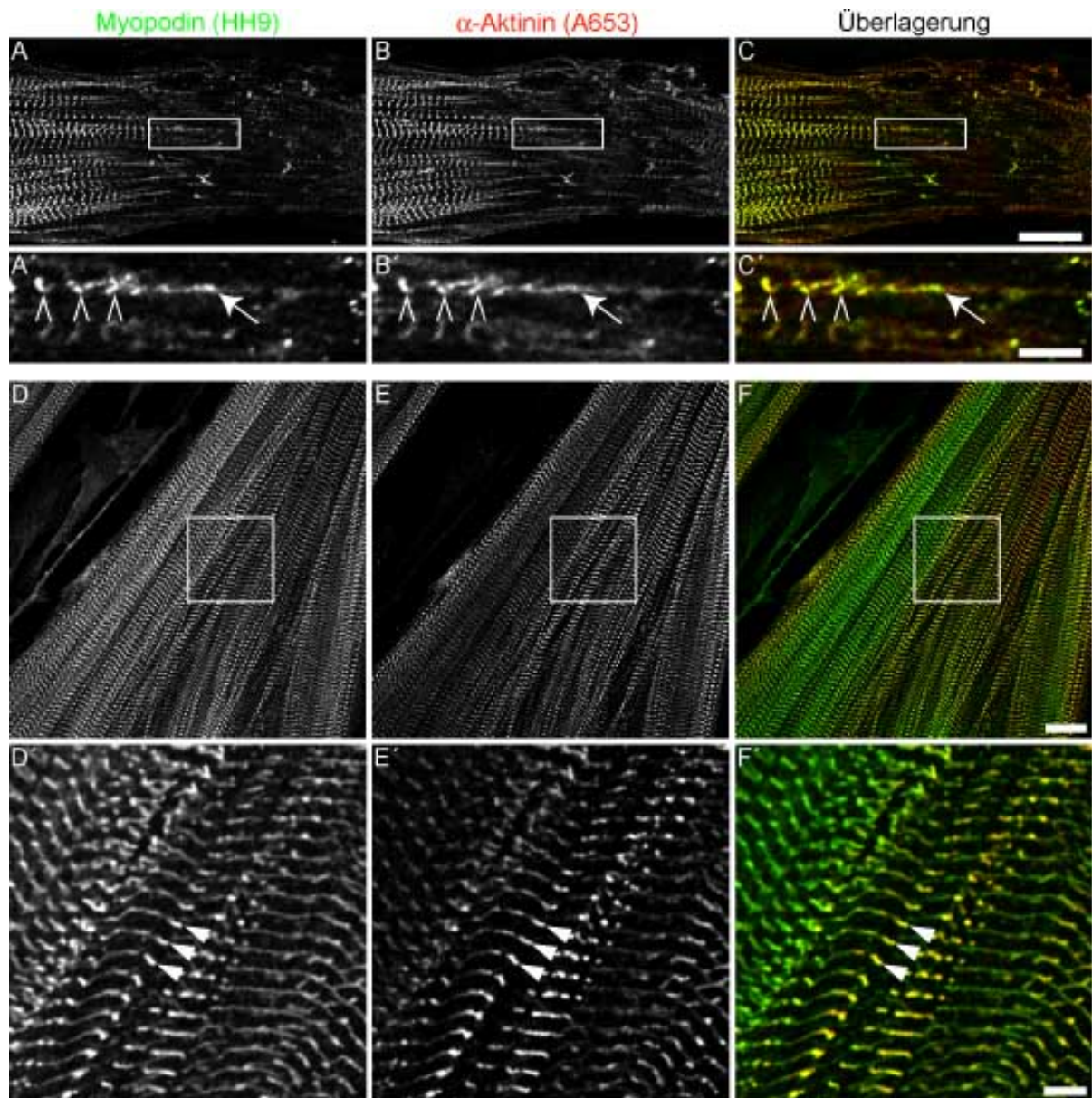


Abbildung 3.20: **Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in H2k-Zellen später Differenzierungsstadien.** Sowohl in noch nicht vollständig differenzierten Bereichen (A, B, C) als auch in terminal differenzierten Bereichen (D, E, F) zeigt Myopodin (A, D) vollständige Colokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin (B, E) im Bereich der Stressfasern (Pfeile), den Z-Scheibenvorläuferstrukturen (offene Pfeilköpfe) sowie den Z-Scheiben (Pfeilköpfe). Die Überlagerungsbilder (C, F, I) zeigen zudem die Färbung der Zellkerne (blau). Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detailansicht 5  $\mu\text{m}$ .

## 3.2.2 Tritopodin wird ebenfalls in frühen Differenzierungsstadien exprimiert

### 3.2.2.1 Analyse der Tritopodinvarianten auf mRNA-Ebene

Zur Untersuchung der Expression von Tritopodinisoformen während der Muskeldifferenzierung wurde, wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben, cDNA aus Hskm- und C2C12-Zellen als Matrize in PCR-Experimenten eingesetzt. Die verwendeten Primerpaarkombinationen sind schematisch in Abbildung 3.21, A dargestellt.

Die RT-PCRs zeigten, dass Tritopodin ab Tag 1 nach Beginn der Differenzierung sowohl in Hskm- als auch in C2C12-Zellen exprimiert wird (Abb. 3.21, B). Die meisten Primerkombinationen zeigten auch mit voranschreitender Differenzierung einen Anstieg der Expressionslevel. Der scheinbare Abfall der Expressionslevel in C2C12-Zellen ab Tag 5 nach Beginn der Differenzierung ist vermutlich auf das Ablösen von kontrahierenden Myotuben vom Substrat zurückzuführen. Somit sinkt der Anteil an differenzierten Zellen, was sich in einem scheinbar sinkenden Expressionslevel der muskelspezifischen Transkripte auswirkt.

Da mit den Primerpaaren I, II, III und VII in beiden Zelllinien PCR-Produkte erhalten werden konnten und die Amplifikation mit Primerpaar V von Exon 3 zu Exon 5 zeigt, dass das Exon 4 nicht beinhaltet ist, kann geschlossen werden, dass die Tritopodinvariante a exprimiert wird. Mit Primerpaar VIII konnte mit cDNA aus Hskm-Zellen kein PCR-Produkt erhalten werden, die Expression der Tritopodinvariante c kann also ausgeschlossen werden. Da mit Primerpaar VI, welches der Amplifikation von Exon 4 und 5 diente, sowohl in Hskm-Zellen, als auch in C2C12-Zellen, ein PCR-Produkt der erwarteten Größe erhalten werden konnte, ist hiermit die Expression der Variante b ebenfalls nachgewiesen. Allerdings konnte auch mit Primerpaar IV, welches der Amplifikation von Exon 3 zu Exon 4 diente, ein PCR-Produkt erhalten werden. Zudem zeigte die Klonierung dieses Fragmentes und anschließende Sequenzierung, dass Exon 3 und 4 in C2C12-Zellen exprimiert werden (Rieck, 2010).

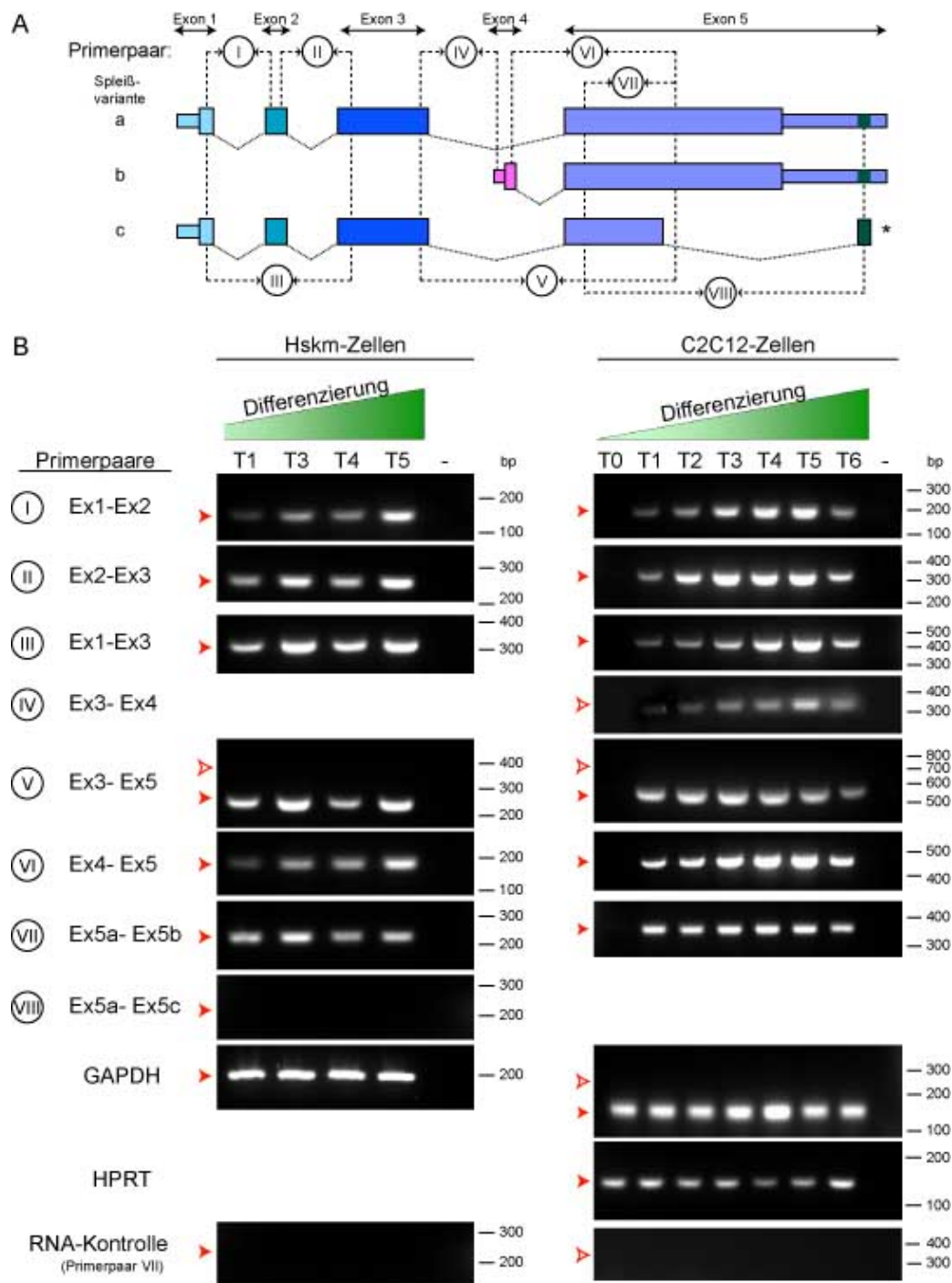


Abbildung 3.21: **Expressionsanalyse von Tritopodin in differenzierenden Skelettmuskelzellen auf mRNA-Ebene.** A: Übersicht der Lage der verwendeten Primerpaare für RT-PCR-Experimente zur Amplifikation verschiedener Tritopodinvarianten. \*Isoform c wurde nur für humanes Tritopodin gefunden. B: Ergebnisse der RT-PCRs zur Amplifikation humanen Tritopodins aus Hskm-Zellen (linke Spalte) bzw. murinen Tritopodins aus C2C12-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien. Die roten gefüllten Pfeilköpfe geben die Laufhöhe des erwarteten PCR-Fragmentes an, die ungefüllten Pfeilköpfe alternativ mögliche PCR-Fragmente. (-) Negativkontrolle ohne Zugabe von cDNA. Als Ladekontrollen dienen PCR-Ansätze mit GAPDH- und HPRT-spezifischen Primern. Die Zahlen geben die Länge des Größenstandards in bp an.

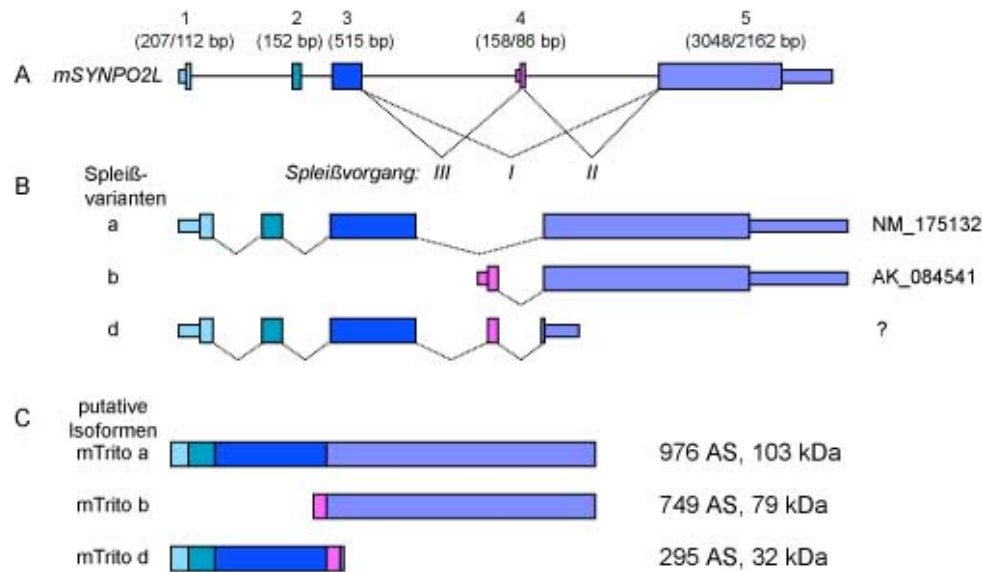


Abbildung 3.22: **Schematische Darstellung aller putativer muriner Tritopodinisoformen.** A: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur des *SYNPO2L*-Gens. B: mRNA-Varianten mit entsprechenden Referenzsequenzen, inklusive der putativen Variante d, welche aus einem alternativen Spleißvorgang von Exon 3 zu Exon 4 resultiert. C: Protein-Isoformen mit Angabe der Länge der Proteinkette (AS, Aminosäuren) sowie den aus der Aminosäurezusammensetzung berechneten molekularen Massen für murines Tritopodin. Neben den Isoformen a und b, die auch für humanes Tritopodin vorhergesagt wurden, ist die Isoform mTrito d dargestellt, die eine molekulare Masse von 32 kDa besitzt.

Sequenzanalysen zeigten, dass dieser Spleißvorgang von Exon 3 zu Exon 4 in eine Isoform von 32 kDa, kodiert von Exon 1 bis 5, resultiert, wobei die Expression des vierten Exon zu einer Verschiebung des Leserasters im Exon 5 führt, was zu einem frühen Translationsstopp nach 12 AS führt. Eine schematische Darstellung der drei putativen murinen Tritopodinisoformen a, b und d zeigt Abbildung 3.22, wobei die neue Isoform „d“ genannt wurde, um Verwechslungen mit der humanen Isoform c zu vermeiden. Die mRNA-Sequenz der Tritopodinisoform d befindet sich im Anhang (C.2).

### 3.2.2.2 Analyse der Tritopodinvarianten auf Proteinebene

Um zu ermitteln, wann welche Tritopodinisoform in differenzierenden Hskm- und C2C12-Zellen auf Proteinebene exprimiert wird, wurden wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben SDS-Totalextrakte gemacht, diese elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Tankblotverfahren auf Nitrozellulosemembran überführt. Für die Färbung stand der polyklonale Tritopodinantikörper ML1 zur Verfügung, welcher die langen Isoformen

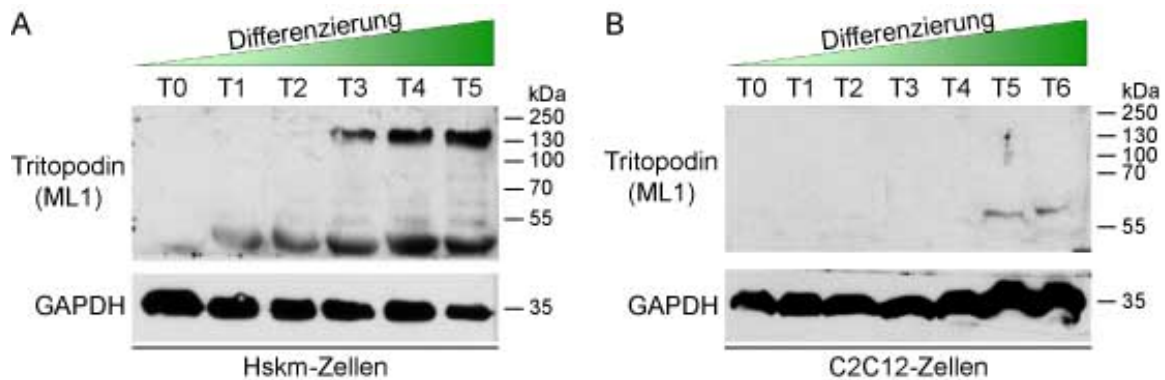


Abbildung 3.23: **Expressionsanalyse von Tritopodin in differenzierenden Skelettmuskelzellen auf Proteinebene.** Immunoblots von SDS-Totalextrakten aus Hskm-Zellen (A) bzw. C2C12-Zellen (B) verschiedener Differenzierungsstadien. Der obere Teil der Blots wurde mit dem ML1-Antikörper gegen Tritopodin gefärbt, der untere Teil zur Ladegesteuerung mit einem Antikörper gegen GAPDH. A: Die erwartete Tritopodinbande von etwa 140 kDa konnte ab Tag 3 nach Beginn der Differenzierung nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte ab Tag 1 nach Beginn der Differenzierung eine Bande von etwa 45 kDa detektiert werden. B: Die erwartete Tritopodinbande von etwa 140 kDa konnte nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte an Tag 5 und 6 nach Beginn der Differenzierung eine Bande von etwa 60 kDa detektiert werden. Die Zahlen geben die molare Massen der Markerproteine in kDa an. (T = Tag nach Beginn der Differenzierung)

a und c erkennt, zum Nachweis der Isoform b fehlte ein entsprechender Antikörper. Die Färbung der Extrakte der Hskm-Differenzierungsreihe mit dem ML1-Antikörper zeigte steigende Tritopodinexpression ab Tag 3 nach Beginn der Differenzierung (Abb. 3.23, A). Die Proteingröße von etwa 125-130 kDa entspricht den Beobachtungen, die im adulten humanen und murinen Skelettmuskel gemacht wurden (vgl. Abbildung 3.11). Da anhand von RT-PCRs die Expression der Isoform c ausgeschlossen werden konnte, stellt die beobachtete Bande von 130 kDa mit großer Wahrscheinlichkeit die Tritopodinisoform a dar. Zusätzlich konnte eine Bande von etwa 40 kDa ab Tag 1 nach Beginn der Differenzierung nachgewiesen werden. Auch hier schien die Expression mit fortschreitender Differenzierung anzusteigen.

In Extrakten aus differenzierenden C2C12-Zellen konnte die erwartete Bande von 130 kDa nicht detektiert werden (Abb. 3.23, B). Zwar trat an Tag 5 und 6 nach Beginn der Differenzierung eine Bande von etwa 60 kDa auf, diese entspricht aber keiner der vorhergesagten Isoformen a, b oder c. Allerdings zeigten RT-PCR-Experimente mit cDNA differenzierender C2C12-Zellen (siehe Abschnitt 3.2.2.1), dass es möglicherweise eine dritte Isoform von 32 kDa geben könnte. Berücksichtigt man das abnormale



Laufverhalten in der SDS-Gelelektrophorese, so könnte die 40 kDa der Hskm-Zellen oder die 60 kDa Bande der C2C12-Zellen diese Isoform darstellen. Fraglich ist allerdings, warum diese Isoform nicht im Skelettmuskelgewebe detektiert werden konnte. Eventuell handelt es sich hierbei auch um eine Kreuzreaktion des ML1-Antikörpers.

### 3.2.2.3 Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin in differenzierenden Skelettmuskelzellen

Um die Lokalisation des Tritopodins über indirekte Immunfluoreszenz in Hskm-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien untersuchen zu können, wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben, vorbereitet und anschließend mit dem polyklonalen Tritopodinantikörper ML1 gefärbt. Für die Doppelfärbung wurde der Antikörper EA53 gewählt, der sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin erkennt.

In undifferenzierten Hskm-Zellen zeigte Tritopodin überwiegend eine diffuse Verteilung im Zytoplasma (Daten nicht gezeigt, siehe auch Albinus (2008)), aber bereits einen Tag nach Beginn der Differenzierung war Tritopodin zusammen mit  $\alpha$ -Aktinin punktförmig entlang der Stressfasern in den *Z-bodies* zu beobachten (Abb. 3.24, A bis C, offene Pfeilköpfe). Auffallend war zudem die perinukleäre Verteilung des Tritopodins (Abb. 3.24, A bis C, Doppelpfeil). Bei höherer Vergrößerung war zu erkennen, dass es im Bereich der Kernhülle lokalisiert war, ob außen oder innen ist anhand dieser Färbungen nicht zu entscheiden. Diese Lokalisation wurde auch von Beqqali *et al.* (2010) in embryonalen Cardiomyozyten beschrieben. Mit voranschreitender Differenzierung zeigte Tritopodin weiterhin Lokalisation in den *Z-bodies* der Prämyofibrillen sowie die nukleäre Verteilung (Abb. 3.24, D bis F, offene Pfeilköpfe, Doppelpfeile).

In den fortgeschrittenen Differenzierungsstadien konnte Tritopodin in den Z-Scheiben-Vorläuferstrukturen (Abb. 3.25, A bis C, offene Pfeilköpfe) und schließlich in den terminal differenzierten Z-Scheiben beobachtet werden (Abb. 3.25, D bis F, Pfeilköpfe). Auch in diesen Stadien wurde Tritopodin zudem im Bereich der Kernhülle (Doppelpfeile) gefunden.

Tritopodin zeigte also, ebenso wie Myopodin, während der gesamten Differenzierung

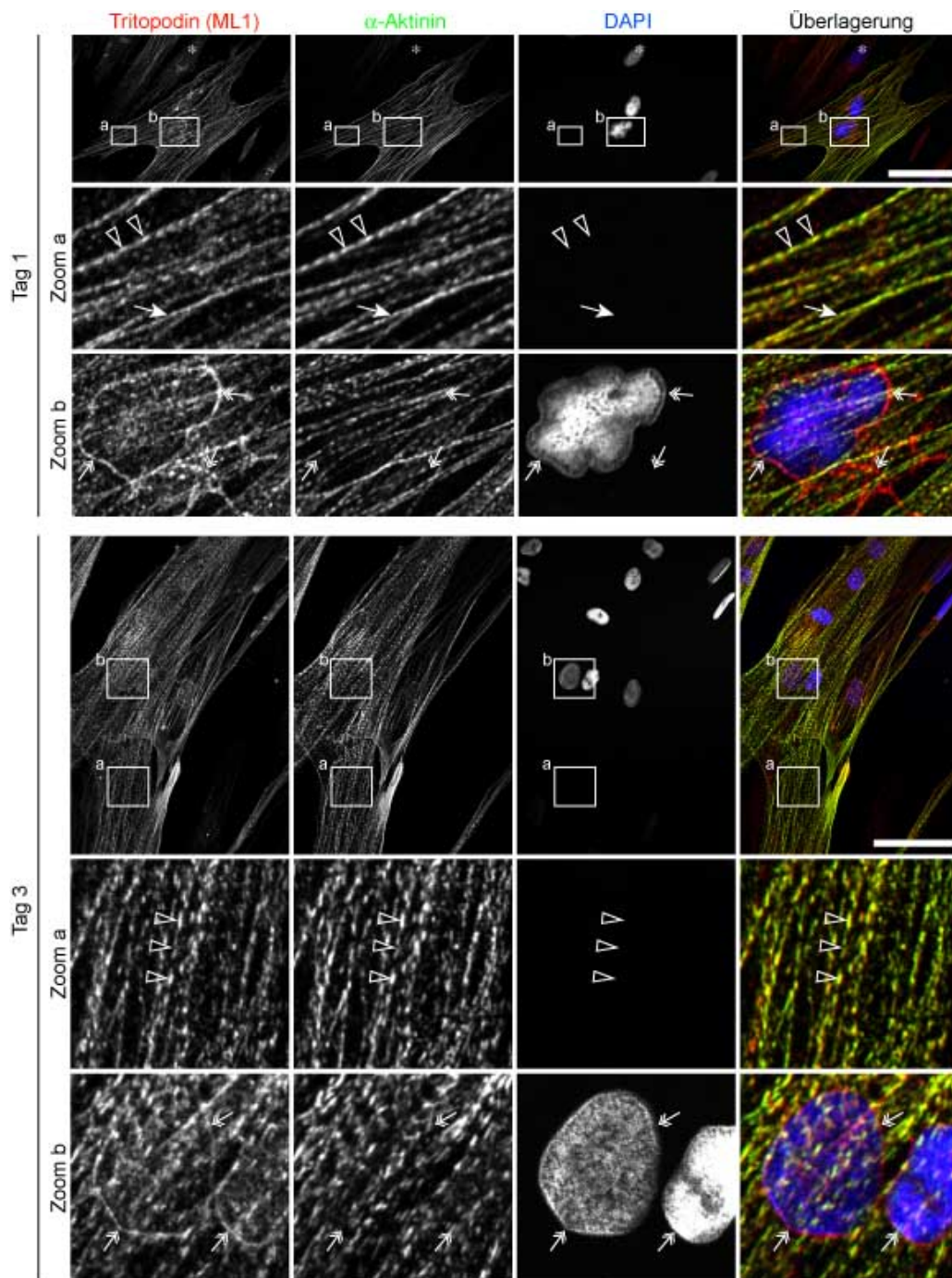


Abbildung 3.24: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin in Hskm-Zellen früher Differenzierungsstadien. An Tag 1 (A bis D) und Tag 3 (E bis H) der Differenzierung zeigt Tritopodin (A, E) Lokalisation im Bereich der Stressfasern (Pfeile) und in den *Z-bodies* (Pfeilköpfe), wo es mit sarkomerspezifischen  $\alpha$ -Aktinin (B, F) colokalisiert. Zusätzlich ist Tritopodin im Bereich der Kernhülle lokalisiert (Doppelpfeile). Die Überlagerungsbilder (D, H) zeigen zudem die Färbung der Zellkerne (blau). Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detailansicht 5  $\mu\text{m}$ .

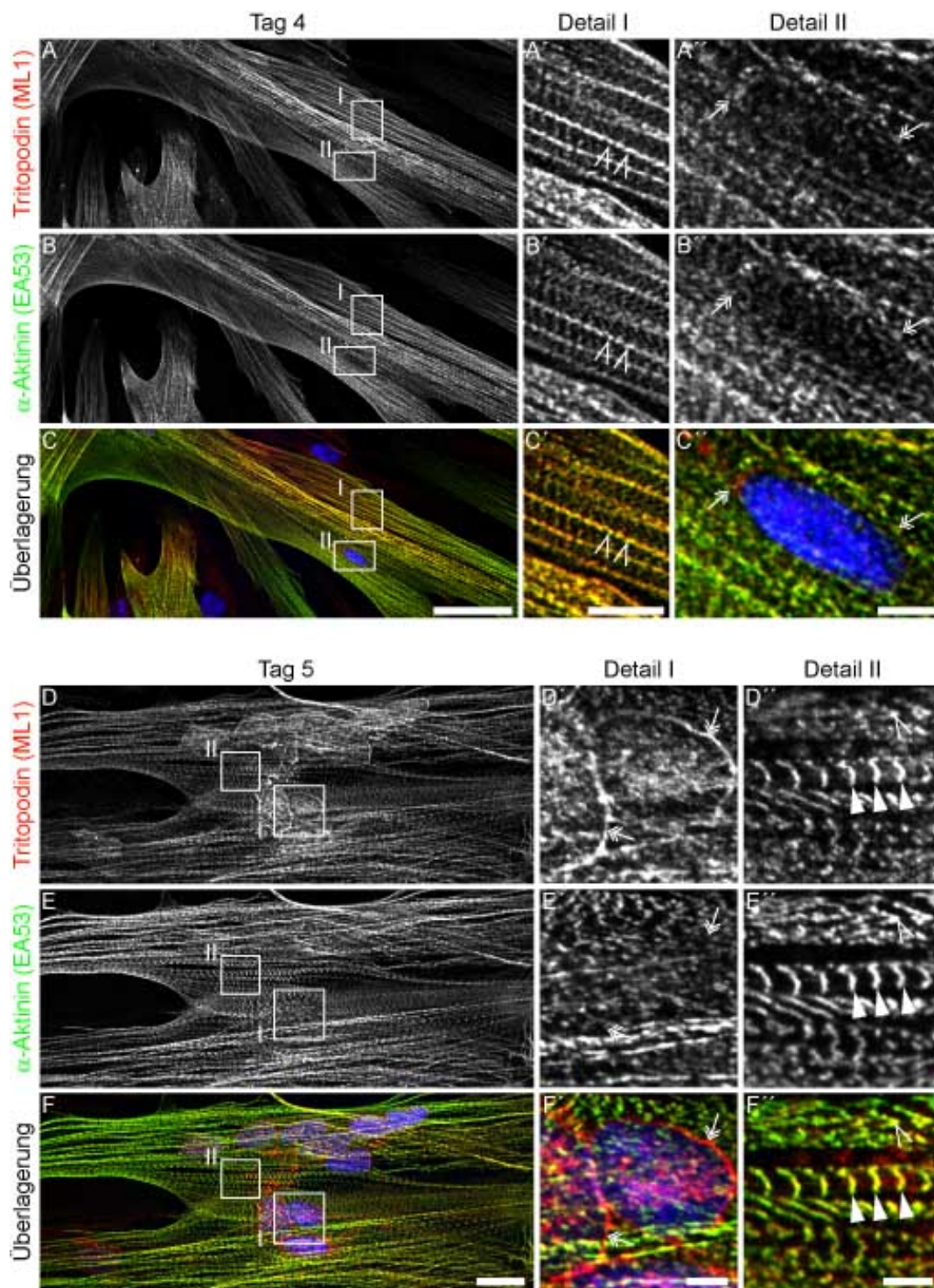


Abbildung 3.25: **Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin in Hskm-Zellen später Differenzierungsstadien.** An Tag 4 (A, B, C) der Differenzierung zeigt Tritopodin (A) Lokalisation in den *Z-bodies* (offene Pfeilköpfe), an Tag 5 (D, E, F) der Differenzierung in den Z-Scheibenvorläuferstrukturen (offene Pfeilköpfe) sowie in den Z-Scheiben (Pfeilköpfe), wo es immer mit  $\alpha$ -Aktinin (B, E) colokalisiert. Zusätzlich ist Tritopodin im Bereich der Kernhülle lokalisiert (Doppelpfeile). Die Überlagerungsbilder (C, F) zeigen zudem die Färbung der Zellkerne (blau). Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detailansicht 5  $\mu\text{m}$ .

Colokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin. Die Doppelfärbung mit Myopodin und Tritopodin zeigte ebenfalls, dass diese Proteine während der gesamten Differenzierung größtenteils entlang des Aktinzytoskeletts colokalisieren (Daten nicht gezeigt, Albinus (2008)). Zudem lokalisierte Tritopodin im Bereich der Kernhülle.

Zusätzlich wurden C2C12-Zellen zum Studium der Lokalisation des Tritopodins während der Skelettmuskeldifferenzierung genutzt. In undifferenzierten Zellen und in Zellen früher Differenzierungsstadien war Tritopodin scheinbar zufällig punktförmig über die Zelle verteilt, wobei nicht auszuschließen ist, dass dies auf einer unspezifischen Färbung des ungereinigten polyklonalen ML1-Antikörpers beruhte (Abb. 3.26, A bis C). Dafür würde sprechen, dass keine Colokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin auftrat und dass in einem Western Blot Tritopodin in C2C12-Zellen erst ab Tag 5 nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 3.23, B). Die detektierten Banden von 60 kDa entsprachen auch nicht der erwarteten Skelettmuskelisiform von 130 kDa. Am Tag 2 der Differenzierung ist vereinzelt eine Lokalisation des Tritopodins entlang der Stressfasern zu beobachten (Abb. 3.26, D bis F, offene Pfeilköpfe). Ab Tag 3 nach Beginn der Differenzierung konnte Tritopodin in den *Z-bodies*, teils aber auch durchgängig entlang der Stressfasern beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auffallend aber war die im Vergleich zu den Hskm-Zellen eher diffuse Färbung durch den ML1-Antikörper. Vermutlich ist dies auf eine geringere Affinität des ML1-Antikörpers zu murinem Tritopodin zurückzuführen, denn auch die Detektion im Western Blot dieser Differenzierungsstadien zeigten, wie bereits erwähnt, keine spezifische Tritopodinbande (siehe Abschnitt 3.2.2.2).

In den fortgeschrittenen Differenzierungsstadien konnte Tritopodin in den Z-Scheiben-Vorläuferstrukturen (Abb. 3.26, G bis J, Pfeilköpfe) und in den terminal differenzierten Myotuben in den Z-Scheiben detektiert werden, wobei es dort mit  $\alpha$ -Aktinin colokalisiert (Abb. 3.26, K bis L, Pfeilköpfe). Eine Färbung des Tritopodins im Bereich der Kernhülle, wie sie in den Hskm-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde in den C2C12-Zellen zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung beobachtet.



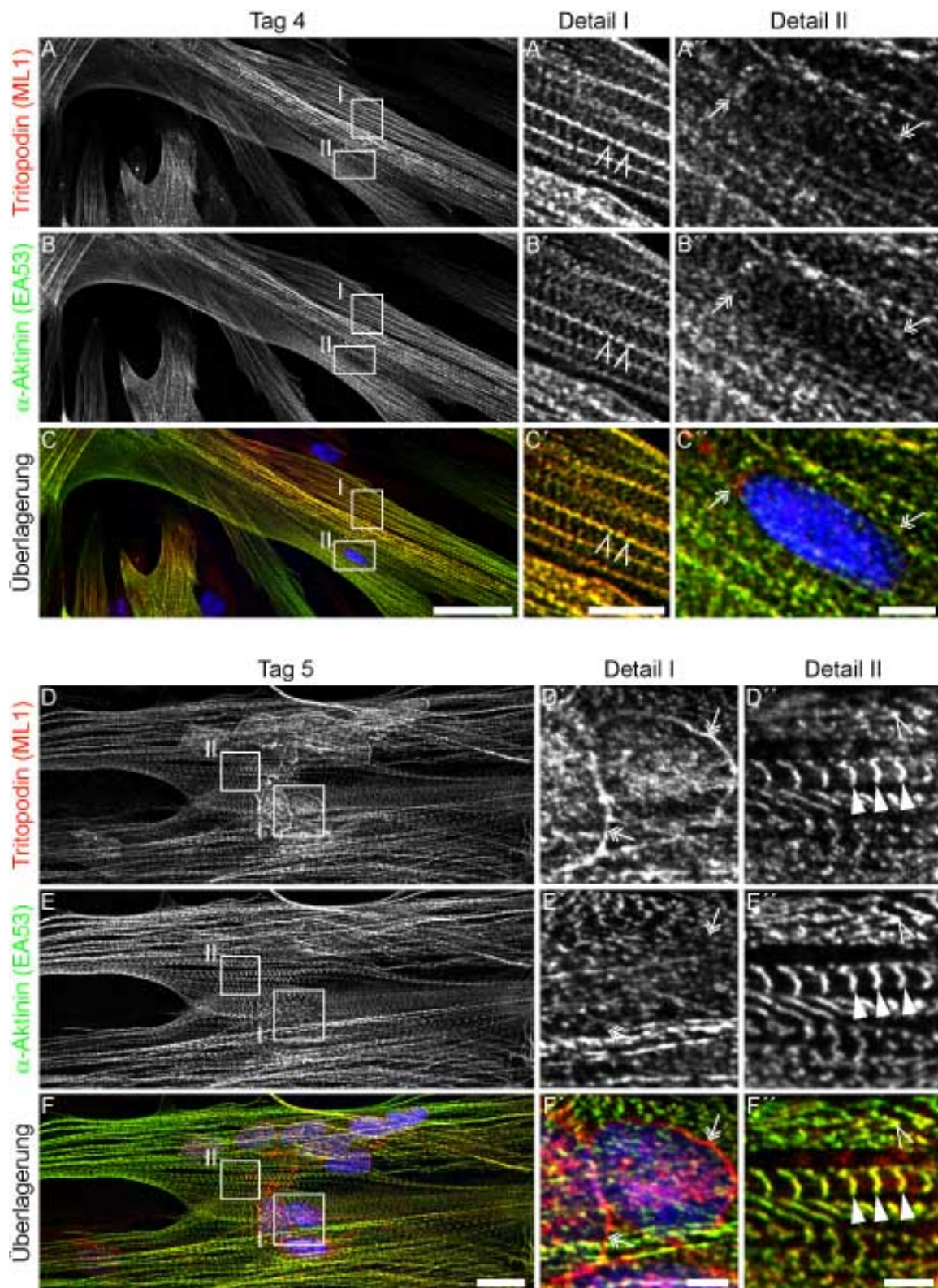


Abbildung 3.26: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin in differenzierenden C2C12-Zellen. In den frühen Differenzierungsstadien (A-F) zeigt Tritopodin (A, D) vorwiegend eine scheinbar zufällige punktförmige Verteilung im Zytoplasma, während  $\alpha$ -Aktinin (B, E) in den Z-bodies (offene Pfeilköpfe) lokalisiert. In den späten Differenzierungsstadien (G, H, J) und in terminal differenzierten Zellen (K, L, M), zeigt Tritopodin Lokalisation in den Z-Scheiben und -vorläuferstrukturen (Pfeilköpfe), wo es mit  $\alpha$ -Aktinin colokalisiert. Die Überlagerungsbilder (C, F, J, M) zeigen zudem die Färbung der Zellkerne (blau). Maßstabsbalken 20  $\mu$ m, Detailansicht 5  $\mu$ m.

---

Auch die simultane Immunfluoreszenzmarkierung von Myopodin und Tritopodin in differenzierten C2C12-Zellen bestätigte, dass beide Podine in der Z-Scheibe lokalisieren (Abb. 3.27 A bis D). Die Doppelfärbung der Podine mit dem M-Bandenprotein Myomesin (Abb. 3.27, E bis J) zeigte in Zellen früher Differenzierungsstadien eine alternierende Färbung punktförmig entlang der Stressfasern (offene Pfeilköpfe). In terminal differenzierten Bereichen zeigte sich eine alternierende Färbung der M-Banden durch Myomesin und der Z-Scheiben durch die Podine (Pfeilköpfe).

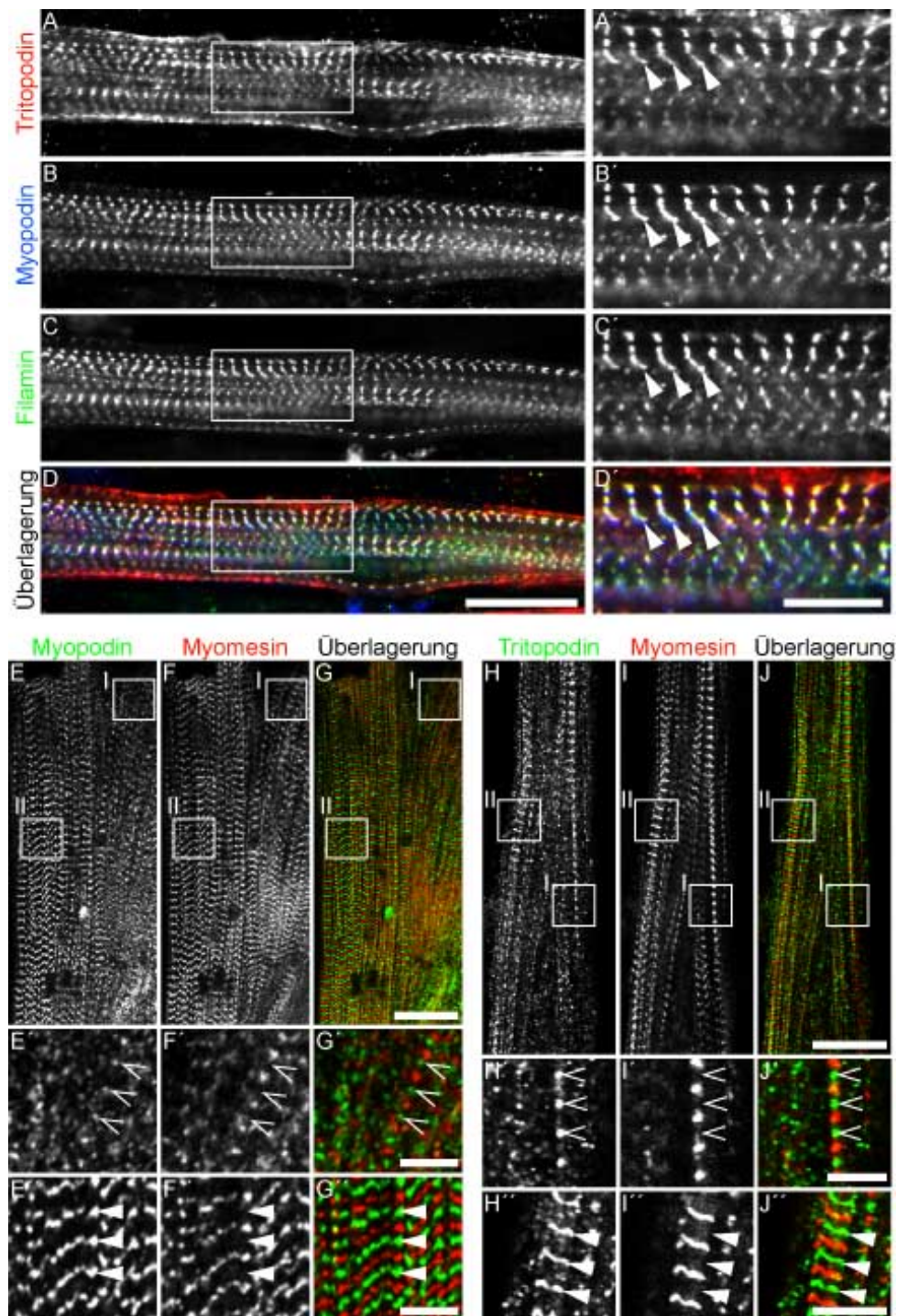


Abbildung 3.27: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin und Tritopodin in differenzierten C2C12-Zellen. In differenzierten Zellen colokalisieren Tritopodin (A), Myopodin (B) und Filamin (C) in den Z-Scheiben (Pfeile). Die Färbungen von Myopodin (E) bzw. Tritopodin (H) und dem M-Bandenprotein Myomesin (F, I), zeigen eine alternierende Färbung der M-Banden und der Z-Scheiben (Pfeilköpfe) bzw. der *Z-bodies* (offenen Pfeilköpfe). Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detailansicht 5  $\mu\text{m}$ .



### 3.2.3 Alle Podin-Proteine werden in adulten Muskelgeweben exprimiert

Nach der Analyse der Lokalisation des Myopodins und des Tritopodins in differenzierenden Muskelzellen, sollte auch die Lokalisation in adulten Muskelgeweben untersucht werden. Hierzu standen zum einen humanes Skelettmuskelgewebe, isolierte murine Cardiomyozyten, humanes Prostata- sowie murines Uterusgewebe zur Verfügung. Somit konnte die Lokalisation in allen Muskeltypen untersucht werden.

#### 3.2.3.1 Alle drei Podin-Proteine zeigen Lokalisation in der Z-Scheibe

Die Immunfärbungen des humanen Skelettmuskels wurden mit unterschiedlichen Primärantikörperkombinationen durchgeführt, wobei immer Myopodin, Tritopodin oder Synaptopodin in Kombination mit einem putativen Bindungspartner markiert wurde. Hierzu wurden Serienkryoschnitte von gesundem Muskelgewebe gefärbt um eine optimale Vergleichsmöglichkeit zu haben. Exemplarisch sind an dieser Stelle die Färbungen von Myopodin in Kombination mit  $\alpha$ -Aktinin, Filamin und Tritopodin sowie Tritopodin mit Filamin gezeigt. Alle durchgeführten Färbungen sowie die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Alle Färbungen zeigten, dass sowohl Myopodin, also auch Tritopodin und Synaptopodin in der sarkomerischen Z-Scheibe lokalisiert sind (Abb. 3.28-3.32, Pfeilköpfe), wo sie mit  $\alpha$ -Aktinin (Abb. 3.28, Pfeilköpfe) und Filamin (Abb. 3.31 und 3.32, Pfeilköpfe) colokalisieren. Die simultane Detektion der beiden Podine zeigte ebenfalls deren Colokalisation in diesen Strukturen (Abb. 3.31, Pfeilköpfe). Unterschiede waren allerdings in der Betrachtung der Gefäße, welche den Skelettmuskel durchziehen, zu beobachten. Myopodin aber auch Synaptopodin zeigten starke Expression in den Glattmuskelzellen (GM) der Gefäßwände (Abb. 3.28, 3.31 und 3.30), Tritopodin hingegen wurde dort nicht beobachtet (Abb. 3.31 und Abb. 3.32). Dies bestätigt die oben gezeigten Ergebnisse der Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene, in denen Myopodin in Glattmuskelzellen beobachtet werden konnte, Tritopodin hingegen lediglich



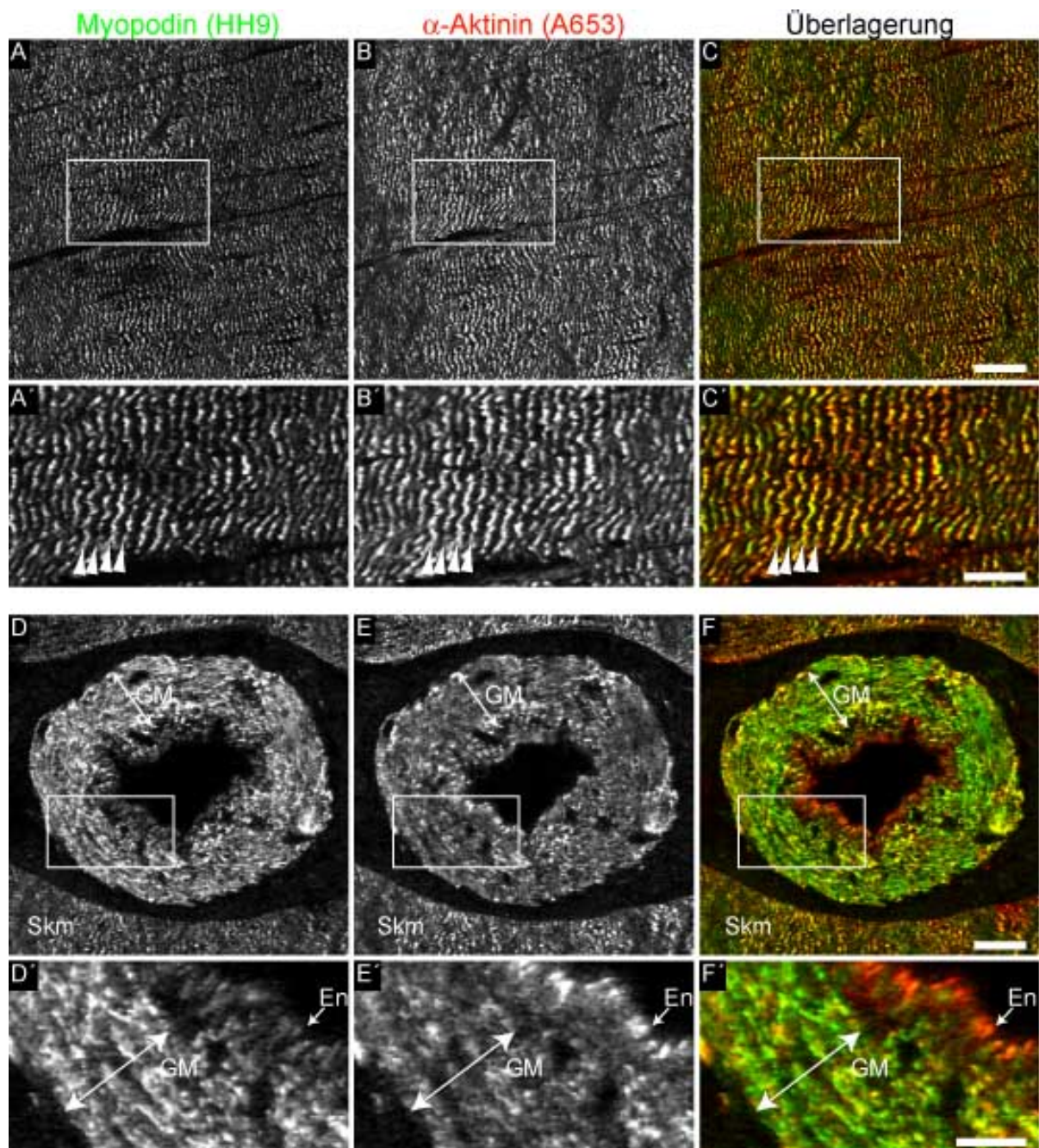


Abbildung 3.28: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin in adultem humanen Skelettmuskel. Im Längsschnitt (A, B, C) der Muskelfasern zeigen Myopodin (A) und sarkomerspezifisches  $\alpha$ -Aktinin (B) Colokalisation in den Z-Scheiben (Pfeilköpfe). Die Färbung eines Blutgefäßes des Skelettmuskels (D, E, F) zeigt die Expression von Myopodin (D) in den Glattmuskelzellen des Gefäßes. Skm: Skelettmuskel, GM: Glatte Muskulatur, En: Endothel. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detail 10  $\mu\text{m}$ .



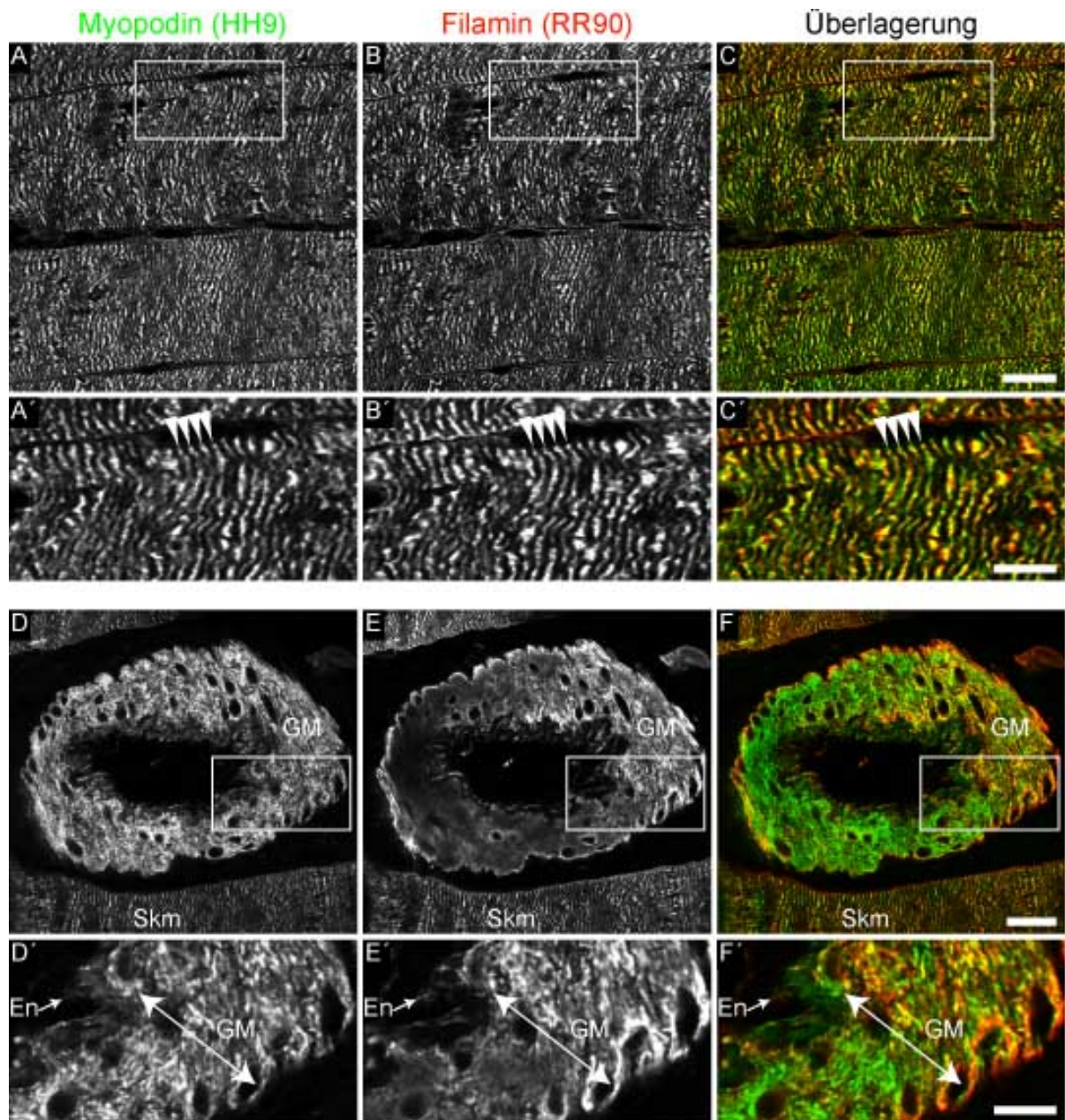


Abbildung 3.29: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin und Filamin in adultem humanen Skelettmuskel. Im Längsschnitt (A, B, C) der Muskelfasern zeigen Myopodin (A) und Filamin (B) Colokalisation in den Z-Scheiben (Pfeilköpfe). Die Färbung eines Blutgefäßes des Skelettmuskels (D, E, F) zeigt die Expression von Myopodin (D) und Filamin (E) in den Glattmuskelzellen des Gefäßes. Skm: Skelettmuskel, GM: Glatte Muskulatur, En: Endothel. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detail 10  $\mu\text{m}$ .



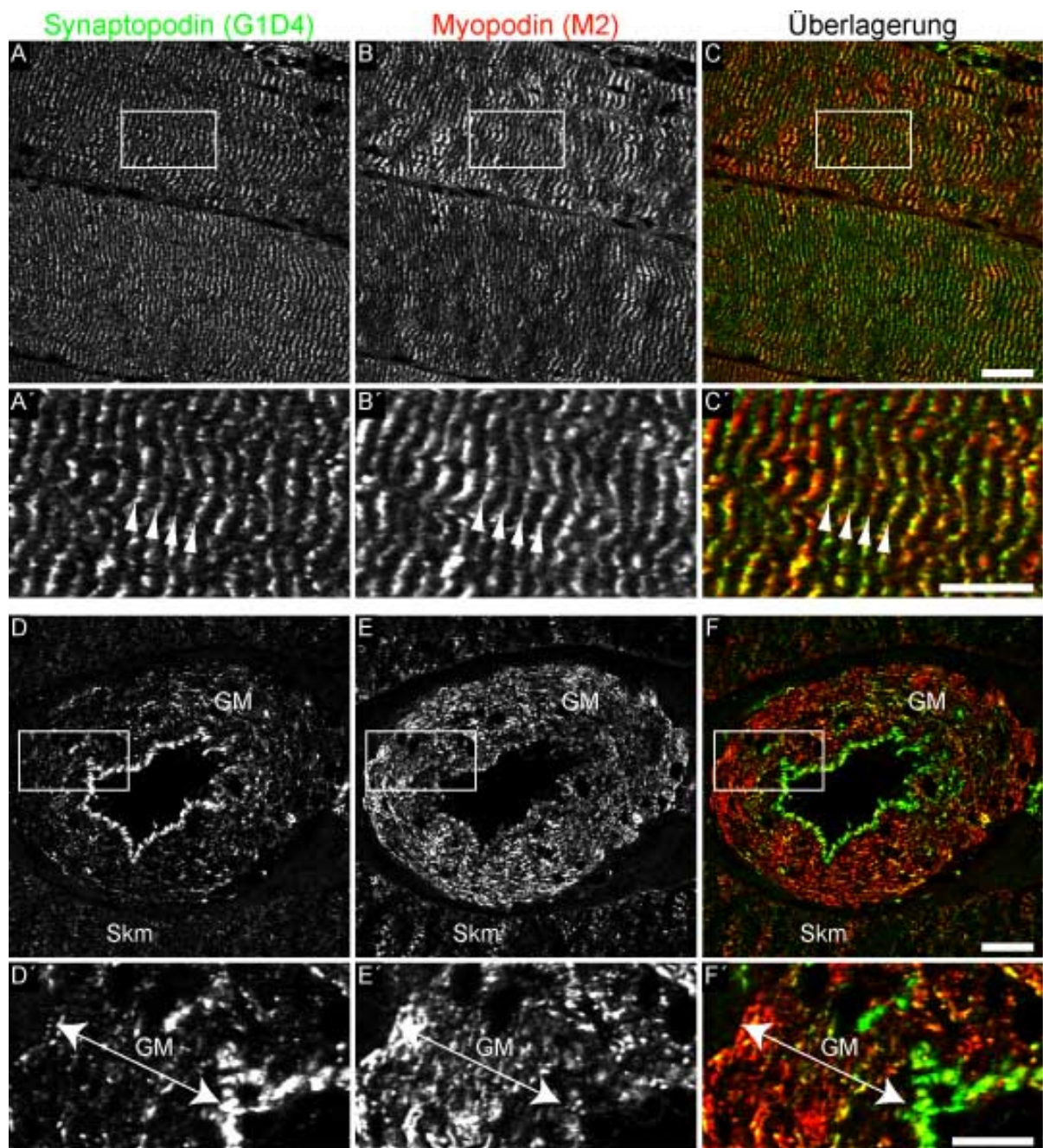


Abbildung 3.30: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Synaptopodin und Myopodin in adultem humanen Skelettmuskel. Im Längsschnitt (A, B, C) der Muskelfasern zeigen von Synaptopodin (A) und Myopodin (B) Colokalisation in den Z-Scheiben (Pfeilköpfe). Die Färbung eines Blutgefäßes des Skelettmuskels (D, E, F) zeigt die Expression von Synaptopodin (D) und Myopodin (E) in den Glattmuskelzellen des Gefäßes. Skm: Skelettmuskel, GM: Glatte Muskulatur. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detail 10  $\mu\text{m}$ .



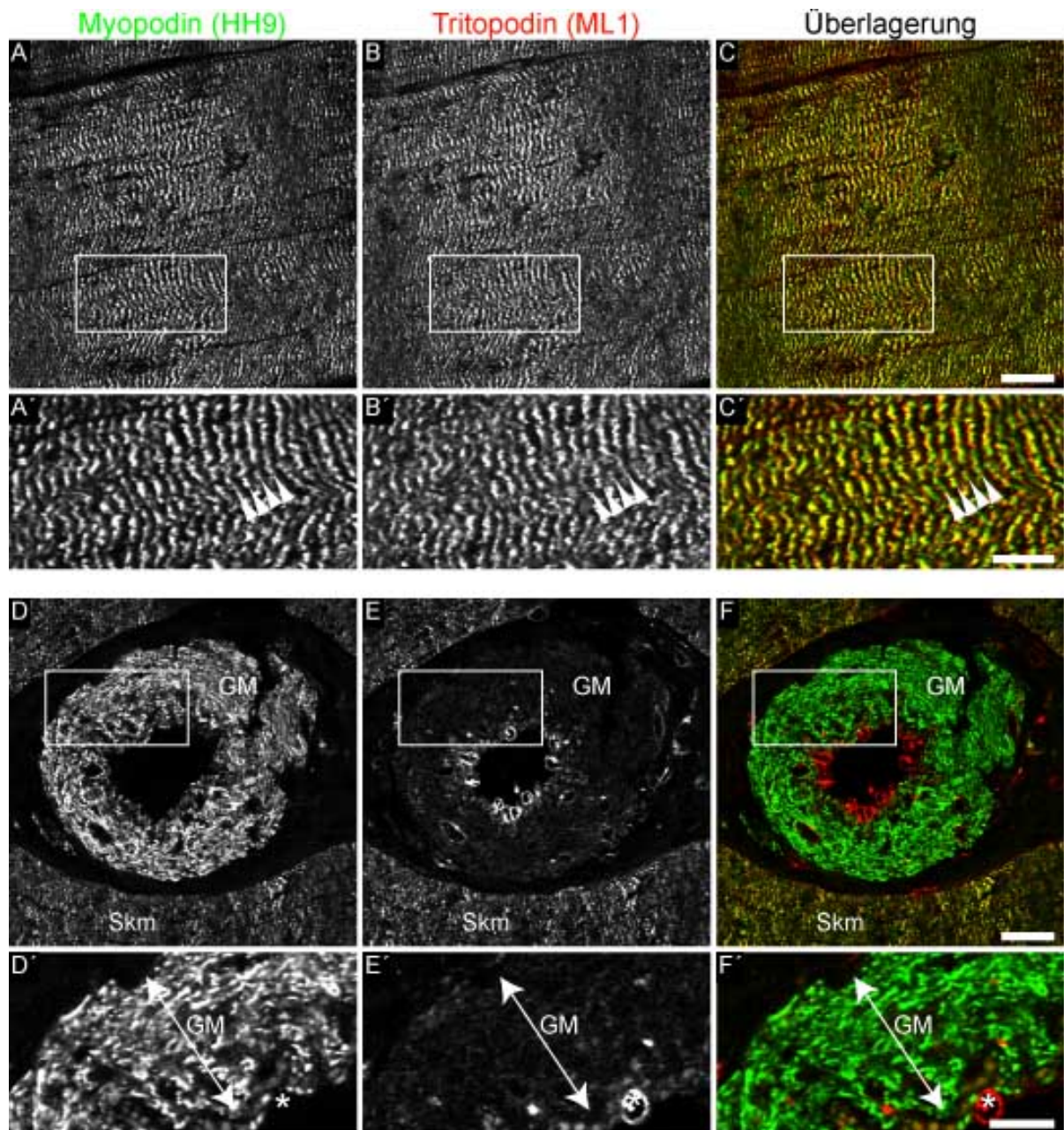


Abbildung 3.31: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin und Tritopodin in adultem humanen Skelettmuskel. Im Längsschnitt (A, B, C) der Muskelfasern zeigen Myopodin (A) und Tritopodin (B) Colokalisation in den Z-Scheiben (Pfeilköpfe). Die Färbung eines Blutgefäßes des Skelettmuskels (D, E, F) zeigt die Expression von Myopodin (D) aber nicht von Tritopodin (E) in den Glattmuskulzellen des Gefäßes. Skm: Skelettmuskel, GM: Glatte Muskulatur, \*: Blutzellen im Gefäß. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detail 10  $\mu\text{m}$ .



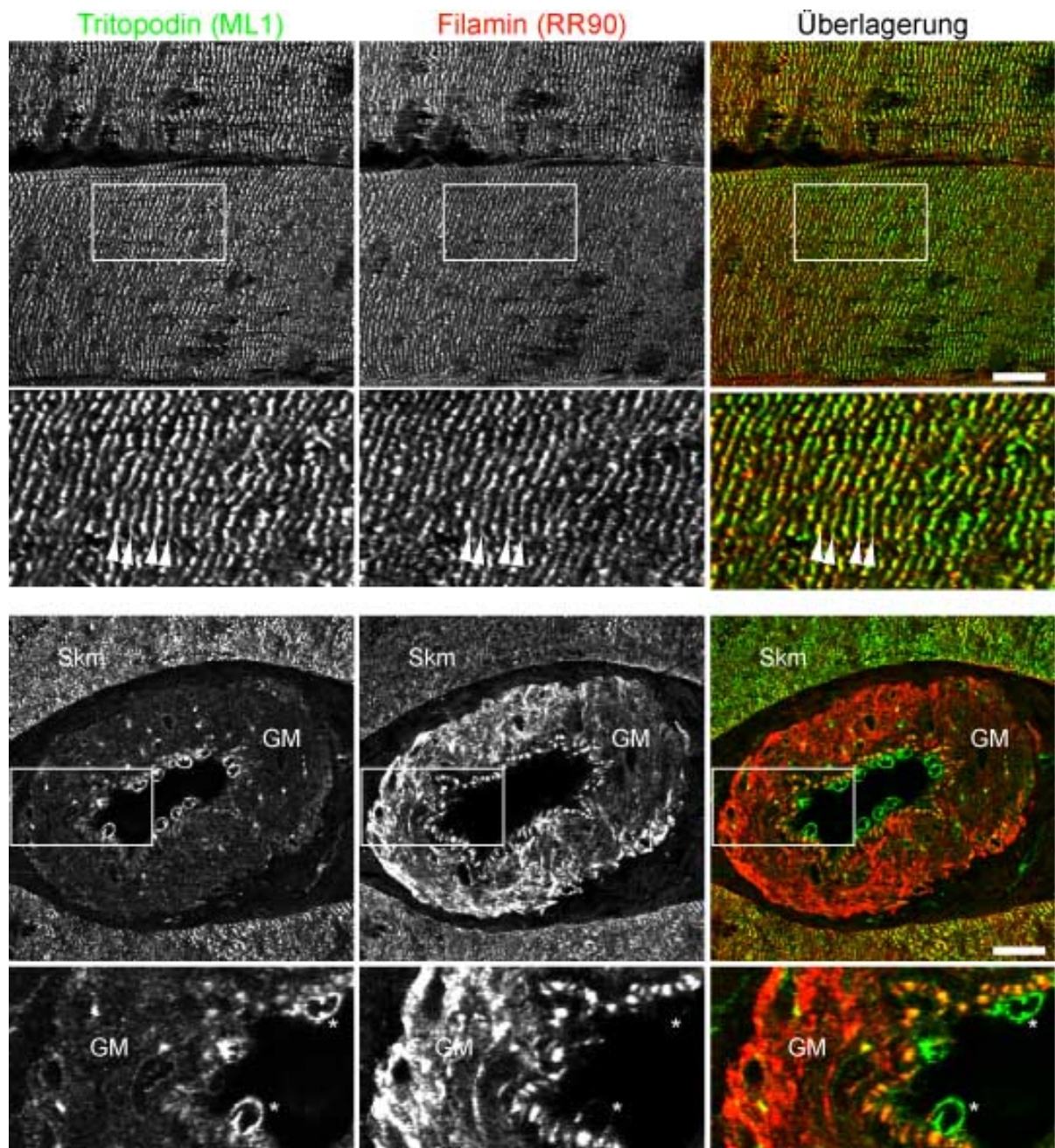


Abbildung 3.32: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin und Filamin in adultem humanen Skelettmuskel. Im Längsschnitt (A, B, C) der Muskelfasern zeigen Tritopodin (A) und Filamin (B) Colokalisation in den Z-Scheiben (Pfeilköpfe). Die Färbung eines Blutgefäßes des Skelettmuskels (D, E, F) zeigt die Expression von Filamin (E) aber nicht von Tritopodin (D) in den Glattmuskelzellen des Gefäßes. Skm: Skelettmuskel, GM: Glatte Muskulatur, En: Endothel, \*: Blutzellen im Gefäß. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detail 10  $\mu\text{m}$ .

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzstudien zur Lokalisation der Podine in humanen Skelettmuskelgewebe

Immunfärbung gegen	Antikörperkombination	Lokalisation in			dargestellt in Abbildung
		Z-Scheiben	Glattmuskelnzellen	Zellkern/-peripherie	
Myopodin/ $\alpha$ -Aktinin	HH9/ A653	+	+	-	3.28
		+	+	-	
Myopodin/ Filamin A/C	HH9/ RR90	+	+	-	3.29
		+	+	-	
Myopodin/ Calsarcin	M2/ CS2	+	+	-	nicht gezeigt
		+	+	-	
Myopodin/ Synaptopodin	M2/ G1D4	+	+	-	3.30
		+	+	-	
Myopodin/ Tritopodin	HH9/ ML1	+	+	-	3.31
		+	-	-	
Tritopodin/ $\alpha$ -Aktinin	ML1/ EA53	+	-	-	nicht gezeigt
		+	+	-	
Tritopodin/ Filamin A/C	ML1/ RR90	+	-	-	3.32
		+	+	-	
Tritopodin/ Synaptopodin	ML1/ G1D4	+	-	-	nicht gezeigt
		+	+	-	
Synaptopodin/ Filamin A/C	G1D4/ RR90	+	+	-	nicht gezeigt
		+	+	-	
Synaptopodin/ $\alpha$ -Aktinin	G1D4/ A653	+	+	-	nicht gezeigt
		+	+	-	

in quergestreiften Muskeln. Allerdings kann die Aussage der Immunfluoreszenzuntersuchungen nur für die langen Tritopodinisoformen gemacht werden, da die kleine Isoform durch den verwendeten ML1-Antikörper nicht erkannt wird. Zudem zeigten diese Färbungen, dass weder Myopodin noch Tritopodin im adulten Skelettmuskelgewebe im Zellkern zu finden sind. Auch eine Färbung im Bereich der Kernhülle, wie sie für das Tritopodin in differenzierenden Zellen beobachtet werden konnte, wurde hier nicht gemacht.

Zur Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in Herzmuskelzellen wurden isolierte murine Cardiomyozyten verwendet. Die Färbung mit dem monoklonalen Antikörper HH9 zeigte, dass Myopodin auch in Herzmuskelzellen in den Z-Scheiben lokalisiert ist. Die Färbungen mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Aktinin bzw. Filamin demonstrierten die Co-

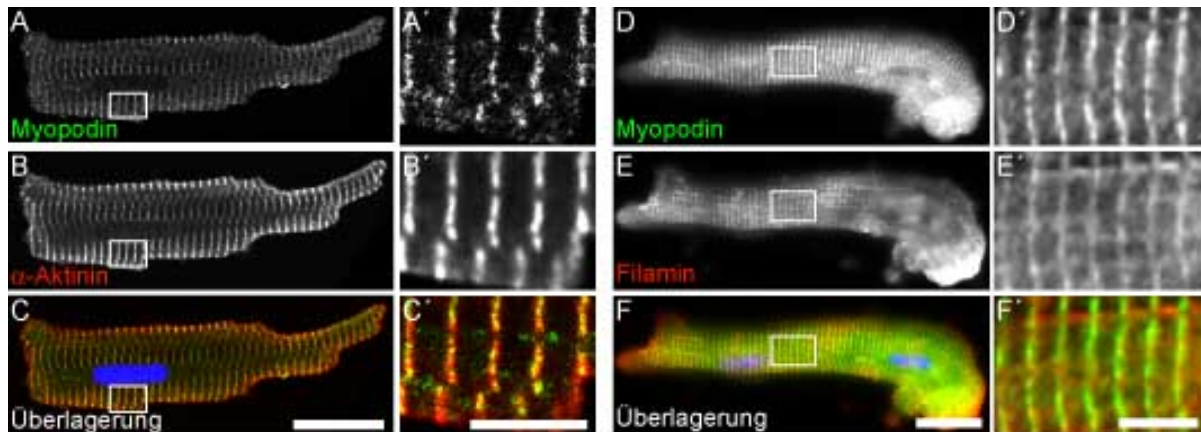


Abbildung 3.33: **Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in adultem murinen Herzmuskelzellen.** In murinen Cardiomyozyten (A - F) colokalisiert Myopodin (A, D) mit  $\alpha$ -Aktinin-Antikörper (B) und Filamin (E) in den Z-Scheiben. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ , Detailansicht 5  $\mu\text{m}$ .

lokalisierung dieser Proteine mit Myopodin in diesen Strukturen (Abb. 3.33). Auch in Cardiomyozyten konnte Myopodin nicht im Zellkern oder in Zellkernnähe nachgewiesen werden. Allerdings wies die Färbung des HH9-Antikörpers auf murinen Herzzellen einen erheblichen Hintergrund auf, bedingt durch die geringere Affinität des Antikörpers zu murinem Myopodin und der Verwendung eines in einer Maus produzierten Antikörpers auf murinen Zellen.

### 3.2.3.2 Myopodin wird in der Prostata ausschließlich in Glattmuskelzellen exprimiert

Die Analyse der Lokalisation von Myopodin im Prostatagewebe war aufgrund der bereits beschriebenen widersprüchlichen Beobachtungen (siehe Abschnitt 1.3.2) besonders interessant. Erste Färbungen mit dem monoklonalen Myopodinantikörper HH9 zeigten die Expression des Myopodins ausschließlich im glattmuskelreichen Stroma der Prostata, die Epithel- und Endothelzellen der Drüsen zeigten dagegen keine Expression von Myopodin (Linnemann, 2005; Krüger, 2007). Immunhistochemische Färbungen, durchgeführt von Jing *et al.* (2004), zeigten hingegen Expression des Myopodins im Epithel- und Drüsengewebe der Prostata. Auch der Nachweis der Myopodin-mRNA in den Epithelzellen und vor allem in den Drüsenzellen humaner Prostata durch *in*

*situ*-Hybridisierungen wurde durch Lin *et al.* (2001) erbracht.

Zur Untersuchung der Expression des Myopodins wurden hier indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen humanen Prostatagewebes sowohl mit dem monoklonalen Myopodinantikörper HH9 als auch mit dem polyklonalen Antikörper M2 durchgeführt. Als Gegenfärbung dienten dabei der keratinspezifische Antikörper C-11 zur Identifizierung von Epithelzellen und der Glattmuskelaktin-Antikörper 1A4 zum Nachweis der Glattmuskelzellen im Stroma. Die Färbungen zeigten, dass Myopodin, unabhängig vom verwendeten Antikörper, ausschließlich in den Glattmuskelzellen des Stromas lokalisiert war. So zeigte die Doppelfärbung mit dem Keratinantikörper keine Colokalisation (Abb. 3.34), während Myopodin und Glattmuskelaktin eine weitestgehende Colokalisation aufwiesen (Abb. 3.35, A).

Da die Expressionsanalyse auf mRNA- und Proteinebene (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2) ergeben hat, dass in der Prostata die Myopodinisoform a sowie eine kurze Variante, vermutlich Isoform e oder f, exprimiert wird, wurde die Färbung mit dem isoformspezifischen Antikörper  $\alpha$ -Ex6 in Kombination mit dem HH9-Antikörper durchgeführt, um eventuelle isoformspezifische Lokalisationen ermitteln zu können. Diese Färbung zeigte, dass beide Antikörper die selben Strukturen dekorieren, es gibt somit keinen Unterschied in der Lokalisation der beiden Isoformen in der Prostata.

Die Färbung des murinen Uterusgewebes bestätigte die Beobachtungen, die in der Prostata gemacht worden waren. Auch hier konnte die Myopodinexpression lediglich in den Glattmuskelzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.36, A bis D). Weiterhin zeigte diese Färbung deutlich, dass auch hier Myopodin nicht im Zellkern lokalisiert ist (Abb. 3.36, D).



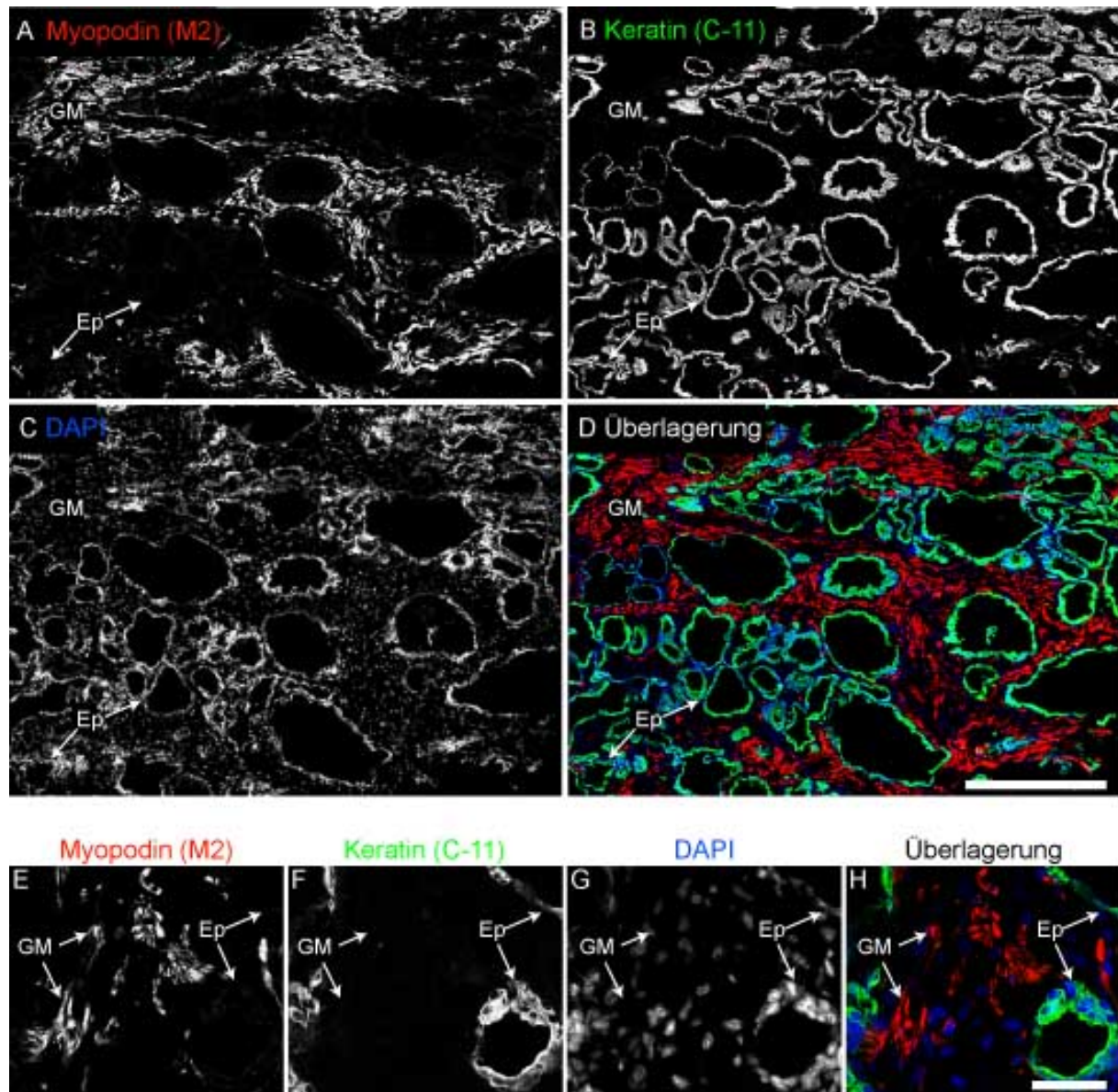


Abbildung 3.34: **Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in adultem humanen Prostatagewebe.** Die Übersichtsfärbung (A-D) mit dem Antikörper M2 (A) zeigt die Expression von Myopodin im Stroma während die Gegenfärbung mit dem Keratinantikörper C-11 (B) die Epithelien darstellt. Zudem sind die Zellkerne (C) mit DAPI angefärbt. Bei höheren Vergrößerungen (E-H) wird die ausschließliche Expression von Myopodin (E) in den Glattmuskelzellen des Stromas deutlich. Die Überlagerungen (D, H) zeigen in keinem Bereich eine Coexpression von Myopodin und Keratin. GM: Glattmuskel, Ep: Epithel. Maßstabsbalken 500  $\mu\text{m}$ , Detailansicht 25  $\mu\text{m}$ .

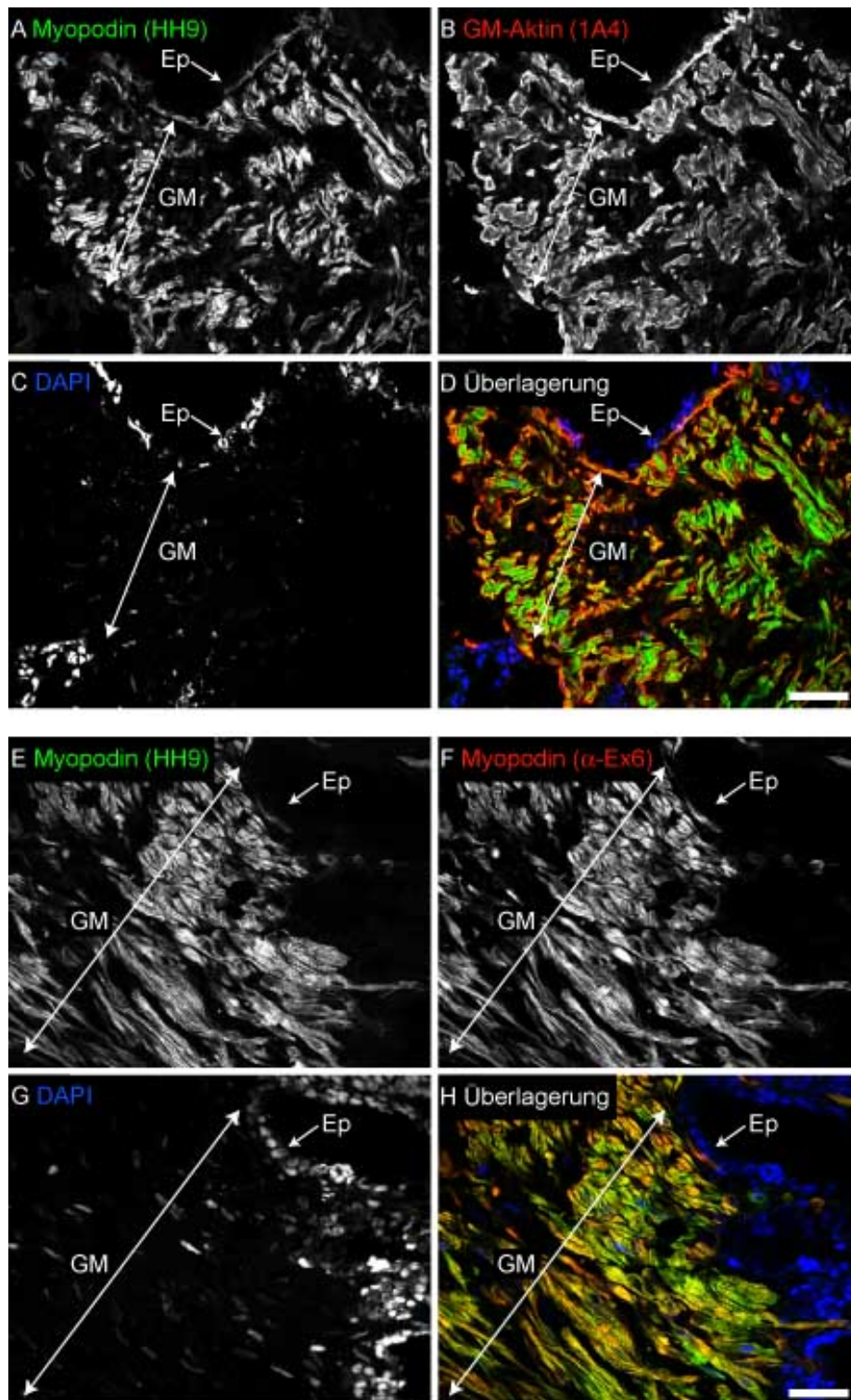


Abbildung 3.35: Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodinisoformen in adultem humanen Prostatagewebe Die Färbung mit dem pan-Myopodinantikörper HH9 (A) und dem glattmuskelspezifischen Aktinantikörper (B) zeigen die Coexpression beider Proteine in den Glattmuskelzellen des Stromas. Die Immunfärbung mit dem Myopodinantikörper HH9 (E) und dem isoformspezifischen Myopodinantikörper  $\alpha$ -Ex6 (F) zeigt die vollständige Colokalisation. GM: Glattmuskel, Ep: Epithel. Maßstabsbalken 500  $\mu$ m, Detailansicht 25  $\mu$ m.



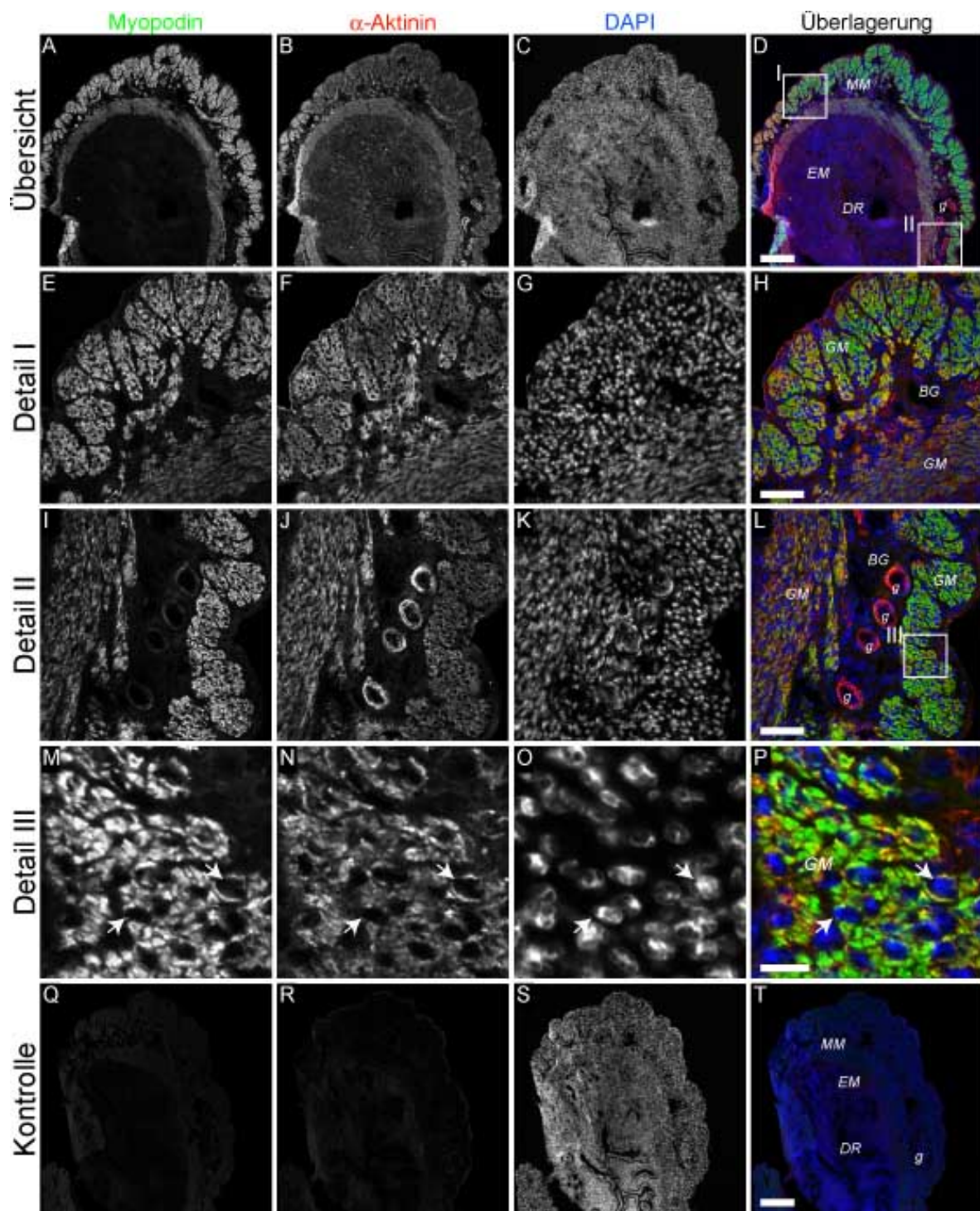


Abbildung 3.36: **Lokalisation von Myopodin in adultem murinen Uterusgewebe.** Die Übersichtsaufnahme (A-D) zeigt die Expression von Myopodin (A) in den Glattmuskelzellen des Myometriums (*MM*), aber nicht im Endometrium (*EM*), Bindegewebe (*BG*) oder im Drüsengewebe (*DR*), während  $\alpha$ -Aktinin (B) in allen Zelltypen exprimiert wird. Bei höheren Vergrößerungen (E-L) zeigt sich zudem die schwache Expression in den Glattmuskelzellen der Gefäße (*g*). Die Detailaufnahme des Myometriums (M-P) zeigt, dass Myopodin nicht im Zellkern (Pfeile) lokalisiert ist. Die Kontrollfärbung (Q-S) zeigt keine unspezifische Reaktion der eingesetzten Sekundärantikörper. Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ , Detailansichten E-L: 50  $\mu\text{m}$ , Detailansicht M-P: 10  $\mu\text{m}$ .

## **3.3 Die Podine sind Multiadapterproteine der Z-Scheibe**

### **3.3.1 Myopodin interagiert mit Filamin C**

#### **3.3.1.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Studien zur Einengung der Bindungsregion im Filamin C**

Myopodin wurde ursprünglich in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen (Y2H-Screen) als ein potentieller Interaktionspartner von Filamin C gefunden (Vakeel, 2006). Der Screen wurde mit den Ig-Domänen 19 bis 21 des Filamin C durchgeführt. Mit einem späteren Y2H-Screen mit den Ig-Domänen 17 bis 19 des Filamin C konnte ebenfalls Myopodin als möglicher Bindungspartner ermittelt werden (Nowak, 2008). Diese Ergebnisse würden auf eine Interaktion der Ig-Domäne 19 mit Myopodin hinweisen. Allerdings ist bekannt, dass durch die Sequenzhomologie der Ig-Domänen untereinander ein Bindungspartner eine gewisse Affinität zu mehreren Ig-Domänen besitzen kann, was in einem solchen Hefeexperiment zu positiven Resultaten führt (Ithychanda *et al.*, 2009). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass Filamin C mehrere Bindungsstellen für Myopodin besitzt. Deshalb wurde mit biochemischen Methoden untersucht, an welcher Ig-Domäne die Interaktion mit Myopodin tatsächlich stattfindet.

#### **3.3.1.2 Biochemische Studien zur Eingrenzung der Bindungsregion im Filamin C**

Um die Interaktion von Filamin C mit Myopodin auf biochemischem Weg zu bestätigen, wurden zunächst Western Blot-Overlays, Dotblot-Overlays sowie Coimmunpräzitationen (CoIPs) verschiedener Proteinfragmente durchgeführt. Diese Fragmente wurden zunächst in *E.coli* exprimiert und anschließend über den Hexahistidin-Tag aufgereinigt. Zum spezifischen Nachweis der Myopodinfragmente diente der durch den Vektor pETW23aT7 vermittelte T7-Immunotag, die Filaminkonstrukte wurden durch den vorhandenen EEF-Tag, vermittelt durch den Vektor pET23aEEF, dargestellt. Zur Immunpräzitation der Myopodinfragmente wurde der T7-Tag-Antikörper verwendet,

Tabelle 3.2: Bindungsstudien von Myopodin an Filamin C

Methode	Filamin C Immunglobulindomäne							
	17-19	19-21	19-20	20-21	20	21	21-22	21-23
gezieltes Y2H	+	+	+/-	+	A	A	o	+
Dotblot-Overlay	-	+	o	+	o	o	-	-
Western Blot-Overlay	-	+	o	+	o	-	-	+
Coimmunpräzipitation	-	+	+/-	+	-	-	o	-

+/- widersprüchliche Ergebnisse, o nicht durchgeführt, A autoaktivierend

der an mit ProteinG gekoppelte magnetische Kügelchen (Dynabeads, Dynal), gebunden war.

Die Ergebnisse dieser ersten Interaktionsstudien des Myopodinfragments mit den Aminosäuren 405 - 916 sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Wie hieraus zu erkennen ist, widersprechen sich die Ergebnisse teils, abhängig von der angewandten Methode und welche Filaminkonstrukte zum Einsatz kamen. Zwar zeigten die Versuche alle, dass Filamin C d19-21 und d20-21 mit Myopodin interagierten, in gezielten Hefeexperimenten ergaben aber auch die Konstrukte d17-19 und d21-23 eine Interaktion mit Myopodin. Auch der Western Blot-Overlay zeigte die Bindung von Filamin C d21-23 an Myopodin, die entsprechende CoIP war hingegen aber negativ. Mit dem Filaminfragment d19-20 lieferten sowohl die gezielten Hefeexperimente als auch die CoIP widersprüchliche Resultate. Ig-Domäne 21 allein zeigte in keinem Bindungsassay Interaktion. Mit diesen Ergebnissen ließ sich die Bindungsstelle somit zwar nicht absolut eindeutig zuordnen, sie deuteten aber auf eine Bindungsregion um Ig-Domänen 20-21 hin, obwohl die einzelnen Ig-Domänen 20 und 21 in den CoIPs alleine keine Wechselwirkung zeigten. Eine weitere Bindungsstelle ließ sich weder eindeutig bestätigen noch ausschließen. Kürzlich fanden Heikkinen *et al.* (2009) heraus, dass nicht alle Ig-Domänen des Filamins als eine eigenständige Einheit zu betrachten sind. So konnte für Filamin A gezeigt werden, dass die Ig-Domänen 16-17, 18-19 und 20-21 zusammengehören und kompakte Domänenstrukturen bilden. Aufgrund der großen Homologie ist anzunehmen, dass das auch für Filamin C gilt. Dafür würde auch sprechen, dass für Filamin C Ig-Domäne 20-21

konsistente Ergebnisse für die Interaktion mit Myopodin vorliegen, während für das Fragment Ig-Domäne 19-20 widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden. Deshalb wurden neue Filaminkonstrukte hergestellt, die entweder für ein kompaktes Domänenpaar (also die zwei Ig-Domänen 18-19 oder 20-21) oder für zwei kompakte Domänenpaare (also für die vier Ig-Domänen 18-21) kodierten (Abb. 3.37, A). Diese wurden in den prokaryotischen Expressionsvektor pETW23aEEF kloniert, die Fragmente rekombinant exprimiert und wie oben beschrieben für CoIPs mit Myopodin 405-916 eingesetzt. Die Verwendung dieser Vier- bzw. Zweidomänenkonstrukte, welche nicht die im Filamin vorhandenen kompakten Domänenpaare (Heikkinen *et al.*, 2009) zweier Ig-Domänen zerstören, führten zu eindeutigen Ergebnissen (Abb. 3.37). Es konnte mit dem Myopodinfragment 405-916 das Vierdomänenkonstrukt, welches die Ig-Domänen 18-21 umfasst, copräzipitiert werden (Abb. 3.37, C). Auch das Zweidomänenkonstrukt d20-21 konnte copräzipitiert werden (Abb. 3.37, E), während das Fragment d18-19 keine Interaktion mit dem verwendeten Myopodinkonstrukt zeigte (Abb. 3.37, D). Somit lässt sich die Interaktion zwischen Myopodin und Filamin auf die Ig-Domänen 20-21 einschränken.

### 3.3.1.3 Bestimmung der Bindungsstärke von Myopodin und Filamin C mittels SAW

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Myopodin mit Filamin C interagiert, sollte die Affinität der beiden Proteine zueinander durch *Surface Acoustic Wave* (SAW)- Messungen bestimmt werden. Hierzu wurde das Myopodinfragment 405-916 auf der Sensoroberfläche immobilisiert und durch die Zugabe steigender Konzentrationen von Filamin C d18-21 die Bindung detektiert. Eine Übersichtsmessung mit Konzentrationsintervallen von 10  $\mu\text{M}$  und drei detailliertere Messungen mit Intervallen von 2,5  $\mu\text{M}$  gingen in die Berechnung der Bindungskonstanten ein. Durch die Anwendung eines 1:1-Bindungsmodells mit Residualberücksichtigung wurde durch anschließende lineare Regression die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{Ass}$  und  $k_{Diss}$  ermittelt, aus welchen die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $k_D$  berechnet wurde (siehe Abschnitt 2.9.12.4). Der  $k_D$ -Wert der Bindung von Myopodin und Filamin C wurde mit  $1,89 \times 10^{-6} \text{ M} \pm 7,77 \times 10^{-7} \text{ M}$  bestimmt, wobei eine moderate

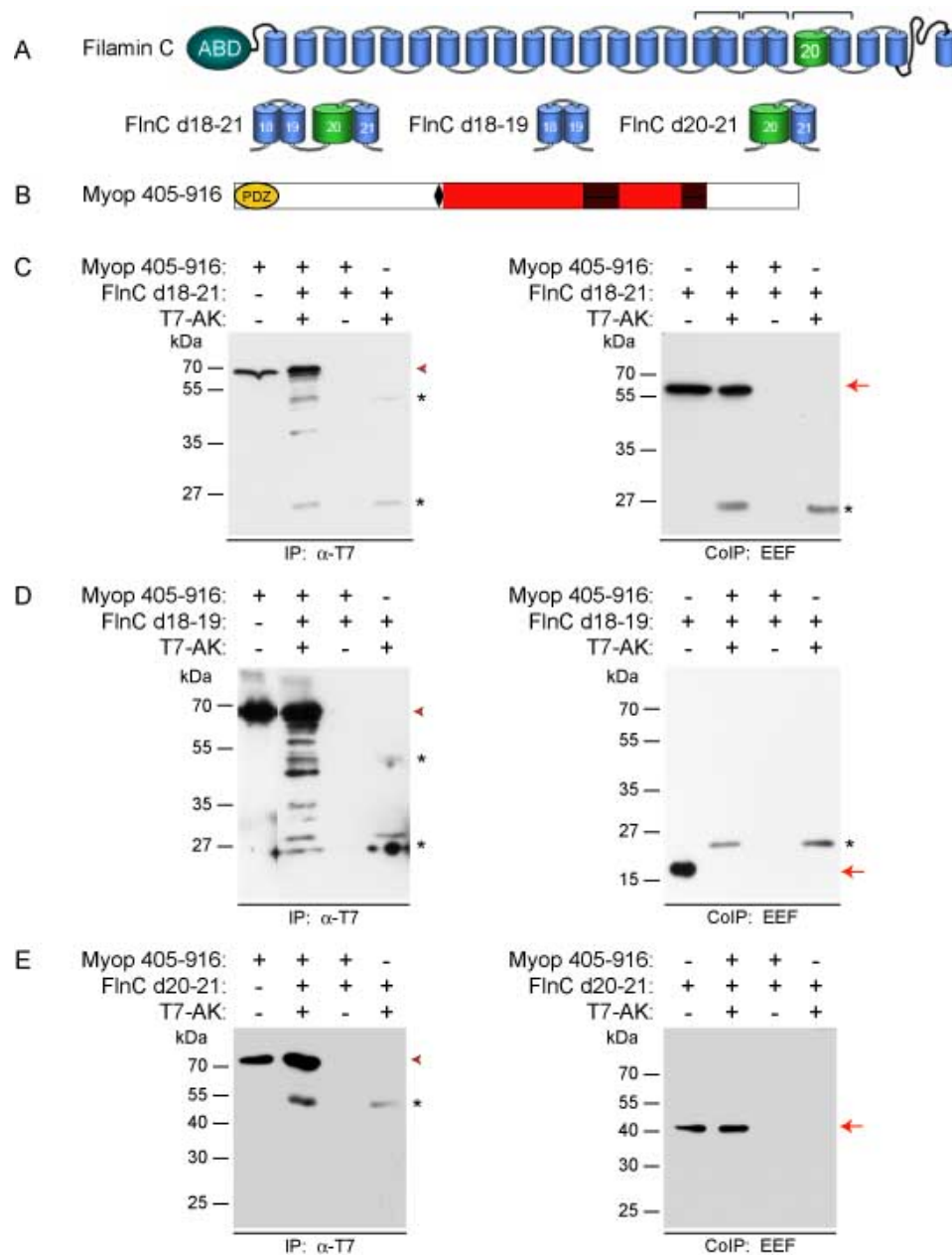


Abbildung 3.37: **Bindungsstudie zur Bestätigung der Interaktion von Myopodin mit Filamin C.** A: schematische Darstellung des Filamin C Moleküls. Darunter gezeigt sind die verwendeten Filamin C-Fragmente. B: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die für die folgenden Coimmunpräzipitationen eingesetzte Region, die die Aminosäuren 405-916 umfasst, rot hervorgehoben ist. C-E: Western Blots der Coimmunpräzipitation von Filamin C d18-21 (C) 18-19 (D) und 20-21 (E) mit Myopodinfragment 405-916. Links sind die Immunpräzipitationen der T7-markierten Myopodinfragmente, rechts die copräzipitierten Filamin C-Fragmente, detektiert über deren EEF-Tags, gezeigt. Filamin C d18-21 und d20-21 wurden mit dem Myopodinfragment 405-916 copräzipitiert, d18-19 dagegen nicht. Die roten Pfeile markieren die Laufhöhe des Myopodin- bzw. der Filaminfragmente, \* die Laufhöhe der T7-Antikörperketten aus den CoIP-Ansätzen.

Tabelle 3.3: Kinetische Daten der Bindung von Myopodin an Filamin C

	$k_{Ass} \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$k_{Diss} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_D\text{-Wert (M)}$
Messung 1 (Übersicht)	$3,08 \times 10^3$	$2,31 \times 10^{-3}$	$7,59 \times 10^{-7}$
Messung 2 (Detail)	$6,06 \times 10^3$	$1,02 \times 10^{-2}$	$2,07 \times 10^{-6}$
Messung 3 (Detail)	$3,08 \times 10^3$	$5,69 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-6}$
Messung 4 (Detail)	$2,65 \times 10^3$	$6,13 \times 10^{-3}$	$2,05 \times 10^{-6}$
<b>Mittelwert</b>	<b><math>3,72 \times 10^3</math></b>	<b><math>6,08 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>1,89 \times 10^{-6}</math></b>
<b>SD</b>	<b><math>\pm 1,58 \times 10^3</math></b>	<b><math>\pm 3,23 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>\pm 7,77 \times 10^{-7}</math></b>

Assoziationskonstante von  $3,72 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \pm 1,58 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und eine geringe Dissoziationskonstante von  $6,08 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \pm 3,23 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ermittelt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

### 3.3.1.4 Die Bindung von Myopodin an Filamin A kann nicht durch Coimmunpräzipitationen nachgewiesen werden

Ältere Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Myopodin auch mit Filamin A interagieren kann. In einem gezielten Hefe-Zwei-Hybrid-Versuch interagierte dabei Myopodin mit den Ig-Domänen 19-21 von Filamin A, B und C (Vakeel, 2006). Hierbei wurden wiederum Konstrukte verwendet, die eine einzelne Ig-Domäne (Ig-Domäne 19) beinhalten, die eigentlich zu einem kompakten Domänenpaar (Ig-Domäne 18-19) gehört. Auch ein Western Blot-Overlay deutete auf Wechselwirkung von Myopodin mit allen drei Filaminisoformen hin (Vakeel, 2006). In diesem Ansatz waren die Filaminfragmente allerdings geblottet und somit in ihrer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur gestört.

Zur Untersuchung, ob Myopodin tatsächlich in der Lage ist, mit Filamin A zu interagieren, wurde eine CoIP mit gereinigtem Filamin A d18-21 und Myopodin 405-916 durchgeführt. Diese zeigte, dass Filamin A d18-21 nicht mit Myopodin 405-916 interagieren kann (Abb. 3.38, A). Um eine Vergleichsmöglichkeit zu haben, wurde eine CoIP mit Filamin A und C durchgeführt. Von jedem Filaminfragment wurden gleiche Mengen eingesetzt. Die CoIP zeigte, dass unter identischen Bedingungen Filamin C d18-21 an das



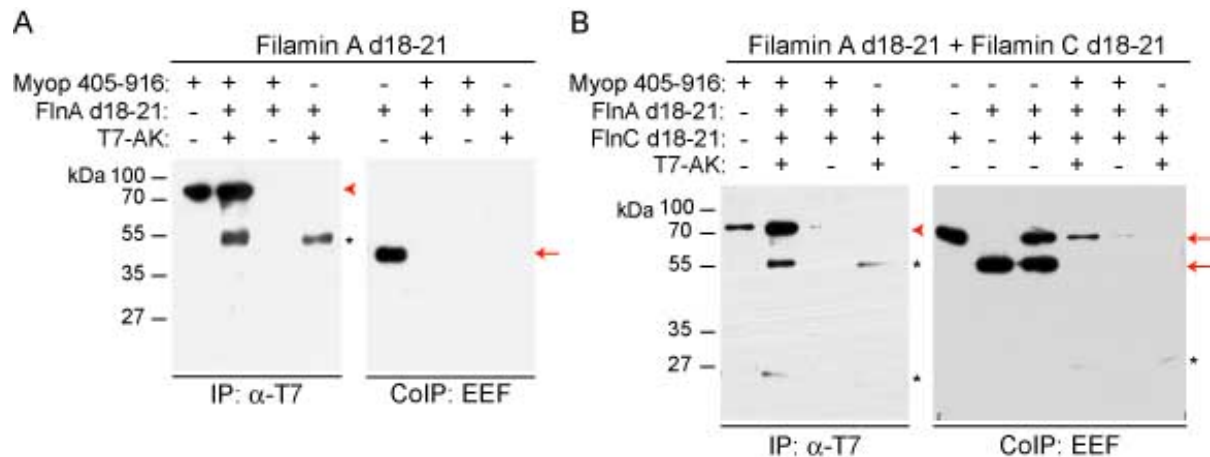


Abbildung 3.38: **Bindungsstudie zur Untersuchung der Interaktion von Myopodin mit Filamin A.** A: Coimmunpräzipitation von Filamin A d18-21 mit Myopodinfragment 405-916. Links sind die Western Blots der Immunpräzipitation des T7-markierten Myopodinfragments, rechts die Coimmunpräzipitation des EEF-markierten Filamin A d18-21 dargestellt. B: Simultane Coimmunpräzipitation von Filamin A und C d18-21 mit Myopodinfragment 405-916. Links sind die Western Blots der Immunpräzipitation des T7-markierten Myopodinfragments, rechts die Coimmunpräzipitation des EEF-markierten Filamin A und C d18-21 dargestellt. Filamin C wird mit Myopodinfragment 405-916 co-präzipitiert, Filamin A d18-21 dagegen nicht. Die roten Pfeile markieren die Laufhöhe des Myopodinfragmentes, der rote Pfeilkopf die der Filaminfragmente; \* die der T7-Antikörperketten aus den CoIP-Ansätzen.

Myopodinfragment 405-916 band, Filamin A dagegen nicht (Abb. 3.38, B). Eventuell ist die Interaktion von Myopodin an Filamin A zu schwach, um unter diesen Bedingungen nachgewiesen zu werden.

### 3.3.1.5 Die Bindung von Myopodin an Filamin wird durch eine bei den Podinen stark homologe Region vermittelt

Nachdem die direkte Interaktion von Myopodin an die Ig-Domänen 20-21 gezeigt worden war (siehe Abschnitt 3.3.1.2), wurde versucht die Bindungsstelle im Myopodinmolekül einzugrenzen. Hierzu wurde das bindende Myopodinfragment 405-916 zunächst in zwei Subfragmente unterteilt und mit diesen, wie oben beschrieben, CoIPs durchgeführt (Abb. 3.39, A). Für das N-terminale Konstrukt 405-663 konnte keine Bindung an Filamin C d18-21 festgestellt werden (Abb. 3.39, B), das C-terminale Konstrukt 664-916 hingegen zeigte Bindung an Filamin C d18-21 (nicht gezeigt) sowie an d20-21 (Abb. 3.39, C). Somit konnte die Bindung von Filamin C auf diese Region eingengt werden. Wie Abbildung

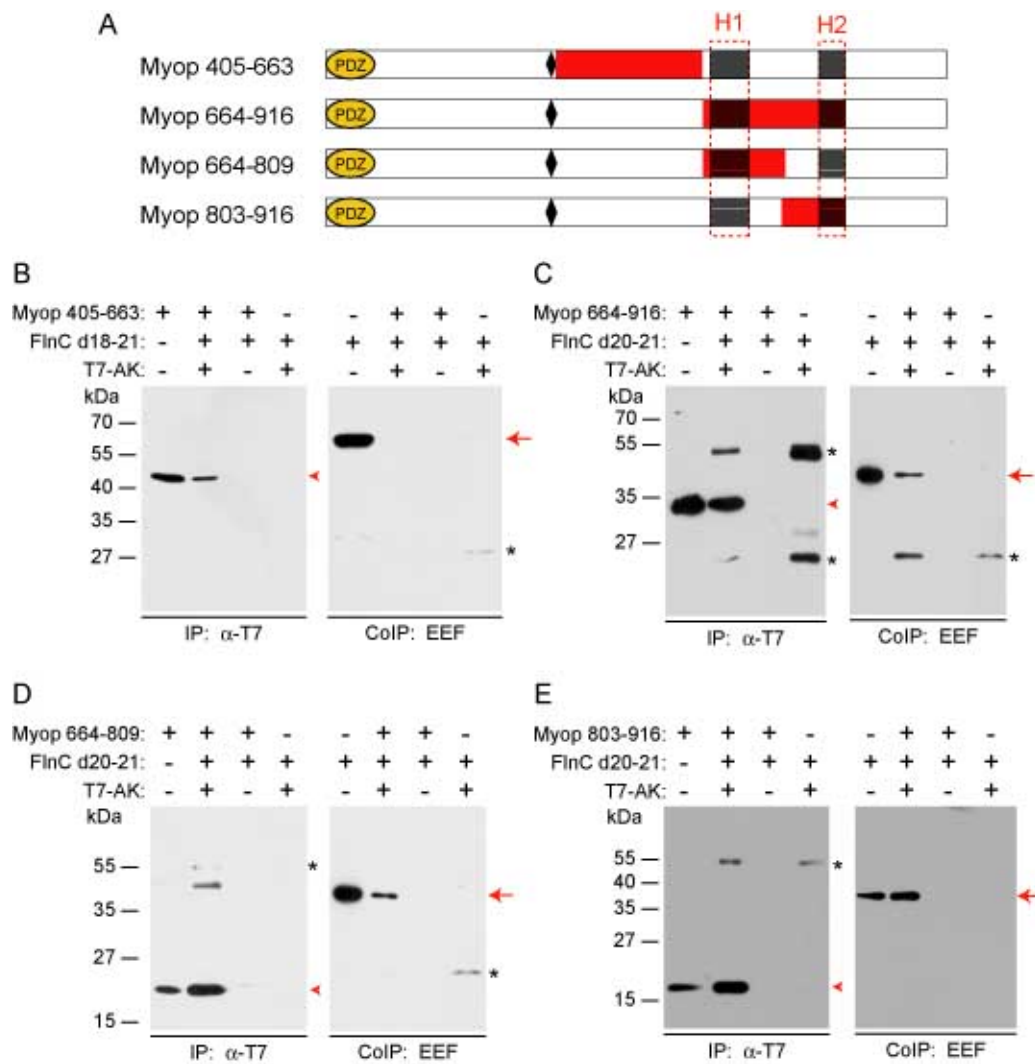


Abbildung 3.39: **Bindungsstudie zur Einengung der Filaminbindungsstelle im Myopodin.** A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die für die folgenden Coimmunpräzipitationen eingesetzten Regionen rot hervorgehoben sind. B-E: Western Blots der Coimmunpräzipitationen der oben dargestellten Myopodinfragmente mit Filamin C d18-21 (B) sowie d20-21 (C-E). Links sind die Immunpräzipitationen der T7-markierten Myopodinfragmente, rechts die copräzipitierten Filamin C-Fragmente, detektiert über deren EEF-Tags, gezeigt. Die roten Pfeilköpfe markieren die Laufhöhe der präzipitierten Myopodinfragmente, die roten Pfeile die erwartete Laufhöhe des copräzipitierten Filaminfragments, \* zeigen die T7-Antikörperketten aus den CoIP-Ansätzen.

3.39 A zeigt, beinhaltet diese Region zwei Sequenzabschnitte (H1 und H2), die, einen hohen Homologiegrad mit den anderen Familienmitgliedern der Podine aufweisen. Untereinander zeigen H1 und H2 aber keine signifikante Homologie. Ein *Alignment* der homologen Regionen aller drei Podine ist im Anhang (Abb. B.3) gezeigt. Deshalb sollte weiterhin untersucht werden, ob sich die Bindungsstelle auf einen dieser Blöcke reduzieren lässt. Hierzu wurden wiederum CoIPs mit den Myopodinkonstrukten 664-809 und 803-916 durchgeführt. Allerdings waren beide Fragmente in der Lage Filamin C d20-21 zu binden (Abb. 3.39 D, E). Vermutlich wird die Interaktion mit Filamin C über beide Homologieregionen vermittelt, oder sie stellen zwei unabhängige Filaminbindungsstellen dar.

### 3.3.2 Tritopodin und Synaptopodin interagieren ebenfalls mit Filamin C

Nachdem gezeigt wurde, dass die Homologieregionen des Myopodins mit Filamin C d20-21 interagieren, wurde getestet ob die beiden anderen Familienmitglieder der Podine ebenfalls an Filamin C binden können. Hierzu wurde die Region des Tritopodins und des Synaptopodins, die die homologen Bereiche umfassen (Abb. 3.40, A und 3.41, A), in den prokaryotischen Vektor pET23aT7 kloniert, in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Die gereinigten Proteine wurden in CoIPs mit den Filamin C-Fragmenten d18-21, d18-19 und d20-21 eingesetzt. Die CoIP von Tritopodinfragment H1+H2 zeigte Interaktion mit Filamin C d18-21 (Abb. 3.40, B) sowie mit d20-21 aber nicht mit d18-19 (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie beim Myopodin konnte die Interaktion nicht auf eine der beiden Homologieregionen eingengt werden. Beide zeigten Bindung an Filamin C d18-21 (Abb. 3.40, C, D) und d20-21 (Abb. 3.40 G, H), aber nicht mit d18-19 (Abb. 3.40, E, F).

Die CoIP des Synaptopodinfragments H1+H2 zeigte ebenfalls Interaktion mit Filamin C d18-21 (Abb. 3.41, B). Auch hier konnte die Interaktion auf die Immunglobulindomänen 20-21 eingengt werden, obwohl auch eine sehr schwache Interaktion von H1 mit Filamin C d18-19 detektiert wurde (Abb. 3.41, E). Da diese Bindung sehr schwach erschien, bleibt unklar ob sie spezifisch ist. Der Versuch, die Interaktion auf eine der beiden Homologiere-

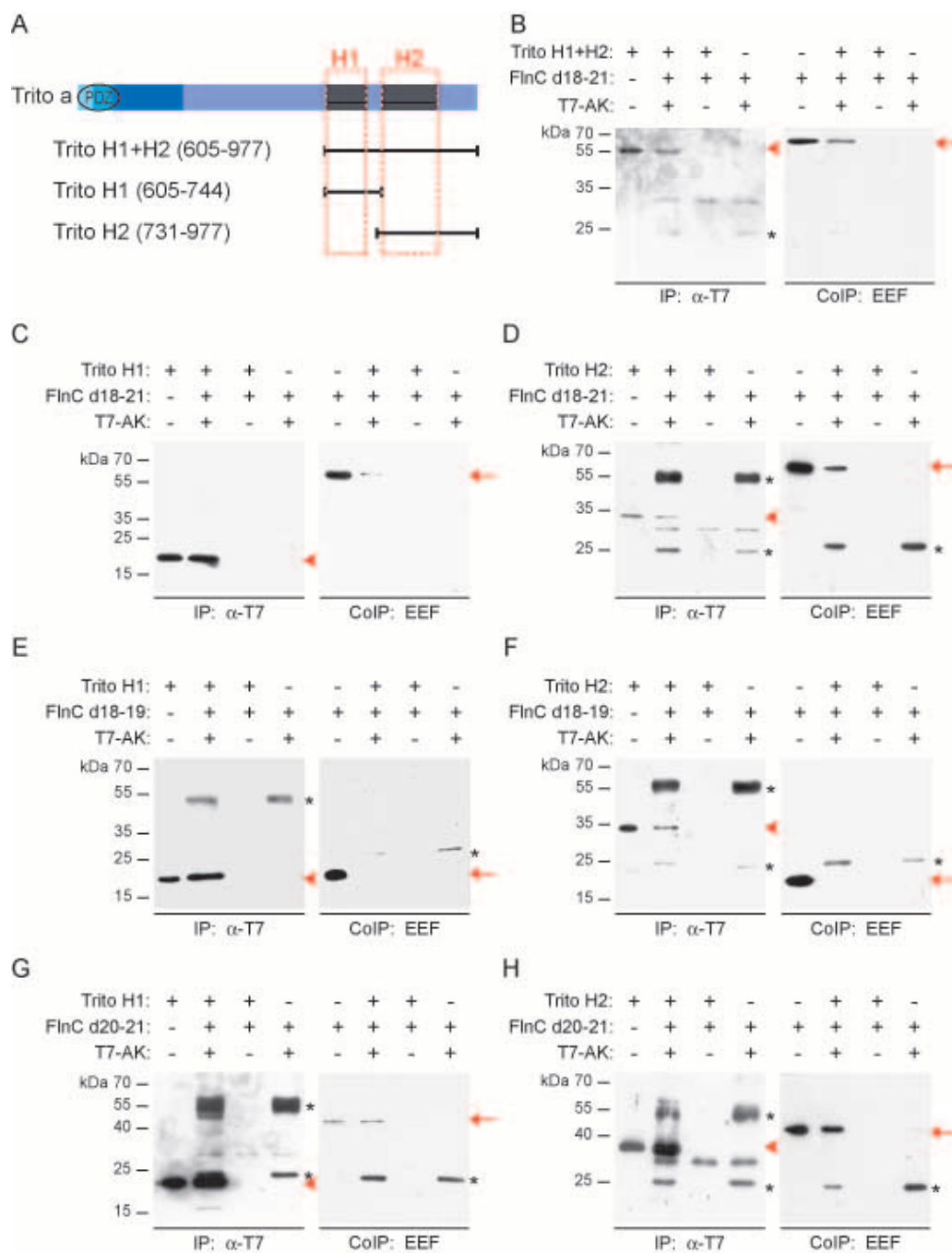


Abbildung 3.40: **Nachweis der Bindung von Tritopodin mit Filamin C.** A: Schematische Darstellung der Tritopodinvariante a mit den verwendeten Tritopodinfragmenten, wobei die Homologieregionen H1 und H2 rot hervorgehoben sind. B: Western Blots der CoIP von Trito H1+H2 mit Filamin C d18-21; C-H: Western Blots der CoIPs von Trito H1 (C, E, G) bzw. Trito H2 (D, F, H) mit Filamin C d18-21 (C, D) d18-19 (E, F) und d20-21 (G, H). Die CoIPs zeigen, dass alle Tritopodinfragmente zumindest schwache Bindung mit Filamin C d20-21 zeigen. Die roten Pfeilköpfe markieren die Laufhöhe der präzipitierten Myopodinfragmente, die roten Pfeile die erwartete Laufhöhe des copräzipitierten Filaminfragments, \* zeigen die T7-Antikörperketten aus den CoIP-Ansätzen.

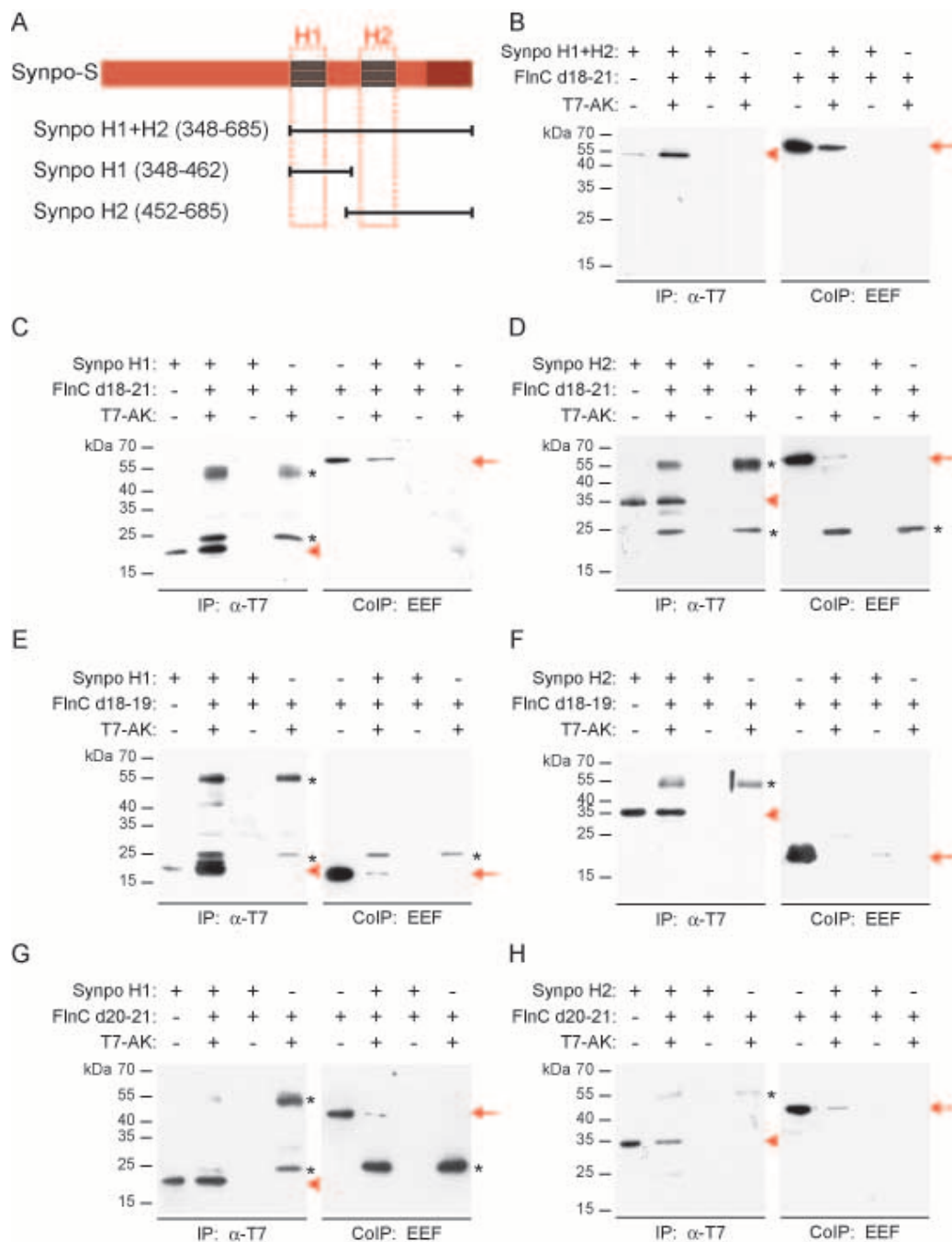


Abbildung 3.41: **Nachweis der Bindung von Synaptopodin mit Filamin C.** A: Schematische Darstellung der Isoform Synpo-S mit den verwendeten Synaptopodinfragmenten, wobei die Homologieregionen H1 und H2 rot hervorgehoben sind. B: Western Blots der CoIP von Synpo H1+H2 mit Filamin C d18-21; C-H: Western Blots der CoIPs von Synpo H1 (C, E, G) bzw. Synpo H2 (D, F, G) mit Filamin C d18-21 (C, D) d18-19 (E, F) und d20-21 (G, H). Die CoIPs zeigen, dass Synaptopodin H1 und H2 relativ schwache Interaktion mit Filamin C d20-21 zeigen, während Synpo H1+H2 starke eine relativ starke Bindung aufweist. Die roten Pfeilköpfe markieren die Laufhöhe der präzipitierten Myopodinfragmente, die roten Pfeile die erwartete Laufhöhe des copräzipitierten Filaminfragments, \* zeigen die T7-Antikörperketten aus den CoIP-Ansätzen.

gionen einzuengen, schlug auch beim Synaptopodin fehl, da beide Interaktion mit Filamin C d18-21 und d20-21 zeigten (Abb. 3.41 C, D und G, H).

Die Ergebnisse aller durchgeführten CoIPs der verschiedenen Podinfragmente mit den Filamin C - Fragmenten sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der CoIPs von den Podin-Proteinen mit Filamin C

Podin	Fragment	Filamin C		
		d18-21	d18-19	d20-21
Myopodin	Myop 405-916	+	-	+
	Myop 405-663	-	-	-
	Myop 664-916 (H1+H2)	+	-	+
	Myop 664-809 (H1)	+	-	+
	Myop 803-916 (H2)	+	-	+
Tritopodin	Trito H1+H2	+	-	+
	Trito H1	+	-	+
	Trito H2	+	-	+
Synaptopodin	Synpo H1+H2	+	-	+
	Synpo H1	+	(+)	+
	Synpo H2	+	-	+

+ Bindung nachgewiesen, (+) schwache Bindung nachgewiesen, - keine Bindung nachgewiesen

### 3.3.3 Myopodin besitzt mehrere unabhängige $\alpha$ -Aktinin Bindungsstellen

Myopodin wird in der Literatur als ein  $\alpha$ -Aktinin bindendes Protein beschrieben (Faul *et al.*, 2007) und für Synaptopodin sind sogar mehrere unabhängige Bindungsstellen bekannt (Asanuma *et al.*, 2005). Um die Bindungsregion für  $\alpha$ -Aktinin im Myopodin einzuengen, wurden CoIPs mit verschiedenen rekombinanten Myopodinfragmenten (Abb. 3.42, A) und  $\alpha$ -Aktinin2 durchgeführt. Die T7-markierten Myopodinfragmente wurden mit Hilfe des monoklonalen T7-Antikörpers präzipitiert und gebundenes  $\alpha$ -Aktinin2 wurde mittels seines EEF-Tags nachgewiesen. Die CoIPs (Abb. 3.42) ergaben, dass auch Myopodin mehrere unabhängige  $\alpha$ -Aktinin2-Bindungsstellen umfasst. Eine Zusammenfassung dieser Daten ist in Abbildung 3.43 gezeigt. Die Interaktion von Myopodin mit

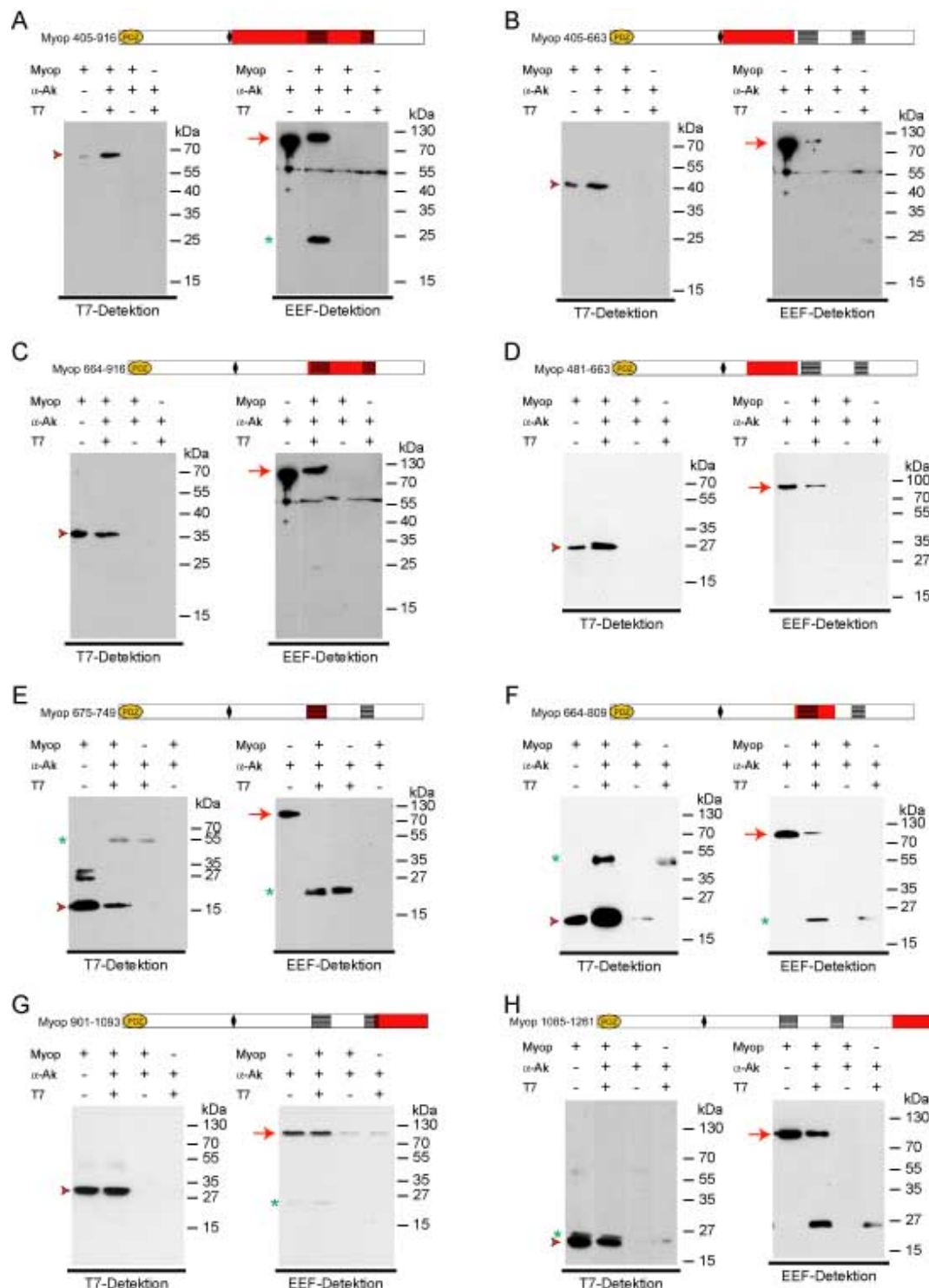


Abbildung 3.42: **Bindungsstudien zur Einengung der  $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstelle im Myopodin.** A-F: Western Blots der Coimmunpräzipitationen verschiedener Myopodinfragmente mit  $\alpha$ -Aktinin2. Die jeweils verwendeten Myopodinfragmente sind der schematischen Darstellung darüber zu entnehmen, wobei die entsprechende Region rot hervorgehoben ist. Links ist die T7-Detektion der präzipitierten Myopodinfragmente, rechts die Detektion des EEFTags des  $\alpha$ -Aktinins gezeigt. Die roten Pfeilköpfe markieren die Laufhöhe der Myopodinfragmente, die roten Pfeile die des  $\alpha$ -Aktinins; \* zeigen die T7-Antikörperketten aus den CoIP-Ansätzen.



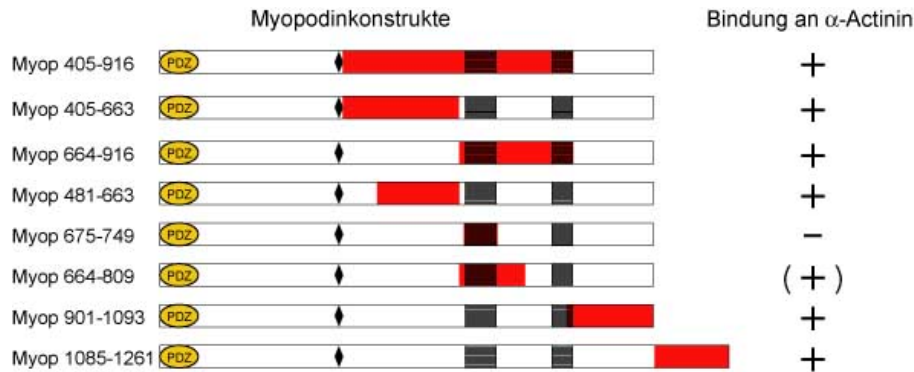


Abbildung 3.43: **Zusammenfassung der Coimmunpräzipitationen verschiedener Myopodinfragmente mit  $\alpha$ -Aktinin2.** Myopodin besitzt mehrere unabhängige  $\alpha$ -Aktinin2-Bindungsstellen, welche sich in dem von Exon 4 kodierten Bereich eingrenzen lassen und somit in allen Myopodinisoformen vorhanden sind.

$\alpha$ -Aktinin2 scheint sich dabei auf die von den Exons 4 und 6 kodierten Bereiche zu begrenzen. Bindungsstudien mit Fragmenten kodiert von Exon 1 bis 3 waren in früheren Ergebnissen negativ (Vakeel, 2006).

### 3.3.3.1 Bestimmung der Bindungsstärke von Myopodin und $\alpha$ -Aktinin mittels SAW

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Myopodin mit  $\alpha$ -Aktinin interagiert, sollte die Affinität der beiden Proteine zueinander, wie im Falle des Filamin C, durch SAW-Messungen bestimmt werden. Myopodin 405-916 wurde wie unter Abschnitt 3.3.1.3 beschrieben auf der Sensoroberfläche immobilisiert und durch die Zugabe steigender Konzentrationen von  $\alpha$ -Aktinin die Bindung detektiert. Der  $k_D$ -Wert der Bindung von Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin wurde mit  $2,71 \times 10^{-6} \text{ M} \pm 1,55 \times 10^{-6} \text{ M}$  bestimmt, wobei wiederum eine moderate Assoziationskonstante von  $4,21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \pm 4,58 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und eine geringe Dissoziationskonstante von  $6,27 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \pm 5,31 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ermittelt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.



Tabelle 3.5: Kinetische Daten der Bindung von Myopodin an  $\alpha$ -Aktinin

	$k_{Ass}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{Diss}$ ( $s^{-1}$ )	$k_D$ -Wert (M)
Messung 1 (Detail)	$1,43 \times 10^3$	$4,60 \times 10^{-3}$	$3,28 \times 10^{-6}$
Messung 2 (Detail)	$1,10 \times 10^4$	$1,41 \times 10^{-2}$	$1,28 \times 10^{-6}$
Messung 3 (Detail)	$2,52 \times 10^3$	$3,93 \times 10^{-3}$	$1,65 \times 10^{-6}$
Messung 4 (Detail)	$1,85 \times 10^3$	$2,43 \times 10^{-3}$	$4,65 \times 10^{-6}$
<b>Mittelwert</b>	<b><math>4,21 \times 10^3</math></b>	<b><math>6,27 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>2,71 \times 10^{-6}</math></b>
<b>SD</b>	<b><math>\pm 4,58 \times 10^3</math></b>	<b><math>\pm 5,31 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>\pm 1,55 \times 10^{-7}</math></b>

### 3.3.3.2 Charakterisierung der Myopodin- $\alpha$ -Aktinin2-Interaktion

Um die Myopodinbindungsstelle im  $\alpha$ -Aktinin2-Molekül genauer zu bestimmen, wurden verschiedene trunkierte cDNA-Fragmente des  $\alpha$ -Aktinin2 kloniert und in Bakterien exprimiert (Abb. 3.44, A). Mit dem Wissen, dass Myopodin mehrere unabhängige  $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstellen beinhaltet (siehe Abschnitt 3.3.3), stellte sich die Frage, ob mehrere  $\alpha$ -Aktinin2-Moleküle an einem Myopodinmolekül binden (Abb. 3.44, B I) oder ob sich die beiden Moleküle parallel oder antiparallel aneinander lagern, also eine 1:1 Bindung stattfindet (Abb. 3.44, B II). Die zweite Hypothese könnte sich bestätigen, wenn der C-Terminus des Myopodins an einer anderen Region des  $\alpha$ -Aktinins bindet, als der N-terminal bindende Bereich. Deshalb wurden speziell das N-terminal gelegene  $\alpha$ -Aktinin-bindende Myopodinfragment, sowie der C-Terminus der Isoform b für diese Interaktionsstudien ausgewählt.

Die CoIPs zeigten, dass sowohl der zentrale Teil des Myopodins (Myop 481-663) als auch das C-terminale Fragment Myop 901-1093 Interaktionen mit den *Spektrin-like-Repeats* des  $\alpha$ -Aktinins eingehen (Abb. 3.44, C, D). Da die Fragmente  $\alpha$ -Aktinin R1-R4 und R1-R3 mit beiden Myopodinfragmenten copräzipitiert wurden, R1-R2 und R4-CAM jedoch nicht, kann daraus geschlossen werden, dass die Spektrin-ähnliche Domäne 3 (R3) für beide Interaktion essentiell ist und mehrere  $\alpha$ -Aktinin-Moleküle an einem Myopodinmolekül binden können. Zudem zeigte die Aktinbindungsdomäne des  $\alpha$ -Aktinins in beiden Fällen eine zwar schwache aber dennoch nachweisbare Wechselwirkung.

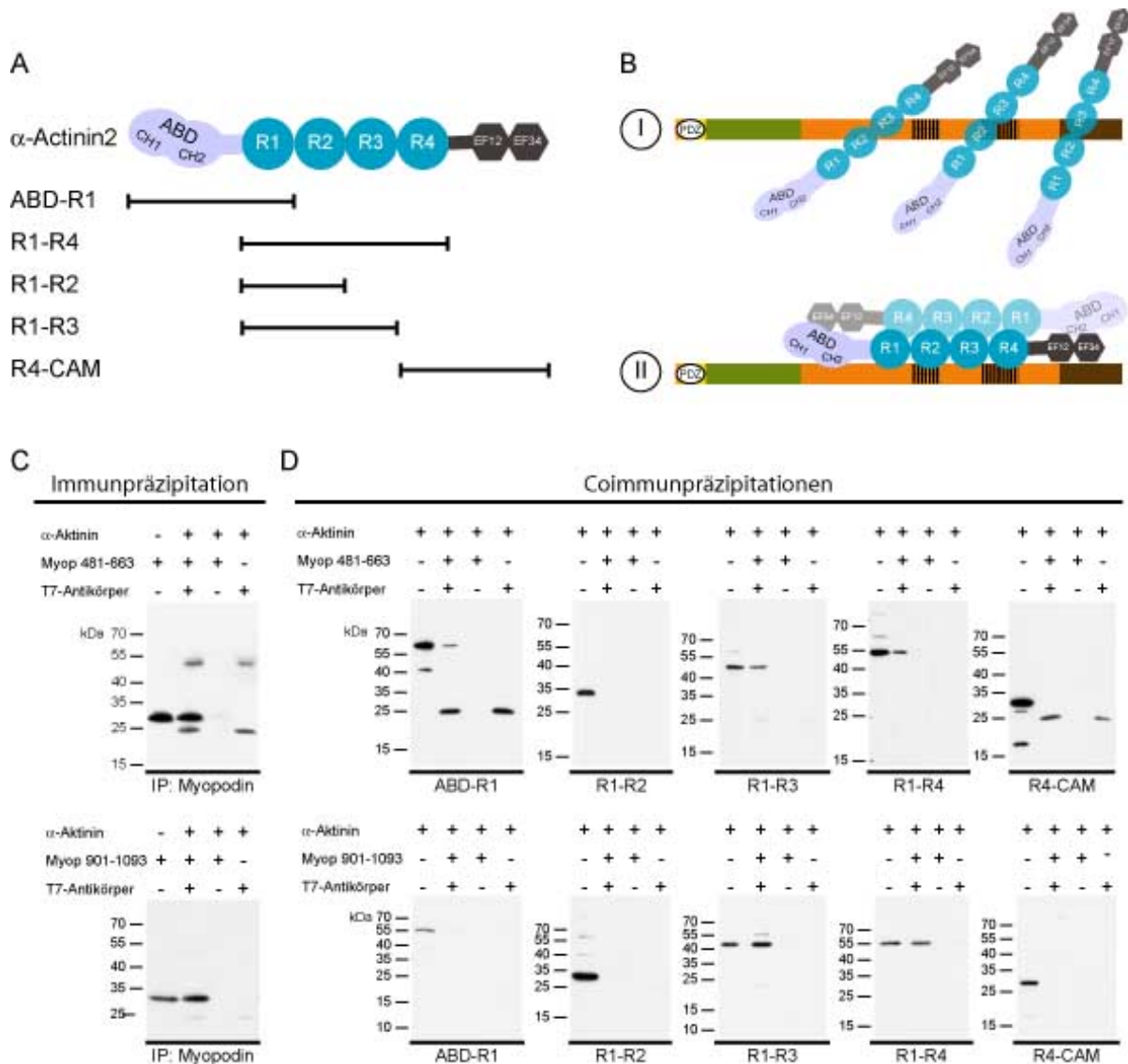


Abbildung 3.44: **Bindungsstudien zur Charakterisierung der Myopodin-α-Aktinin2-Interaktion.** A: Schematische Darstellung des α-Aktinin2-Moleküls sowie der verwendeten Fragmente. B: Darstellung zweier Möglichkeiten der Art der Interaktion von Myopodin mit α-Aktinin. C: Western Blots der Immunpräzipitationen der T7-markierten Myopodinfragmente 481-663, bzw. 901-1093. D: Western Blots der copräzipitierten, EEF-markierten α-Aktinin-Fragmente. Beide Myopodinfragmente zeigen Interaktion mit den α-Aktinin-Fragmenten R1-R3 und R1-R4, obwohl auch die ABD des α-Aktinins eine schwache Wechselwirkung zeigt.

### 3.3.4 Tritopodin besitzt ebenfalls mehrere unabhängige $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstellen

Nachdem für Myopodin gezeigt werden konnte, dass es ebenso wie Synaptopodin (Asanuma *et al.*, 2005) mehrere unabhängige  $\alpha$ -Aktinin Bindungsstellen besitzt, wurden mit verschiedenen Tritopodinfragmenten (Abb. 3.45, A) CoIPs durchgeführt, um zu überprüfen, ob dies auch auf Tritopodin zutrifft. Die Bindungsstudien zeigten, dass sowohl Trito (b) 1-385 und Trito (c) 79-602 als auch Trito H1+H2 (605-977) und Trito H1 (605-744) eine Interaktion mit  $\alpha$ -Aktinin eingingen. Die N-terminalen Fragmente (Trito (a) 1-85 und Trito (a) 79-278) wiesen hingegen keine Bindung auf. Somit lässt sich die Bindung an  $\alpha$ -Aktinin auf den vom Exon 5 kodierten Bereich eingrenzen, wobei hier mindestens zwei unabhängige Bindungsstellen vorliegen. Diese Bindung konnte kürzlich auch mit gezielten Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten bestätigt werden (Gläser, 2009; Rieck, 2010). Abbildung 3.46 bietet eine Zusammenfassung der Bindungsstudien.

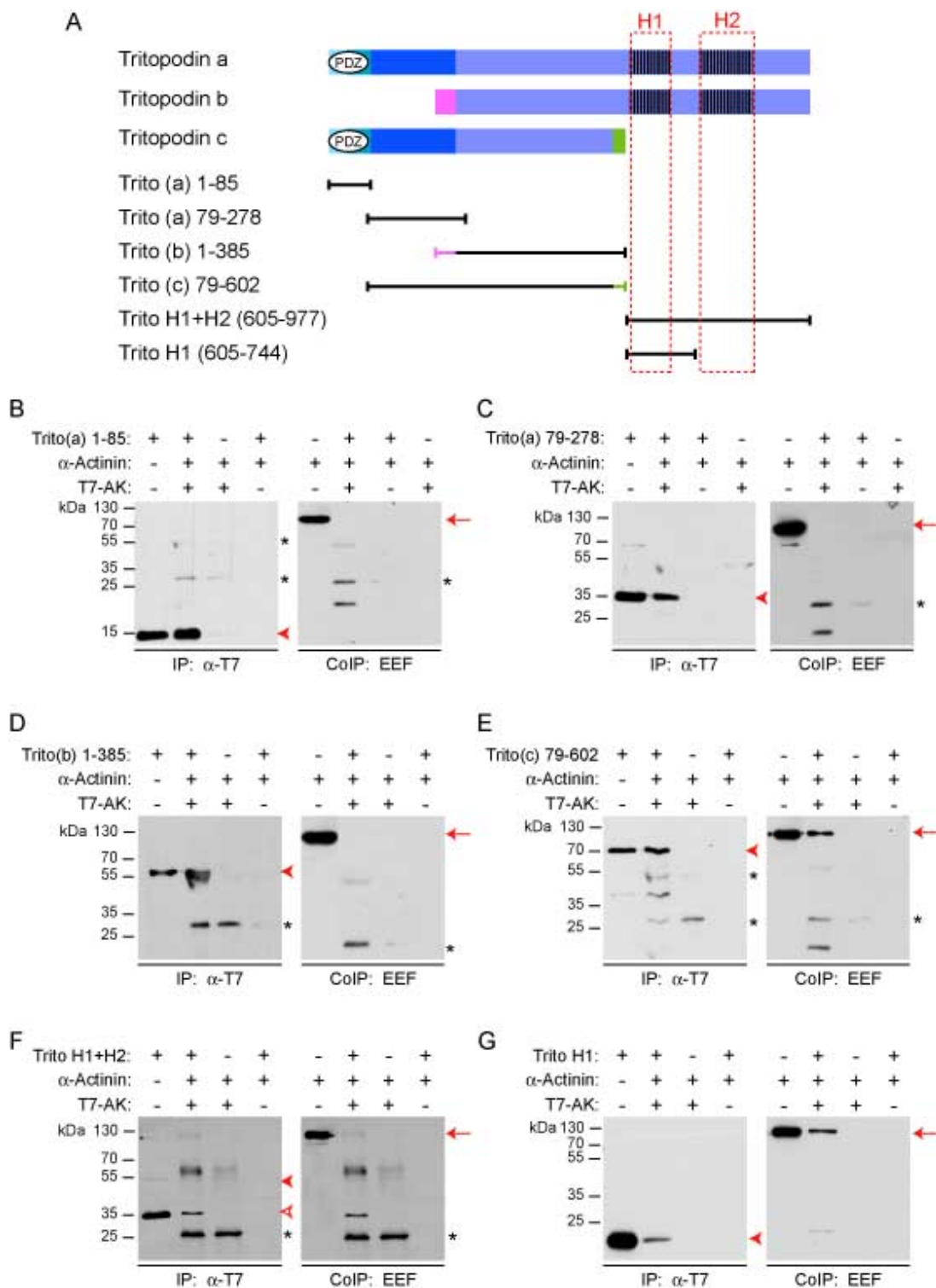


Abbildung 3.45: **Bindungsstudien der  $\alpha$ -Aktinin2-Tritopodin-Interaktion** A: Schematische Darstellung der Tritopodinvariante a mit den verwendeten Tritopodinfragmenten, wobei die Homologieregionen H1 und H2 rot hervorgehoben sind. B-G: Western Blots der Coimmunpräzipitationen verschiedener Tritopodinfragmente mit  $\alpha$ -Aktinin2, wobei die jeweils verwendeten Fragmente der Beschriftung zu entnehmen sind. Links ist die T7-Detektion der präzipitierten Tritopodinfragmente, rechts die Detektion des EEF-tags des  $\alpha$ -Aktinins gezeigt. Die roten Pfeilköpfe markieren die Laufhöhe der Tritopodinfragmente, die roten Pfeile die des  $\alpha$ -Aktinins; \* zeigen die T7-Antikörperketten aus den CoIP-Ansätzen.

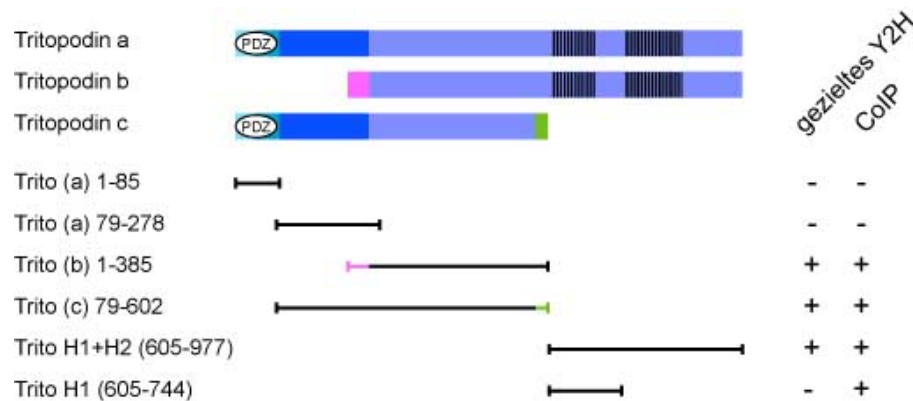


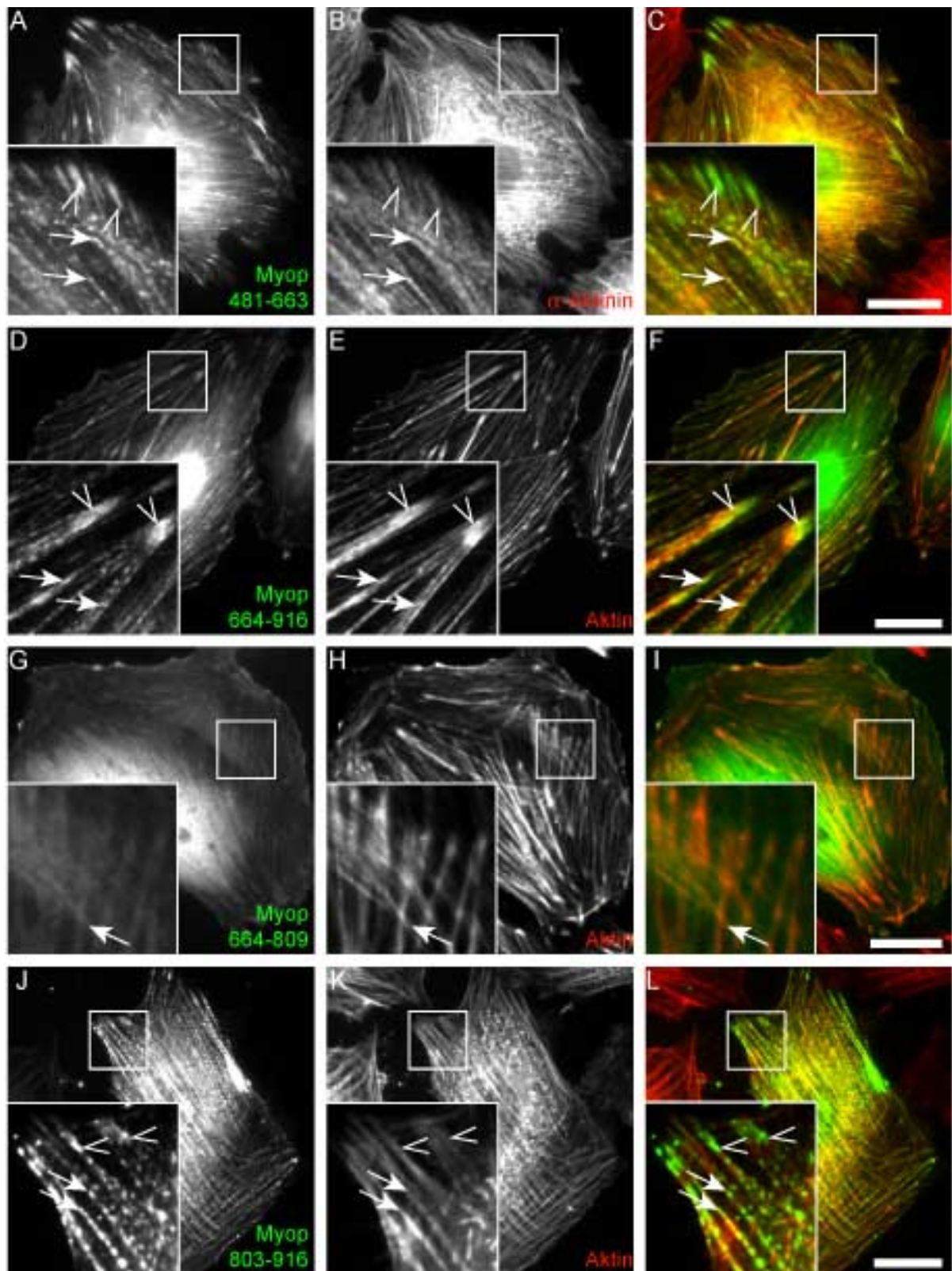
Abbildung 3.46: **Zusammenfassung der Bindungsstudien verschiedener Tritopodinfragmente mit  $\alpha$ -Aktinin2.** Tritopodin besitzt mehrere unabhängige  $\alpha$ -Aktinin2-Bindungsstellen, welche sich im vom Exon 5 kodierten Bereich befinden und somit in Tritopodinisoform a und b komplett vorhanden sind. In Isoform c, in der ein Teil des Exon 5 herausgespleißt ist, ist nur die N-terminal gelegene  $\alpha$ -Aktinin2-Bindungsstelle vorhanden.

### 3.3.5 Bestätigung der Funktionalität der Bindungsregionen der Podine durch transiente Transfektionen

Um die Funktionalität der für die Bindungsassays verwendeten Podinfragmente zu untersuchen, wurden diese als GFP-Fusionskonstrukte in A7r5-Glattnuskelzellen transfiziert und auf ihr subzelluläres *Targeting* hin untersucht. Zeigen die Konstrukte eine spezifische Lokalisation, so kann geschlussfolgert werden, dass sie durch einen Interaktionspartner dorthin dirigiert werden.

#### 3.3.5.1 Bestätigung der Funktionalität der Bindungsregionen des Myopodins durch transiente Transfektionen

Die Untersuchung des *Targetings* der Myopodinfragmente zeigte, dass mit Ausnahme des Fragmentes 664-809 (Abb. 3.47, G bis I), welches ebenso wie GFP alleine (Abb. 3.47, S bis U) diffus in der Zelle vorlag, alle Konstrukte in den *dense bodies* (Abb. 3.47, Pfeile), bzw. in den Anheftungsplatten (3.47, offene Pfeilköpfe) lokalisierten. Diese Strukturen sind, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, reich an  $\alpha$ -Aktinin und Filamin. Dieses *Targeting* könnte auf die Bindungsstellen für Filamin und  $\alpha$ -Aktinin zurückzuführen sein. Das Myopodinfragment 664-809, welches die erste Homologieregion



(Bildunterschrift siehe nächste Seite)



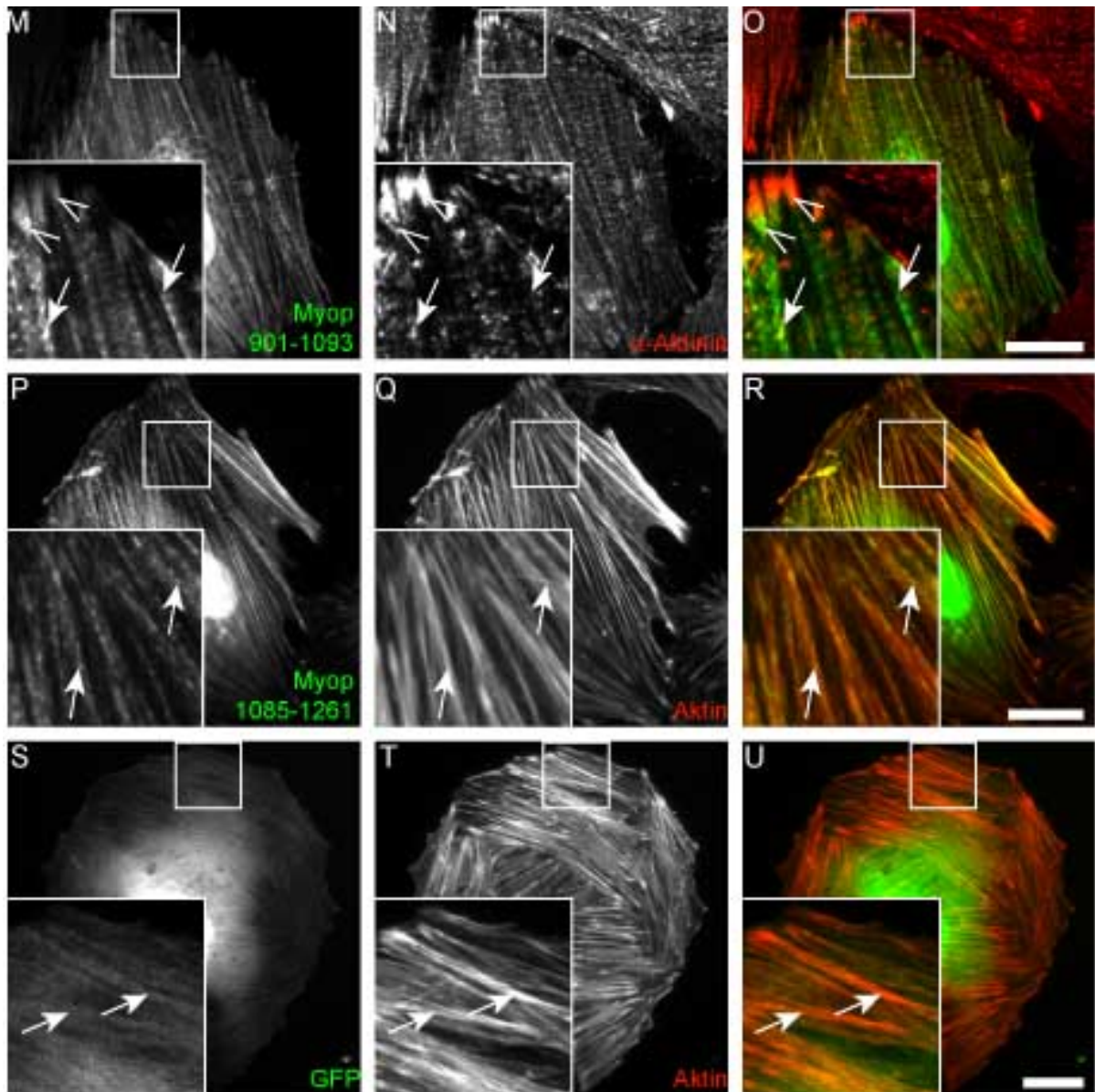


Abbildung 3.47: **Transiente Transfektionen verschiedener Myopodinfragmente in A7r5-Zellen.** Dargestellt sind Immunfluoreszenzaufnahmen transfizierter A7r5-Zellen zur Untersuchung des *Targetings* der eingesetzten Myopodinfragmente. Die linke Spalte zeigt das GFP-Signal der im Bild angegebenen transfizierten Myopodinkonstrukte, die mittlere Spalte die Referenzfärbung, entweder gegen  $\alpha$ -Aktinin (BM75.2) oder gegen Aktin (Phalloidin). Rechts ist das Überlagerungsbild gezeigt, wobei die GFP-Fusionsproteine in grün und die Referenzfärbungen in rot dargestellt sind. Die Detailaufnahmen stellen die dreifache Vergrößerung der markierten Bereiche dar. Mit Ausnahme des Myopodinfragmentes 664-809 (G), welches überwiegend ebenso wie GFP alleine (S) diffus im Zytoplasma verteilt ist, zeigen alle *Targeting* an die *dense bodies* (Pfeile) und die Fokalkontakte (Pfeilköpfe). Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .

enthält, zeigte zwar Bindung an Filamin C (siehe Abschnitt 3.3.1.5) sowie an  $\alpha$ -Aktinin (siehe Abschnitt 3.3.3), allerdings in beiden Fällen deutlich schwächer als die anderen Myopodinfragmente, was ein fehlendes *Targeting* dieses Fragmentes erklären könnte.

### 3.3.5.2 Bestätigung der Funktionalität der Bindungsregionen des Synaptopodins und Tritopodins durch transiente Transfektionen

Zudem wurden Transfektionsstudien mit Synaptopodin- und Tritopodinkonstrukten, die die Homologieregionen beinhalten und wie in Abschnitt 3.3.2 gezeigt, mit Filamin C interagieren, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sowohl das Synaptopodinfragment H1+H2 (Abb. 3.48, A bis C) als auch das entsprechende Tritopodinfragment H1+H2 (Abb. 3.49, A bis C) ein starkes *Targeting* an die *dense bodies* (Pfeile) und die Anheftungspunkte (offene Pfeilköpfe) zeigten. Die Fragmente, die nur die erste Homologieregion enthielten, lagen vorwiegend diffus im Zellinneren vor und zeigten nur in der Zellperipherie ein schwaches *Targeting* an die Aktinfilamente (Abb. 3.48, 3.49, D bis F). Die Fragmente mit Homologieregion 2 zeigten ein deutlich schwächeres *Targeting* als diejenigen mit beiden Homologieregionen (Abb. 3.48, 3.49, G bis I). Die gleichen Beobachtungen konnten auch mit den entsprechenden Myopodinfragmenten gemacht werden (vgl. Abb. 3.47, D bis L), was zusammen mit den Bindungsstudien auf eine ähnliche Funktion der homologen Bereiche in den unterschiedlichen Podinen schließen lässt.



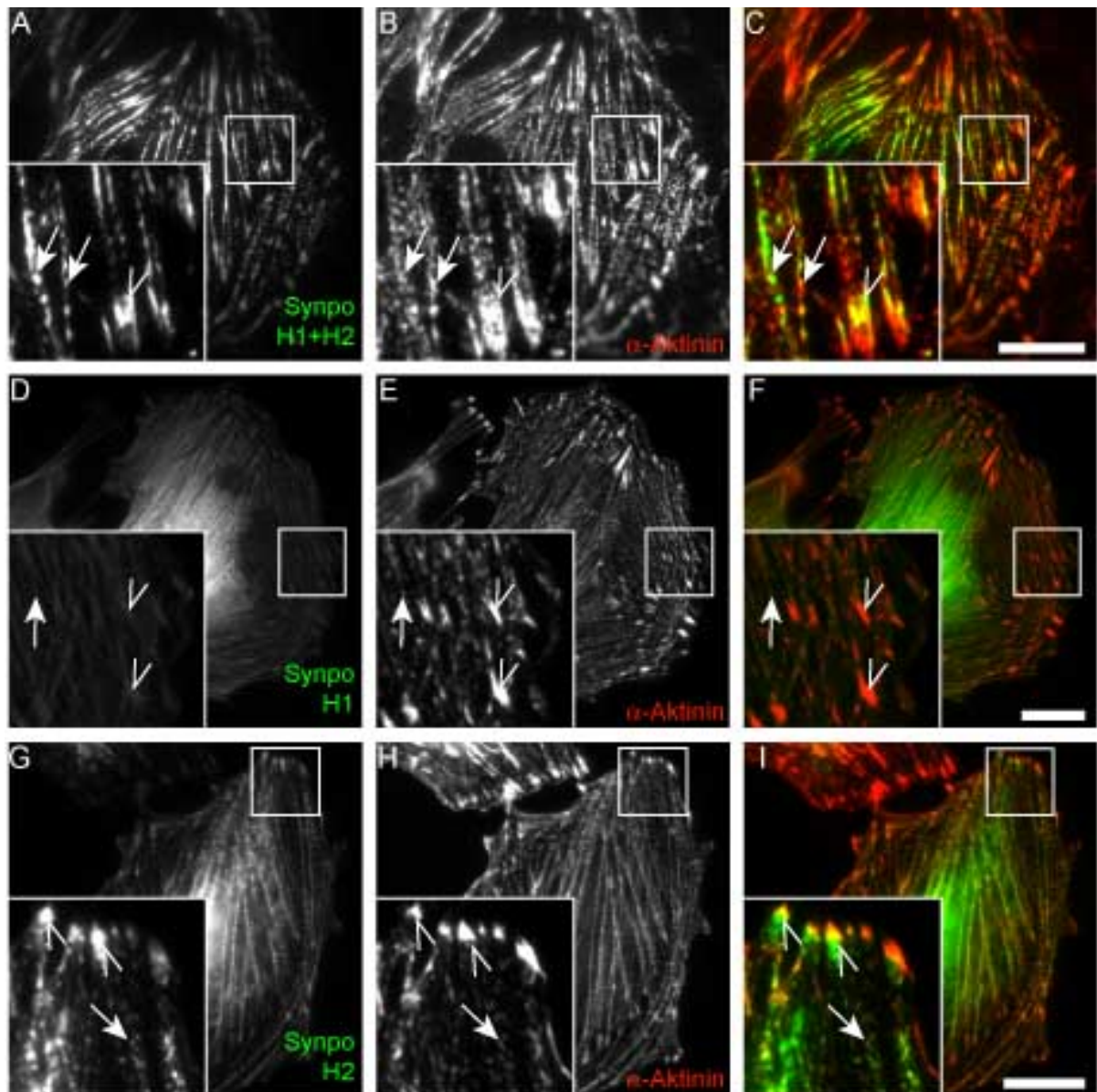


Abbildung 3.48: **Transiente Transfektionen verschiedener Synaptopodinfragmente in A7r5-Zellen.** Dargestellt sind Immunfluoreszenzaufnahmen transfizierter A7r5-Zellen zur Untersuchung des *Targetings* der eingesetzten Synaptopodinfragmente. Die linke Spalte zeigt das GFP-Signal der im Bild angegebenen transfizierten Synaptopodinkonstrukte, die mittlere Spalte die Referenzfärbung gegen  $\alpha$ -Aktinin (BM75.2). Rechts ist das Überlagerungsbild gezeigt, wobei die GFP-Fusionsproteine in grün und die Referenzfärbungen in rot dargestellt sind. Die Detailaufnahmen stellen die dreifache Vergrößerung der markierten Bereiche dar. Synpo H1+H2 und Synpo H2 zeigen starkes *Targeting* an die *dense bodies* (Pfeile) und die Fokalkontakte (Pfeilköpfe), während Synpo H1 überwiegend diffus im Zytoplasma verteilt ist. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .

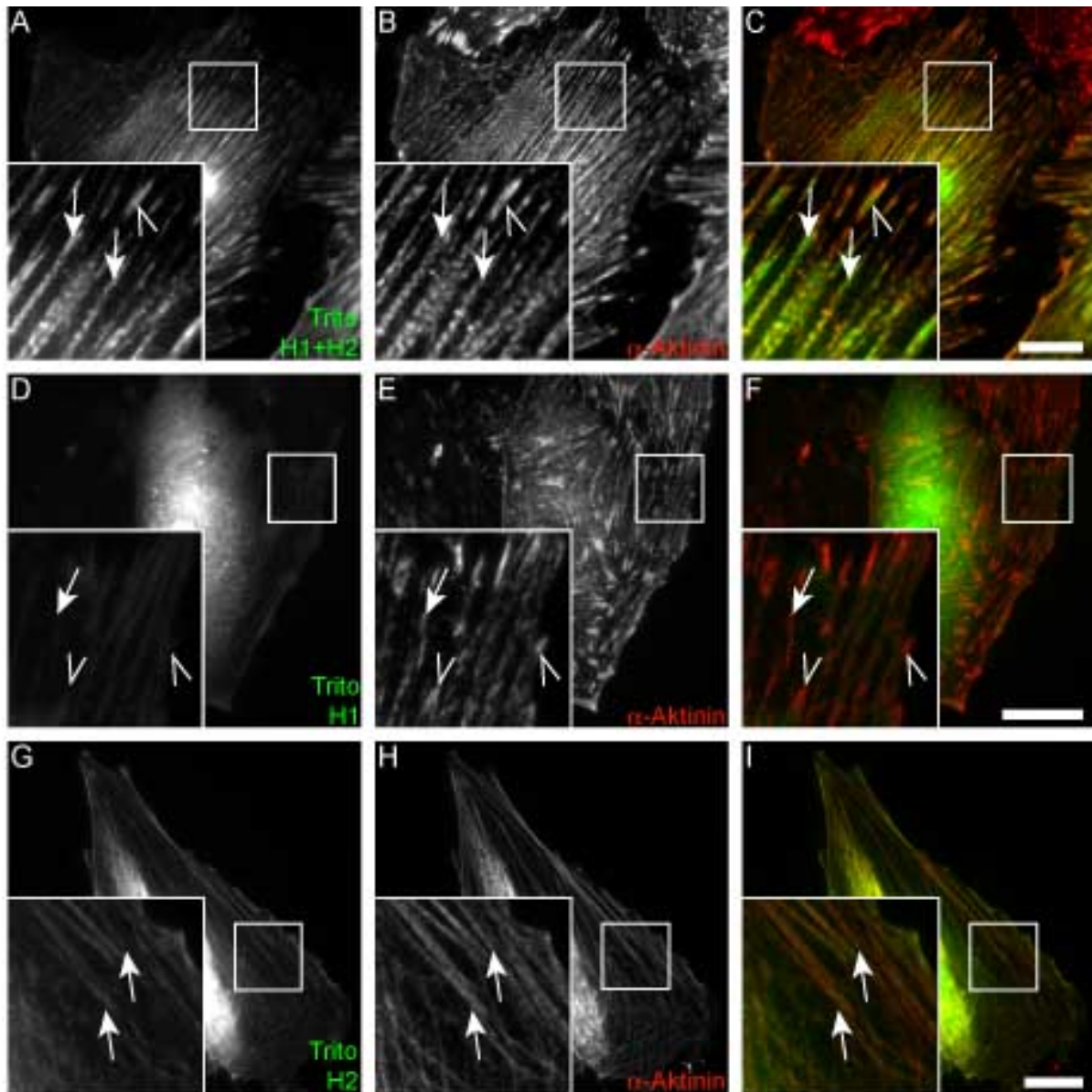


Abbildung 3.49: **Transiente Transfektionen verschiedener Tritopodinfragmente in A7r5-Zellen.** Dargestellt sind Immunfluoreszenzaufnahmen transfizierter A7r5-Zellen zur Untersuchung des *Targetings* der eingesetzten Tritopodinfragmente. Die linke Spalte zeigt das GFP-Signal der im Bild angegebenen transfizierten Tritopodinkonstrukte, die mittlere Spalte die Referenzfärbung gegen  $\alpha$ -Aktinin (BM75.2). Rechts ist das Überlagerungsbild gezeigt, wobei die GFP-Fusionsproteine in grün und die Referenzfärbungen in rot dargestellt sind. Die Detailaufnahmen stellen die dreifache Vergrößerung der markierten Bereiche dar. Trito H1+H2 zeigt starkes, Trito H2 eher schwaches *Targeting* an die *dense bodies* (Pfeile) und die Fokalkontakte (Pfeilköpfe), während Trito H1 überwiegend diffus im Zytoplasma verteilt ist. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.6 Myopodin wird *in vitro* phosphoryliert

Nachdem Myopodin als ein Multiadapterprotein der Z-Scheibe beschrieben war, stellte sich die Frage, wie diese Vielzahl an Interaktionen reguliert werden kann. Eine weit verbreitete Art der Regulation von Protein-Protein-Interaktionen ist die Phosphorylierung. Faul *et al.* (2007) konnten bereits zeigen, dass Myopodin durch die Proteinkinase A (PKA) und die Calmodulin-abhängige Kinase II (CAMKII) phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierungen die Interaktion von murinem Myopodin mit 14-3-3-Proteinen regulieren. Deshalb wurden in dieser Arbeit weitere Versuche unternommen, spezifische Phosphorylierungen des humanen Myopodins *in vitro* zu charakterisieren. Für diese Versuche wurde rekombinant exprimiertes, T7-markiertes Myopodinfragment 405-916 gereinigt und mit definierten rekombinanten Kinasen (PKA, PKC und MAPK) in Gegenwart von  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$  inkubiert. Die Ansätze wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und anschließend autoradiographiert. Zusätzlich wurde der Blot anschließend mit dem T7-Antikörper gefärbt, um das eingesetzte Myopodin zu detektieren. Die Untersuchungen zeigten, dass Myopodin *in vitro* von allen getesteten Kinasen phosphoryliert wurde (Abb. 3.50).

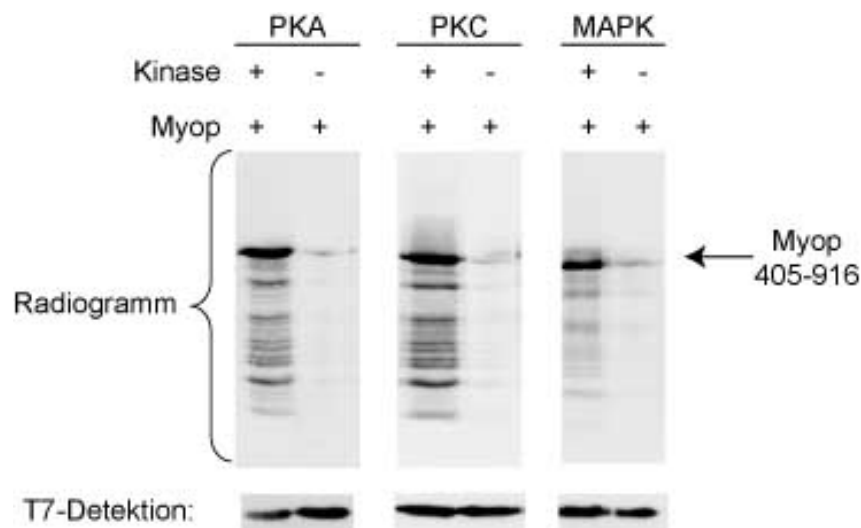


Abbildung 3.50: ***In vitro* Phosphorylierung von Myopodin.** Dargestellt sind die Radiogramme der *in vitro* Phosphorylierung von Myopodinfragment 405-916 mit PKA, PKC und MAPK. Darunter sind zum Nachweis des Myopodins die Immunfärbungen mit dem T7-Antikörper gezeigt. Myopodin wird *in vitro* von allen getesteten Kinasen phosphoryliert.

## 3.4 Myopodin ist ein F-Aktin-bindendes Protein

### 3.4.1 Myopodin besitzt zwei voneinander unabhängige F-Aktinbindungsstellen

Myopodin wurde bereits früher als ein Aktin-bindendes Protein beschrieben. Weins *et al.* (2001) konnten in einem Aktin Cosedimentationsassay zeigen, dass *in vitro* translatiertes, <sup>35</sup>S-markiertes Myopodin zusammen mit F-Aktin pelletiert wird. Die Überexpression von Myopodin in C2C12- und A7-Zellen (*rescued* M2-Filamin defiziente Zellen) zeigte massive Bündelung von Aktin im Zytosol und Aktin-enthaltende *Loops* im Nukleus. Die Aktinbindungsstelle wurde anhand trunkierter Myopodinf Fragmente und durch Analyse des *Targetings* dieser Konstrukte in C2C12-Myoblasten eingengt. Mit dem Wissen, dass Myopodin mehrere Bindungspartner besitzt (siehe Abschnitte 3.3.1, 3.3.3), stellte sich die Frage, ob dieses *Targeting* wirklich auf die Interaktion mit Aktin zurückzuführen ist, oder ob es durch eine der oben bereits beschriebenen Interaktionen, wie z. B. Filamin oder  $\alpha$ -Aktinin, bedingt ist.

Um die Bindung von Myopodin an F-Aktin näher zu charakterisieren, wurden hier Aktin-*High speed Cosedimentationsassays* mit verschiedenen Myopodinkonstrukten durchgeführt (Abb. 3.51 - 3.56). Hierbei wurde zunächst G-Aktin in einer Konzentration von 5  $\mu$ M polymerisiert und anschließend das entsprechende Myopodinf Fragment in steigenden Konzentrationen von 0 bis 10  $\mu$ M zugesetzt. In der folgenden Zentrifugation wurde das F-Aktin mitsamt der gebundenen Proteine pelletiert, während G-Aktin und nicht an F-Aktin gebundene Proteine im Überstand verblieben. Die Analyse dieser Proben wurde durch eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte am *Odyssey® Infrared Imaging System* der Firma Licor durch Bearbeitung mit Hilfe der Odyssey 3.0 Software. Die Bindung wurde schließlich durch die Auftragung des Quotienten aus gebundenem Myopodin und F-Aktin gegen die eingesetzte Gesamtkonzentration des Myopodins genauer analysiert. Der resultierende Graph sollte bei spezifischer Bindung den Verlauf einer Sättigungskurve zeigen. Mit einer nichtlinearen Regression mithilfe der Software *GraphPad Prism4* ließ sich so das molare Bindungsverhältnis von Myopodin an Aktin bestimmen.  $B_{max}$ , der Grenzwert

besagt somit, wie viele Myopodinmoleküle an einem Aktinmolekül binden. Der ermittelte  $K_D$ -Wert entspricht der Konzentration von Myopodin, bei der die halbmaximale Bindung erreicht wird und ist somit ein Maß für die Bindungsstärke.

Das längste eingesetzte Myopodinfragment umfasste die Aminosäuren 405 bis 916. Dieser zentrale, in allen Myopodinisoformen existente Bereich, zeigte bei Analyse der Überstand- und Pelletproben eine deutliche Anreicherung im Pellet, was darauf schließen lässt, dass diese Region an filamentöses Aktin bindet. Die Auswertung des Kurvenverlaufs ergab ein molares Bindungsverhältnis von etwa 1,8 Myopodin/Aktin. Allerdings muss erwähnt werden, dass bei diesem Experiment die Sättigung nicht erreicht wurde und somit die Extrapolation des Grenzwertes ungenau ist. Auch die dreifache Wiederholung und die Mittelung der erhaltenen Werte (Abb. 3.51, D) zeigte, dass die Sättigung nicht erreicht wurde. Eine Erklärung dafür könnte die Neigung des Myopodins zur Aggregation sein. So war in den Kontrollansätzen mit 10  $\mu\text{M}$  Myopodin ohne Aktin zu beobachten, dass auch hier ein relativ hoher Anteil pelletiert wurde.

Um die F-Aktin-Bindungsstelle im Myopodin eingrenzen zu können, wurden weitere *high speed Cosedimentationsassays* mit den folgenden rekombinant exprimierten Fragmenten durchgeführt: Myop 405-663, Myop 396-533, Myop 635-916, Myop 664-916 sowie Myop 803-916.

Das Myopodinfragment 405-663 zeigte in der SDS-Gelelektrophorese ein abnormes Laufverhalten. Die berechnete Größe beträgt etwa 28 kDa, es hatte aber in der SDS-Gelelektrophorese eine scheinbare Größe von 42 kDa und war somit exakt auf der Laufhöhe des Aktins zu beobachten. Aus diesem Grund wurde die weitere Analyse nicht über Coomassie-gefärbte Gele, sondern über Western Blots durchgeführt, welche anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen Aktin, bzw. gegen den Immunotag des Myopodins inkubiert wurden. Durch die Färbung mit entsprechenden *IRDye*-markierten Sekundärantikörpern konnten das Myopodin und das Aktin simultan sichtbar gemacht und quantifiziert werden (Abb. 3.52, B). Die Analyse ergab, dass diese Region des Myopodins in einem molaren Verhältnis von 0,6 zu 1 an F-Aktin bindet. Der  $K_D$ -Wert wurde mit 5,5  $\mu\text{M}$  bestimmt (Abb. 3.52, C, D). Das N-terminal gelegene Fragment 396-533, welches den gesamten N-Terminus der kleinen Isoformen umfasst, verblieb

während der Zentrifugation im Überstand, woraus sich schließen lässt, dass diese Region keine Affinität zu filamentösem Aktin besitzt (Abb. 3.53).

Die C-terminal gelegenen Myopodinfragmente, welche die Aminosäuren 635-916, bzw. 664-916 umfassen, wurden in steigenden Mengen zusammen mit F-Aktin pelletiert (Abb. 3.54 und 3.55). Das molare Bindungsverhältnis Myopodin zu Aktin wurde für das Fragment 635-916 mit 0,74 zu 1 und für das Fragment 664-916 mit 0,58 zu 1 bestimmt. Der  $K_D$ -Wert für das Myopodinfragment 635-916 beträgt  $4,7 \mu\text{M}$  und für das Fragment 664-916  $3,6 \mu\text{M}$ . Somit zeigen diese beiden Konstrukte ein sehr ähnliches Bindungsverhalten an F-Aktin. Das Myopodinfragment 803-916 wurde nicht in steigenden Mengen im Pellet nachgewiesen und zeigt somit keine Interaktion mit F-Aktin (Abb. 3.56).

Da sowohl das N-terminale Fragment 405-663, also auch das C-terminale Fragment 664-916 Bindung an F-Aktin aufwiesen, wurden zwei voneinander unabhängige F-Aktinbindungsdomänen nachgewiesen. Der Vergleich der Bindungen verdeutlichte, dass die N-terminal gelegene Bindungsstelle schwächer ist als die C-terminale. Da die Fragmente 396-533 und 803-916 nicht mit F-Aktin interagierten, ließ sich die vordere Aktinbindungsstelle im Bereich der Aminosäuren 534-663, die hintere bei 664-802 lokalisieren. Somit konnte ich zeigen, dass alle Myopodinisoformen zwei voneinander unabhängige F-Aktinbindungsstellen besitzen.



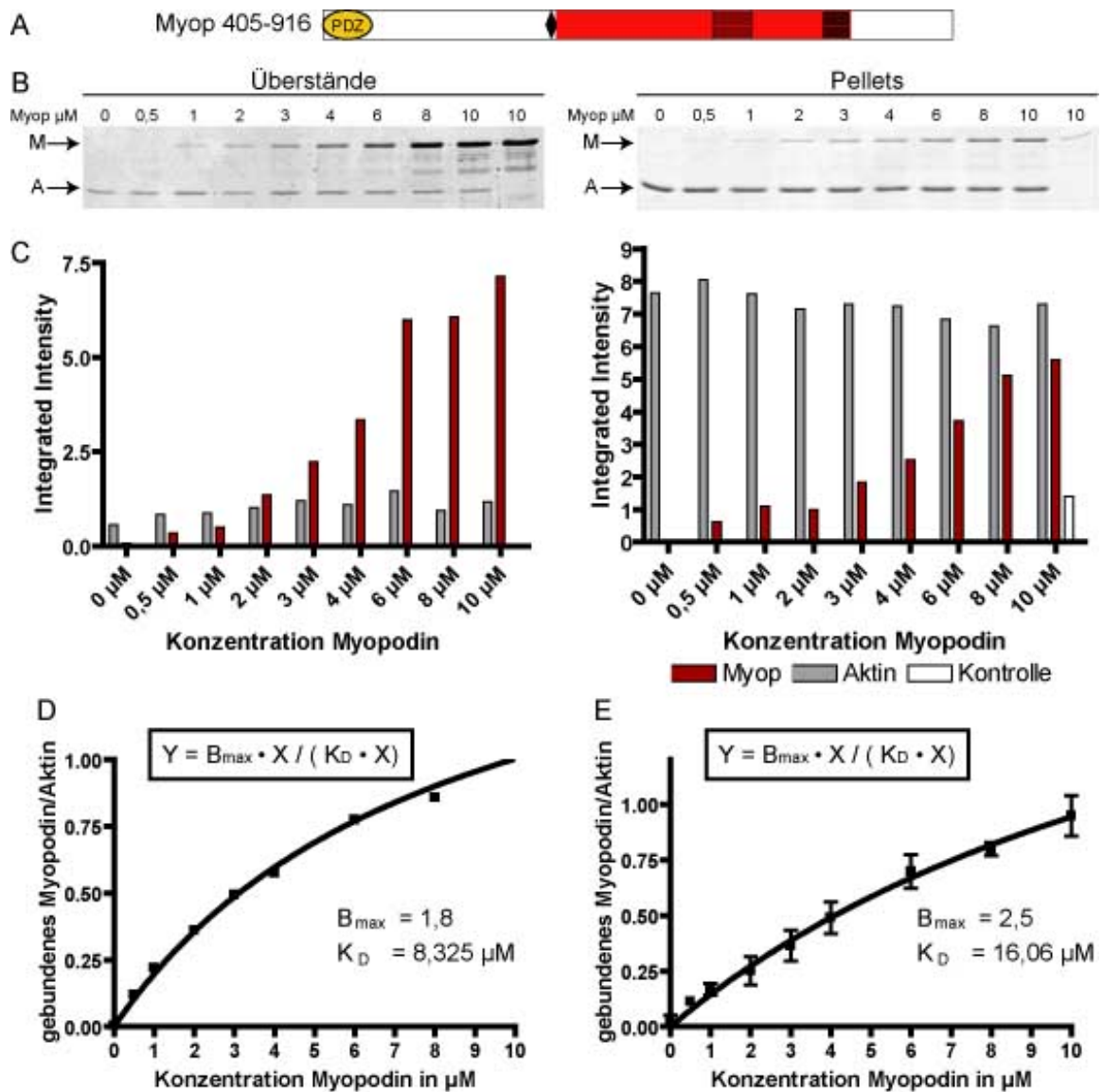


Abbildung 3.51: Aktin *high speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 405-916. A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: SDS-Gele der Überstand- und Pelletproben der *high speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodinfragments ist der Beschriftung der Gele zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin- (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment wurde mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen. D und E: Auftragung des Quotienten aus gebundenen Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus dem unter A gezeigten *high speed Assay* (D) bzw. aus drei unabhängigen *high speed Cosedimentationsassays* (E). Bei keinem der durchgeführten Experimente wurde die Sättigung erreicht und die nichtlineare Regression ist somit sehr ungenau.

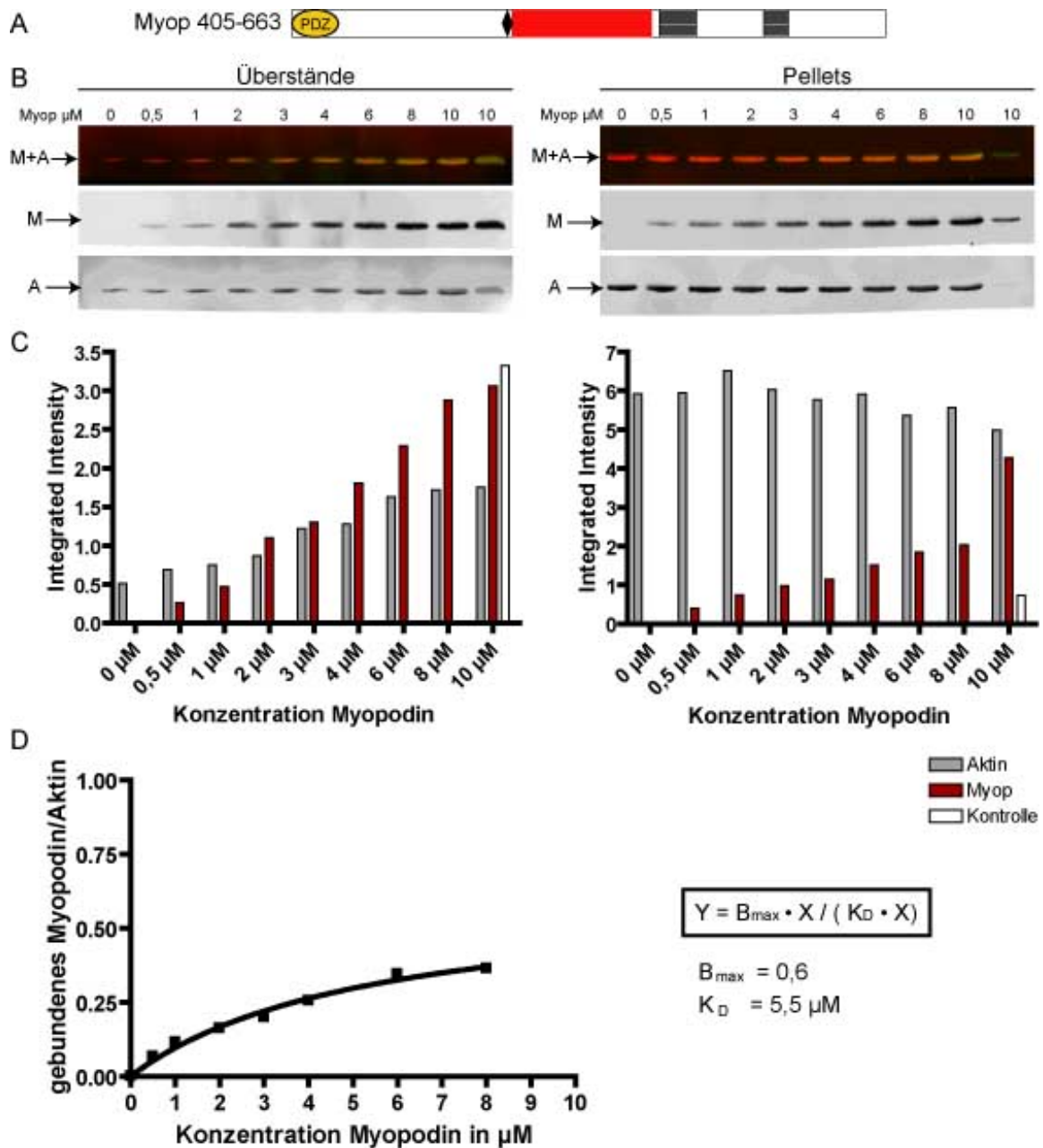


Abbildung 3.52: Aktin *high speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 405-663. A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: Western Blots der Überstand- und Pelletproben der *high speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodinfragments ist der Beschriftung der Gele zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin- (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment wurde mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen. D: Auftragung des Quotienten aus gebundenen Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus dem unter A gezeigten *high speed Assay*. Die nichtlineare Regression ergab einen  $K_D$ -Wert von  $5,462 \mu\text{M}$  und ein molares Bindungsverhältnis von  $0,6$  zu  $1$  (Myopodin zu Aktin).



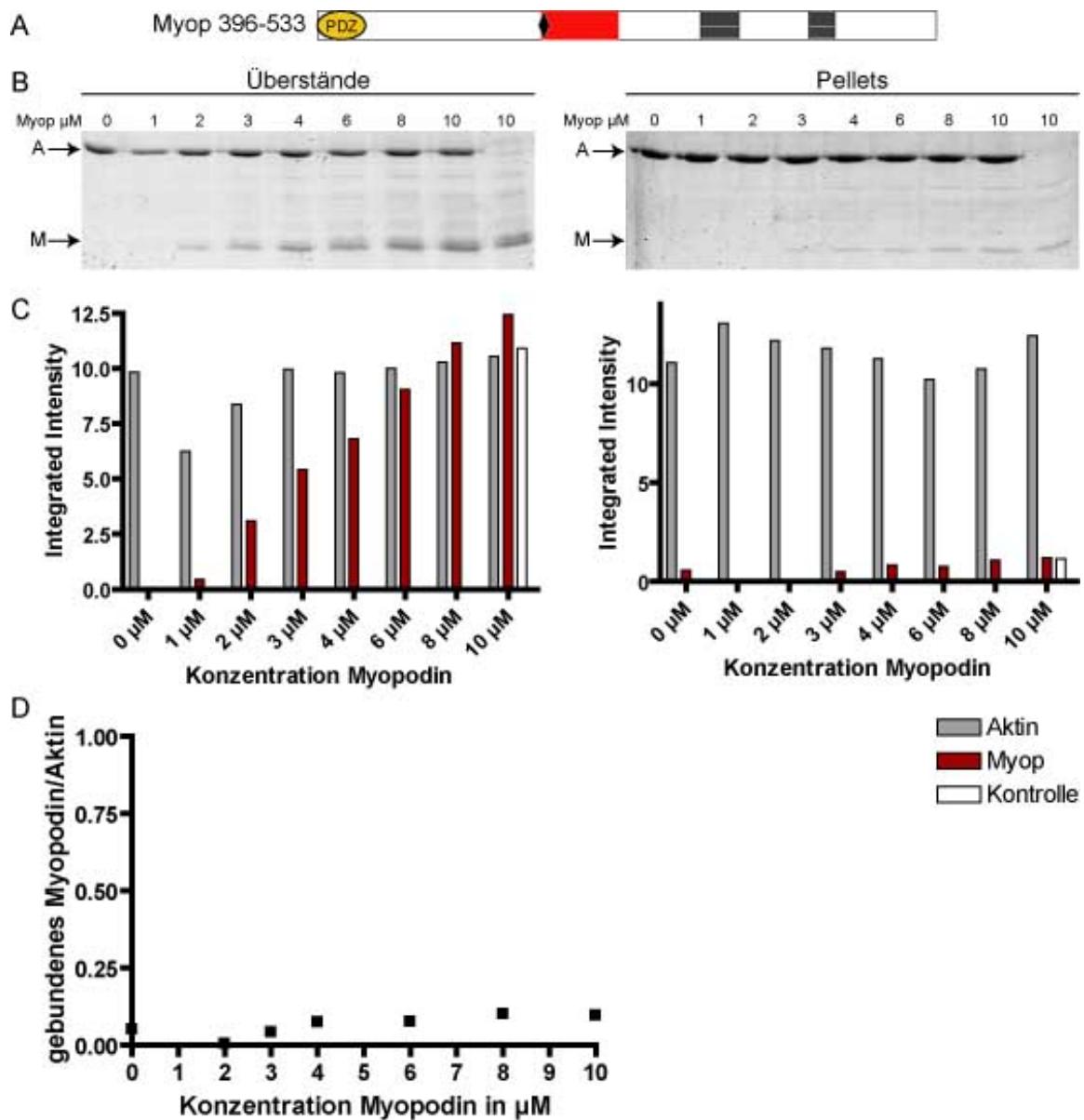


Abbildung 3.53: Aktin *high speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 396-533. A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: SDS-Gele der Überstand- und Pelletproben der *high speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodinfragments ist der Beschriftung der Gele zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin- (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment konnte nicht mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen werden. D: Auftragung des Quotienten aus gebundenen Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus dem unter A gezeigten *high speed Assay*. Die nichtlineare Regression führte zu keinem Ergebnis.

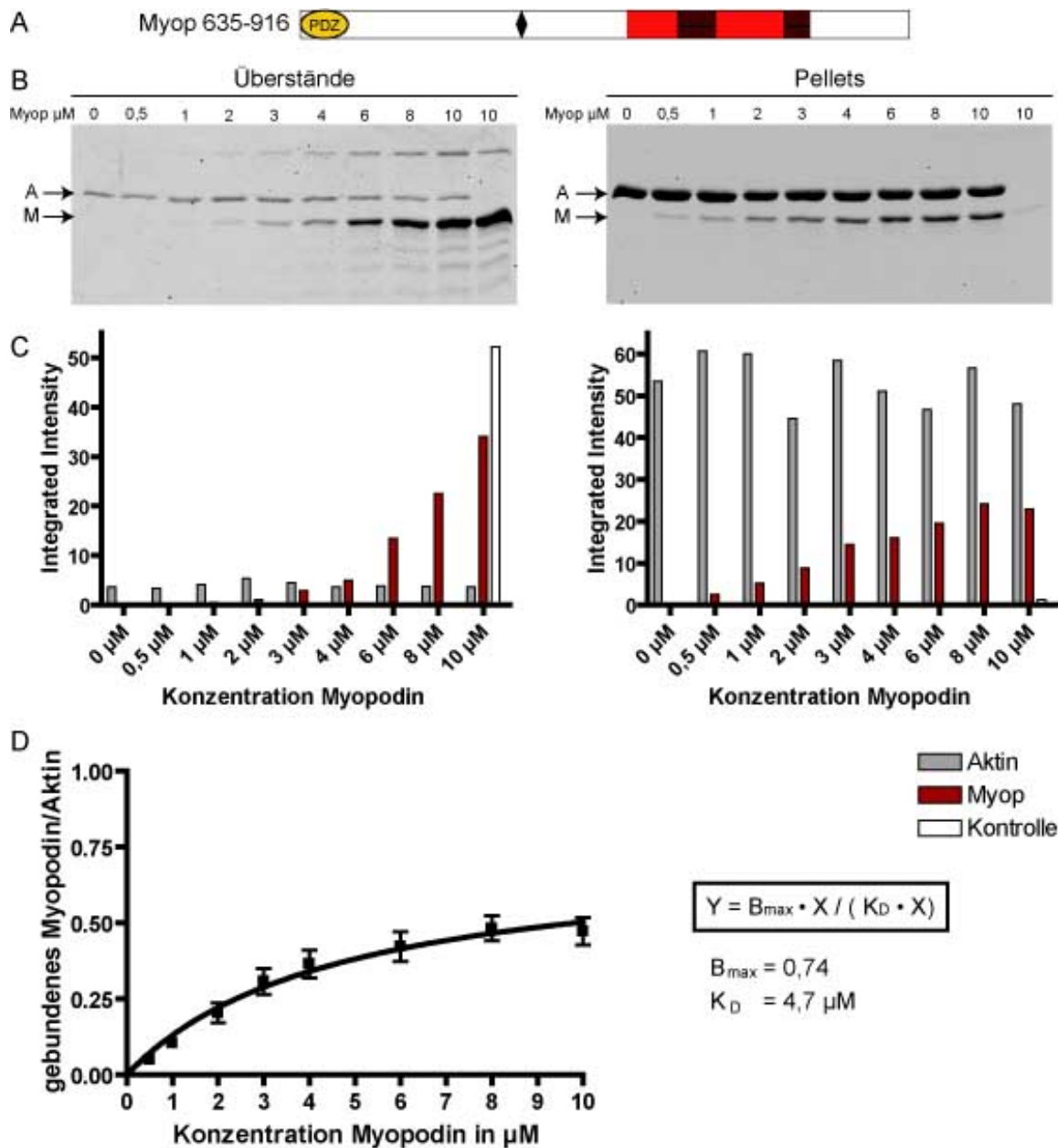


Abbildung 3.54: **Aktin *high speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 635-916.** A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: SDS-Gele der Überstand- und Pelletproben der *high speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodinfragments ist der Beschriftung der Gele zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin- (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment wurde mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen. D: Auftragung des Quotienten aus gebundenem Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus drei unabhängigen *high speed Assays*. Die nichtlineare Regression ergab einen  $K_D$ -Wert von  $4,7 \mu\text{M}$  und ein molares Bindungsverhältnis von 0,74 zu 1 (Myopodin zu Aktin).

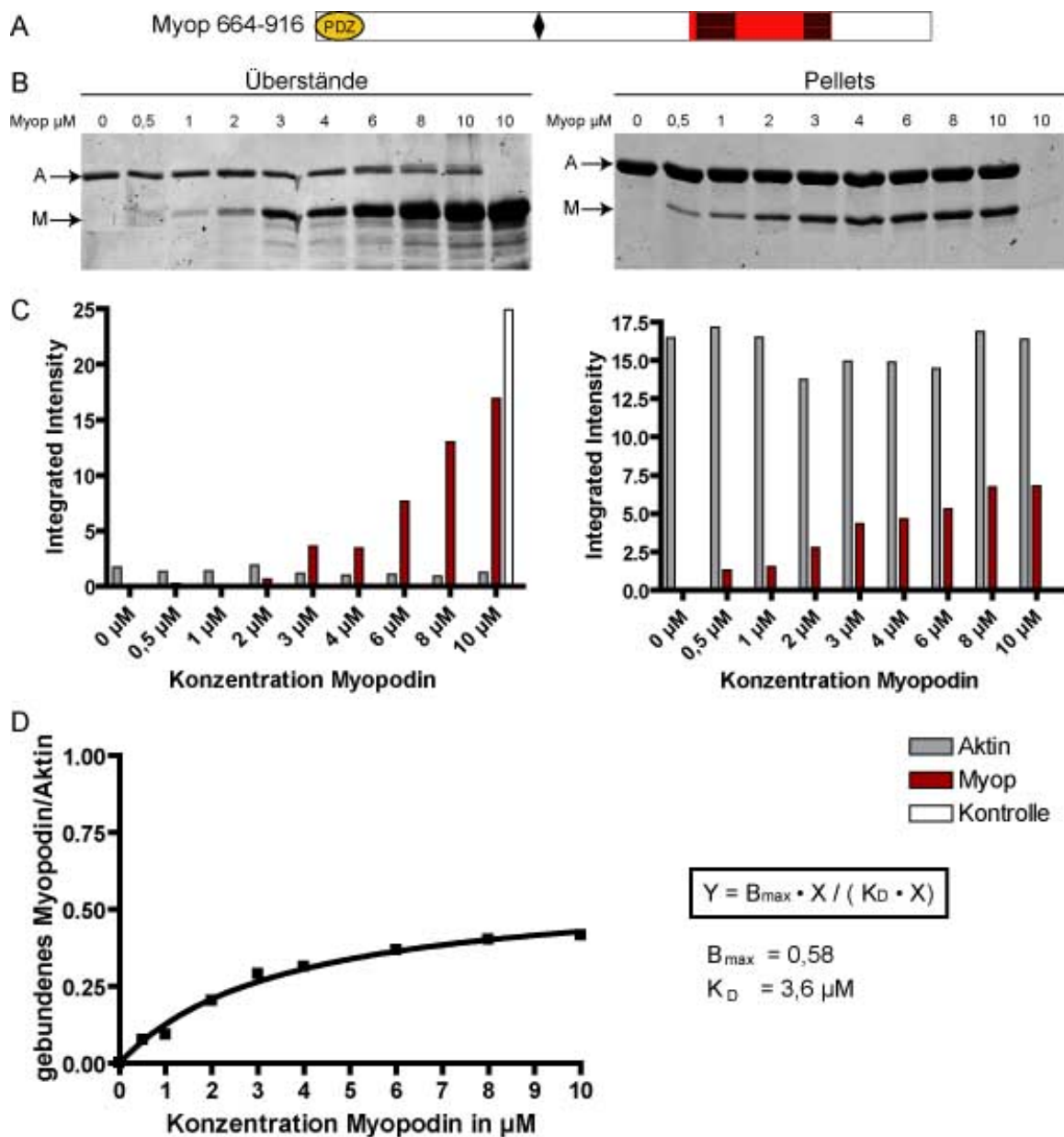


Abbildung 3.55: Aktin *high speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 664-916. A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: SDS-Gele der Überstand- und Pelletproben der *high speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodinfragments ist der Beschriftung der Gele zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin- (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment wurde mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen. D: Auftragung des Quotienten aus gebundenen Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus dem unter A gezeigten *high speed Assay*. Die nichtlineare Regression ergab einen  $K_D$ -Wert von  $3,6 \mu\text{M}$  und ein molares Bindungsverhältnis von 0,58 zu 1 (Myopodin zu Aktin).

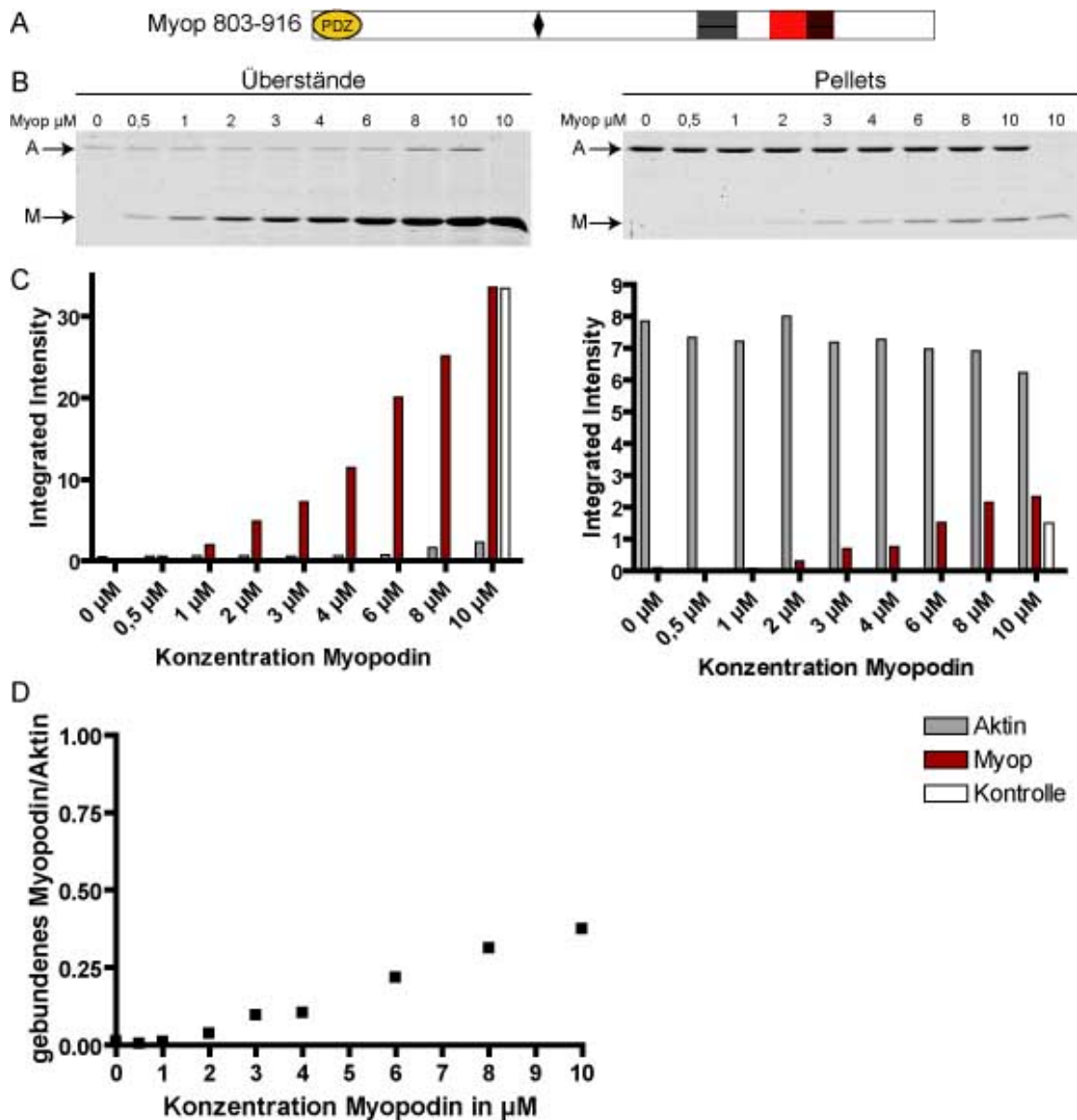


Abbildung 3.56: Aktin *high speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 803-916. A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: SDS-Gele der Überstand- und Pelletproben der *high speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodinfragments ist der Beschriftung der Gele zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin- (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment konnte nicht mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen werden. D: Auftragung des Quotienten aus gebundenen Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus dem unter A gezeigten *high speed Assay*. Die nichtlineare Regression führte zu keinem Ergebnis.

### 3.4.2 Myopodin ist ein Aktin-bündelndes Protein

#### 3.4.2.1 Nachweis der Aktinquervernetzung mit Hilfe von Aktin *low speed Cosedimentationen*

Basierend auf der Erkenntnis, dass Myopodin zwei voneinander unabhängige F-Aktinbindungsstellen besitzt, wurde getestet, ob Myopodin auch fähig ist, filamentöses Aktin miteinander zu verknüpfen. Hierzu wurden zunächst *low speed Cosedimentationsassays* durchgeführt. In *low speed Assays* wird, ähnlich wie in den eben beschriebenen *high speed Cosedimentationsassays*, das G-Aktin in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  polymerisiert und anschließend das entsprechende Myopodinfragment in steigenden Konzentrationen von 0 bis 10  $\mu\text{M}$  zugesetzt. In der folgenden Zentrifugation bei nur 10.000 g wird ausschließlich gebündeltes bzw. vernetztes F-Aktin mitsamt den daran gebundenen Proteinen pelletiert, während nicht polymerisiertes Aktin, einzelne Aktinfilamente sowie daran gebundene Proteine im Überstand verbleiben. Die Analyse dieser Proben wurde wiederum mittels SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung durchgeführt. Auch die Quantifizierung erfolgte am *Odyssey® Infrared Imaging System* der Firma Licor durch Bearbeitung mit Hilfe der Odyssey 3.0 Software.

Zur Überprüfung der Aussagekraft dieser Methode wurde ein Ansatz mit dem Aktin-bündelnden Protein  $\alpha$ -Aktinin (Yläne *et al.*, 2001) durchgeführt (Abb. 3.4.2.1). Die Analyse der SDS-Gele des *low-speed-Assays* ergab, dass  $\alpha$ -Aktinin zusammen mit Aktinbündeln im Pellet zu finden war, wobei mit steigender Konzentration des  $\alpha$ -Aktinins auch die Menge an pelletiertem Aktin zunahm. Parallel nahm die Menge an Aktin im Überstand deutlich ab. Das eingesetzte  $\alpha$ -Aktinin verknüpfte also das vorhandene F-Aktin zu Bündeln, welche bei der Zentrifugation pelletiert wurden. Die Auswertung der Menge an gebündeltem Aktin ergab, dass das eingesetzte  $\alpha$ -Aktinin etwa 70 % der Gesamtmenge des Aktins zu bündeln vermochte ( $B_{max}$ ) und dass bereits 0,2  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Aktinin ausreichten, um die halbmaximale Bündelungsaktivität zu erreichen.

Das Myopodinfragment 405-916 zeigte, wie in Abbildung 3.58, A bis C zu sehen, bei sehr niedriger Konzentration eine Anreicherung im Pellet, wobei parallel das Aktin im Pellet zu- und im Überstand abnahm. Die nichtlineare Regression zeigte, dass durch das

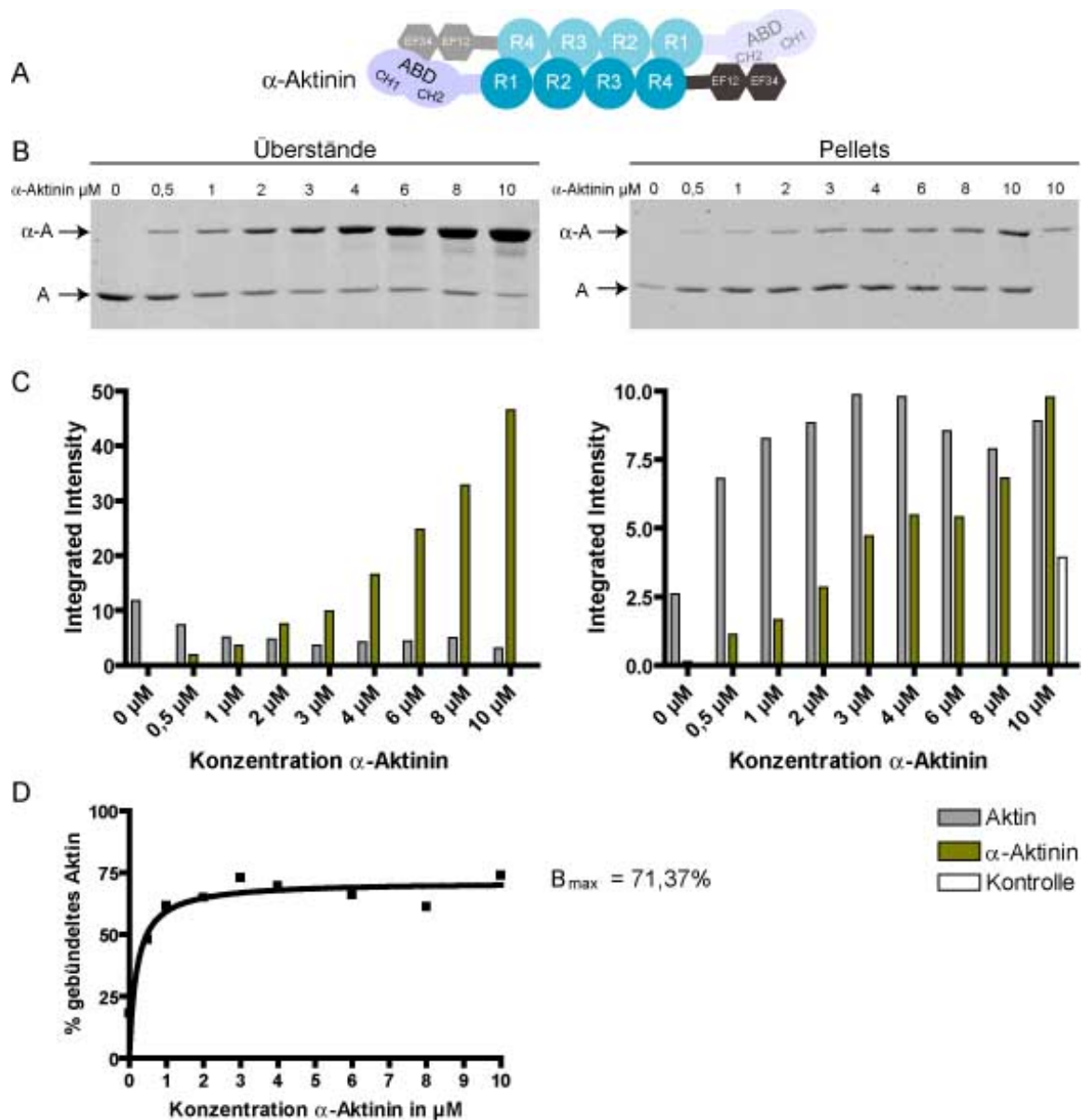


Abbildung 3.57: **Aktin *low speed Cosedimentation* mit  $\alpha$ -Aktinin.** A. Schematische Darstellung des  $\alpha$ -Aktinin-Dimers. B: SDS-Gele der Überstand- und Pelletproben der *low speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des  $\alpha$ -Aktinins ( $\alpha$ -A) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten  $\alpha$ -Aktinins ist der Beschriftung der Gele zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der  $\alpha$ -Aktinin- (grüne Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte  $\alpha$ -Aktininkonzentration. Das  $\alpha$ -Aktinin wurde mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen, während das Aktin im Überstand ab- und im Pellet zunimmt D: Auftragung des Quotienten aus gebundenen  $\alpha$ -Aktinin und Aktin gegen die eingesetzte  $\alpha$ -Aktininkonzentration aus dem unter A gezeigten *low speed Assay*. Die nichtlineare Regression ergab, dass 71,37% des eingesetzten Aktins durch  $\alpha$ -Aktinin gebündelt werden.

Myopodin etwa 80 % der Gesamtmenge des Aktins gebündelt wurde und dass bereits 0,17  $\mu\text{M}$  Myopodin 405-916 ausreichen, um eine halbmaximale Bündelungsaktivität zu erreichen.

Das Aktin-bindende Myopodinkonstrukt 405-663 hingegen, welches wieder über einen Immunoblot sichtbar gemacht wurde, konnte nicht in steigenden Mengen im Pellet detektiert werden. Auch eine Zunahme des Aktins im Pellet ließ sich nicht nachweisen. Die Auftragung des prozentualen Anteils an gebündeltem Aktin zeigte, dass diese auch bei steigenden Myopodinkonzentrationen konstant blieb (3.59).

Die C-terminal gelegenen Aktin-bindenden Myopodinflragmente 635-916 und 664-916 zeigten eine Anreicherung im Pellet. Auch das Aktin wurde mit steigender Konzentration des Myopodins im Pellet, bei gleichzeitiger Abnahme im Überstand, angereichert, was schlussfolgern lässt, dass dieser Bereich des Myopodins Aktin zu Bündeln oder zu einem Netzwerk verknüpfen kann. Bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  lässt sich eine deutliche Zunahme von Aktin im Pellet beobachten. Die nichtlineare Regression zeigte, dass durch beide Myopodinflragmente etwa 70 % bis 75 % der Gesamtmenge des Aktins gebündelt wurde und dass bereits 0,05  $\mu\text{M}$  Myopodin 635-916, bzw. 0,04  $\mu\text{M}$  Myopodin 664-916 ausreichen, um die halbmaximale Bündelungsaktivität zu erreichen (Abb. 3.60 und 3.61).



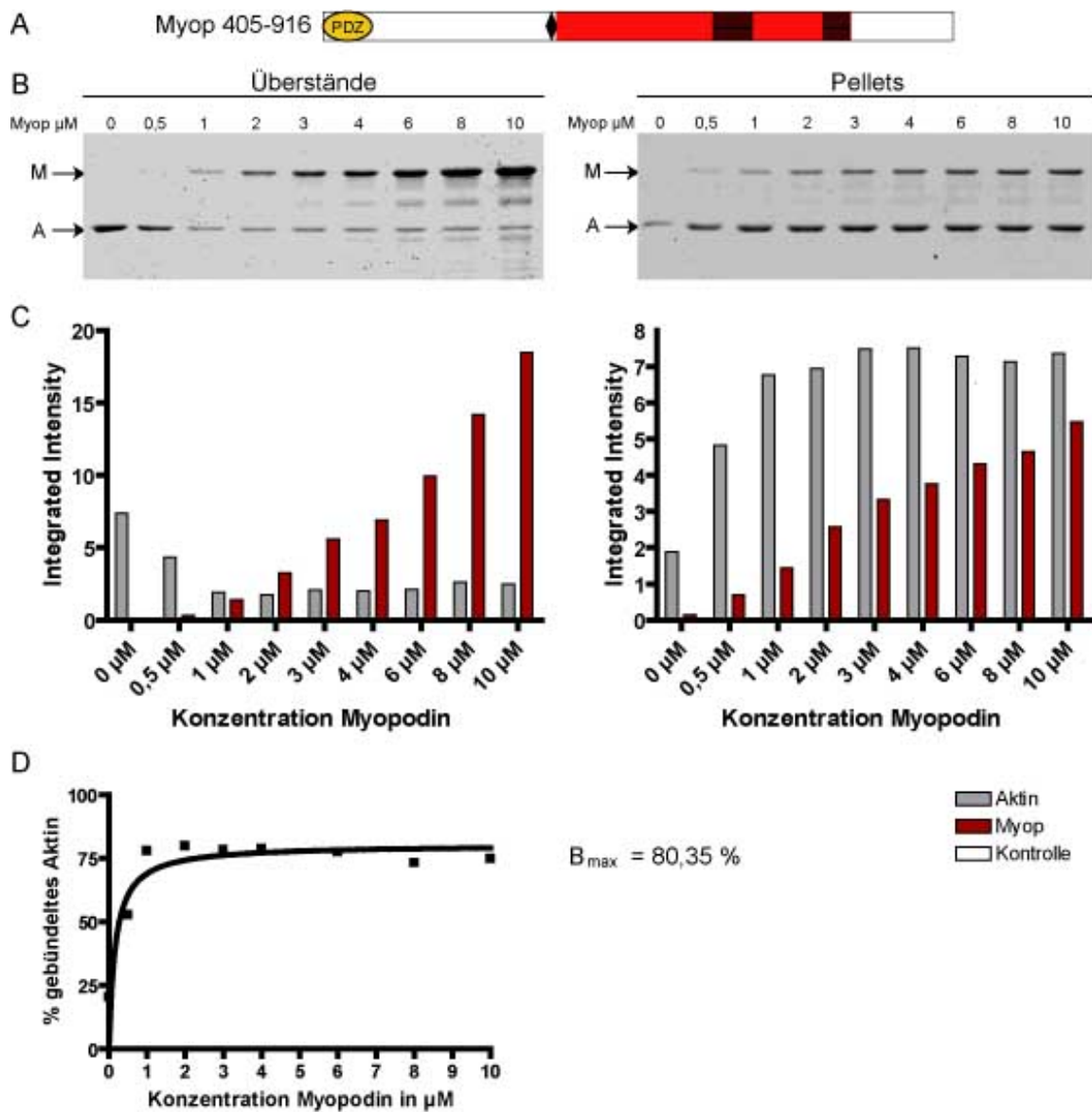


Abbildung 3.58: **Aktin *low speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 405-916.** A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: SDS-Gele der Überstand- und Pelletproben der *low speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodins ist der Beschriftung zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment wurde mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen, während das Aktin im Überstand ab- und im Pellet zunimmt. D: Auftragung des Quotienten aus gebundenen Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus dem unter A gezeigten *low speed Assay*. Die nichtlineare Regression ergab, dass 80,35% des eingesetzten Aktins durch Myopodinfragment 405-916 gebündelt werden.

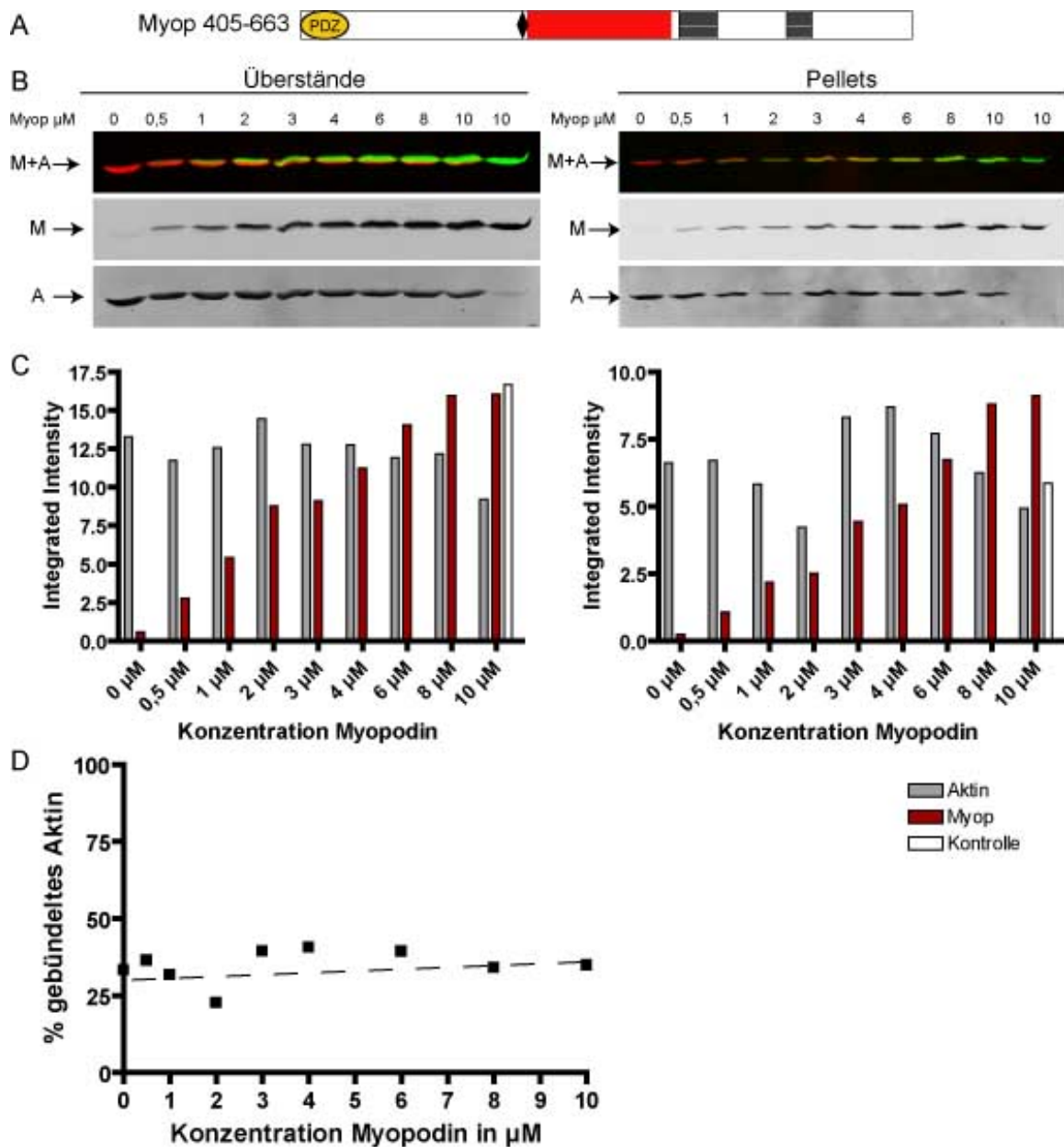


Abbildung 3.59: Aktin *low speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 405-663. A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: Western Blots der Überstand- und Pelletproben der *low speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodins ist der Beschriftung zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin- (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment konnte nicht mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen werden, auch die Aktinkonzentration blieb im Überstand konstant. D: Auftragung des Quotienten aus gebundenen Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus dem unter A gezeigten *low speed Assay* zeigt, dass dieses Myopodinfragment keine Aktinbündelungsaktivität aufweist.

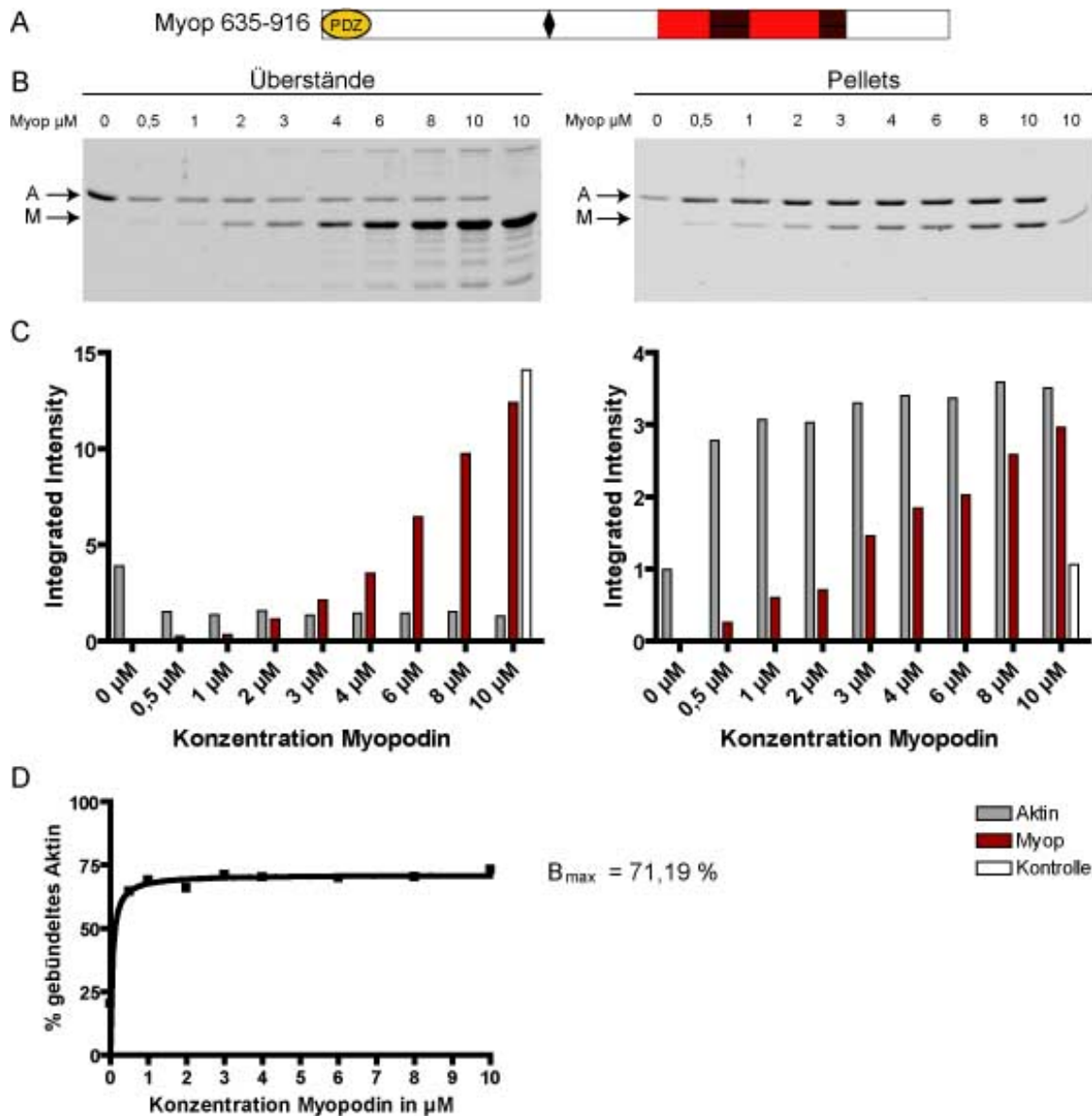


Abbildung 3.60: Aktin *low speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 635-916. A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: SDS-Gele der Überstand- und Pelletproben der *low speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodins ist der Beschriftung zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin- (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment wurde mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen, während das Aktin im Überstand ab- und im Pellet zunimmt. D: Auftragung des Quotienten aus gebundenen Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus dem unter A gezeigten *low speed Assay*. Die nichtlineare Regression ergab, dass 71,19% des eingesetzten Aktins durch Myopodinfragment 635-916 gebündelt werden.

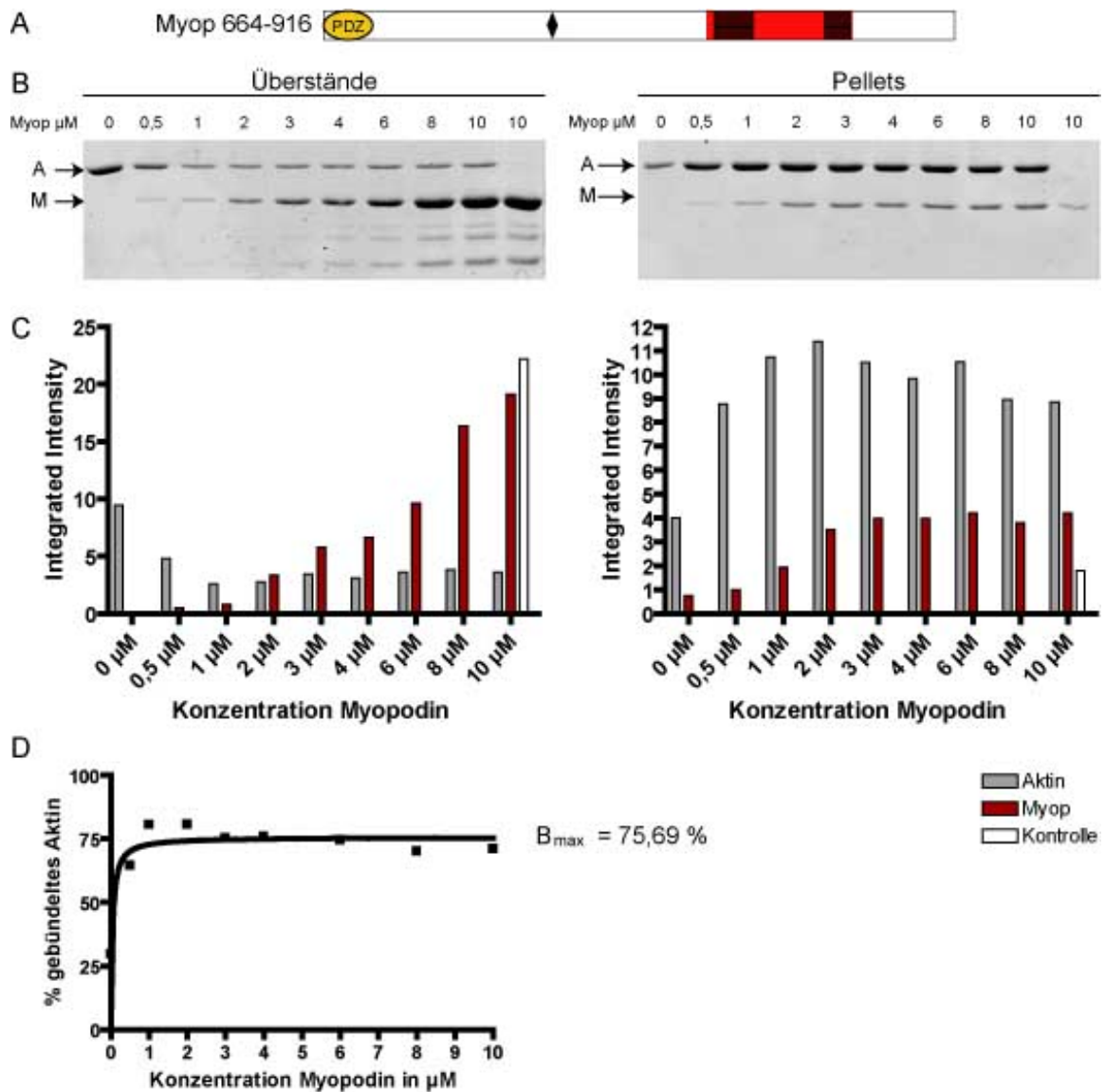


Abbildung 3.61: Aktin *low speed Cosedimentation* mit Myopodinfragment 664-916. A: Schematische Darstellung des Myopodinmoleküls, wobei die getestete Region des Myopodins rot hervorgehoben wurde. B: SDS-Gele der Überstand- und Pelletproben der *low speed Cosedimentation*, wobei die Laufhöhe des Myopodinfragments (M) bzw. des Aktins (A) mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Die Konzentration des eingesetzten Myopodins ist der Beschriftung zu entnehmen. C: Auftragung der Intensitäten der Myopodin- (rote Balken) und Aktinbanden (graue Balken) gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration. Das Myopodinfragment wurde mit steigender Konzentration zunehmend im Pellet nachgewiesen, während das Aktin im Überstand ab- und im Pellet zunimmt. D: Auftragung des Quotienten aus gebundenen Myopodin und Aktin gegen die eingesetzte Myopodinkonzentration aus dem unter A gezeigten *low speed Assay*. Die nichtlineare Regression ergab, dass 75,69% des eingesetzten Aktins durch Myopodinfragment 664-916 gebündelt werden.

### 3.4.2.2 Nachweis der Aktinbündelung mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1.2 beschrieben, kann F-Aktin auch in Form von Bündeln oder Netzwerken vorliegen. Um die Art der Verknüpfung der Filamente durch Myopodin bestimmen zu können, wurden elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Hierzu wurde Aktin polymerisiert und anschließend das zu untersuchende Myopodinfragment hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde auf Nickel-*grids* immobilisiert, mit Uranylacetat negativ kontrastiert und unter einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) analysiert. Als Positivkontrolle diente auch hier ein Ansatz mit  $\alpha$ -Aktinin. Dieser Ansatz sollte sowohl die Funktionalität dieser Methode bestätigen, als auch die Qualität des eingesetzten Aktins überprüfen. Wie in Abbildung 3.62 gezeigt, wurde das F-Aktin, wie zu erwarten, durch  $\alpha$ -Aktinin zu dicken Bündeln von etwa 160 nm verknüpft (Abb. 3.62, C VI). Ebenso bewirkte das Myopodinfragment 405-916, welches in den *low speed Cosedimentationsassays* eine starke Neigung zur Verknüpfung des Aktinfilamente zeigte, eine starke Aktinbündelung (Abb. 3.62, C I). Die Bündel besaßen einen Durchmesser von etwa 52 nm. Auch die Myopodinfragmente 635-916 und 664-916 konnten F-Aktin zu dicken Bündeln von durchschnittlich ca. 130 nm Dicke verknüpfen (Abb. 3.62, C III und IV). Die anderen getesteten Fragmente (Myop 405-663 und Myop 809-916) zeigten dagegen keine Aktinbündelungsaktivität (Abb. 3.62, C II und V). Auffallend war, dass die Aktinbündel, geformt durch das Myopodinfragment 664-916, eine schleifenartige Struktur aufwiesen (Abb. 3.62, C IV).

Eine Zusammenfassung aller Aktinbindungs- und -bündelungsversuche liefert Abbildung 3.63. Wie hier zu sehen ist, binden alle Myopodinisformen F-Aktin, vermittelt durch zwei voneinander unabhängige Aktinbindungsregionen. Die N-terminal gelegene Aktinbindungsdomäne bindet F-Aktin schwächer als die C-terminale Region, die zudem auch in der Lage ist F-Aktin zu Bündeln zu verknüpfen.



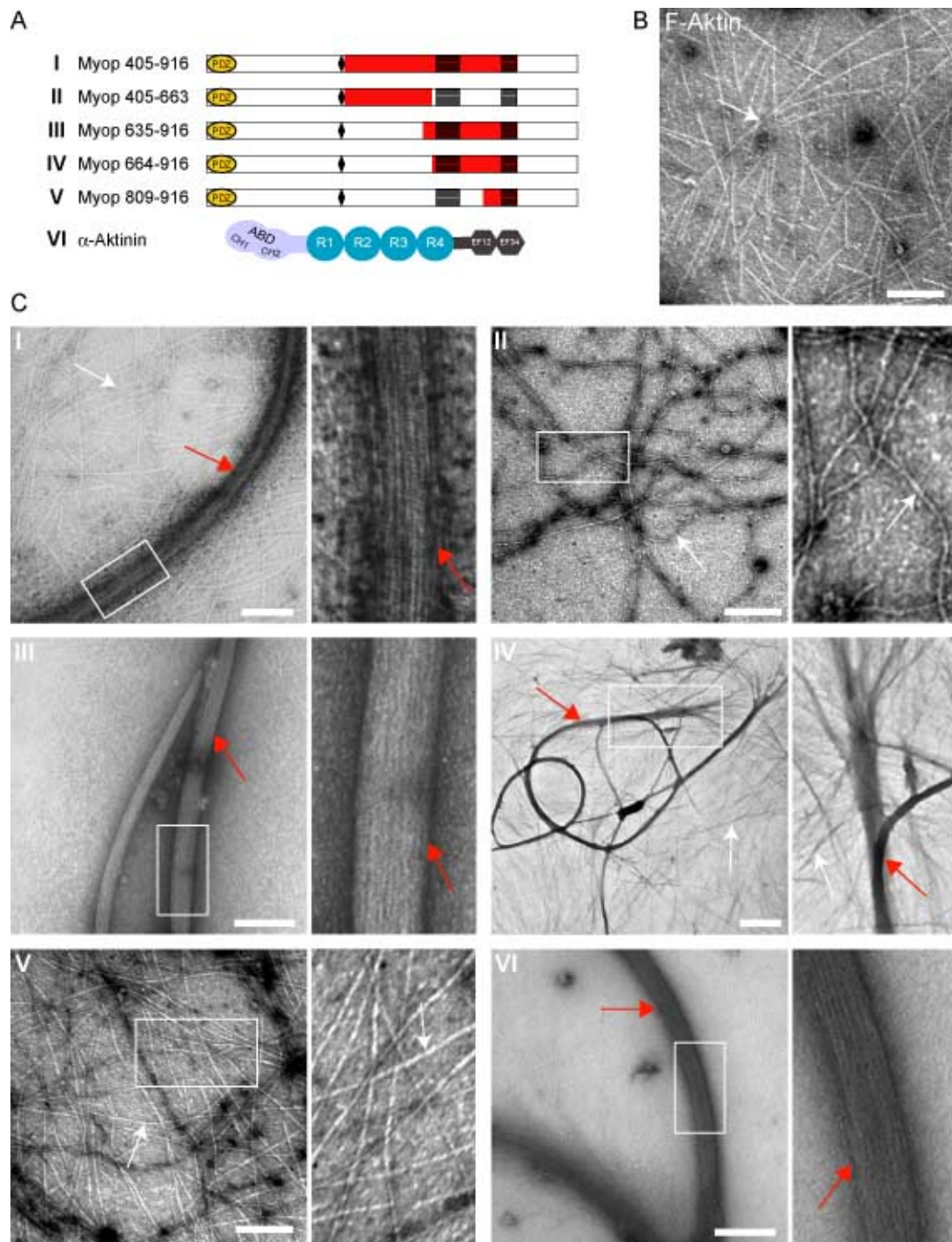


Abbildung 3.62: **TEM-Aufnahmen zur Analyse der Aktinbündelungsaktivität von Myopodin.** A: Schematische Darstellung der verwendeten Myopodinfragmente und  $\alpha$ -Aktinin. Die römischen Zahlen entsprechen denen in C. B: TEM-Aufnahme des verwendeten F-Aktins zeigt Aktinfilamente (weiße Pfeile), aber keine Bündel. Maßstabsbalken 500 nm. C: TEM-Aufnahmen des Aktins nach Inkubation mit den entsprechenden Myopodinfragmenten oder  $\alpha$ -Aktinin als Positivkontrolle. Myopodinfragment 405-916 (I), 635-916 (III) und 664-916 (IV) zeigen ebenso wie  $\alpha$ -Aktinin (VI) starke Bündelungsaktivität (rote Pfeile), Myopodinfragment 405-663 (II) und 809-916 (V) hingegen nicht. Maßstabsbalken I, III, VI: 200 nm, II und V: 500 nm

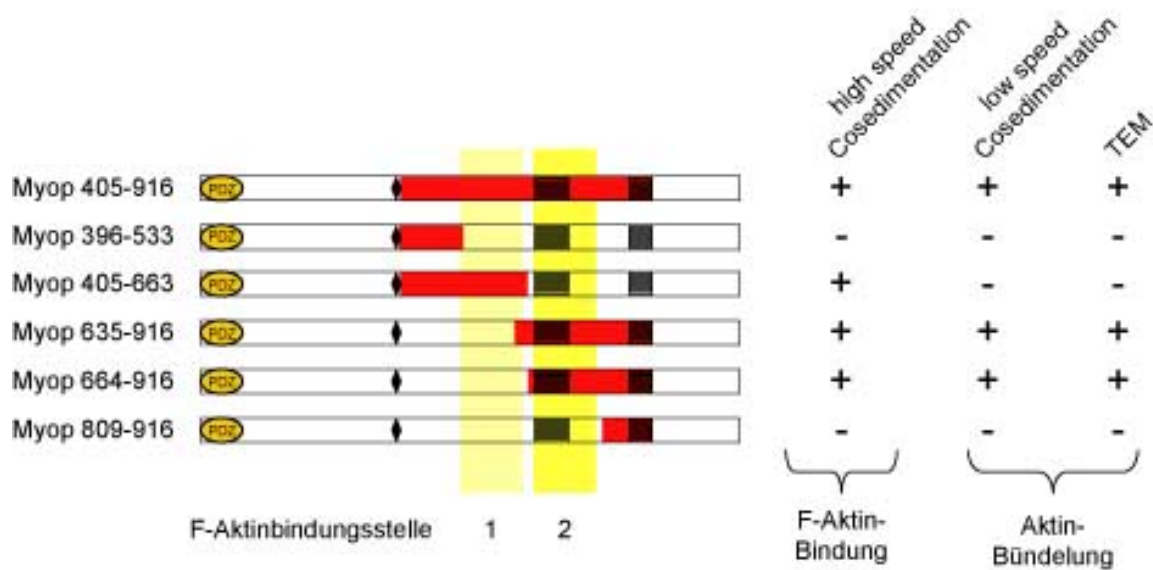


Abbildung 3.63: **Zusammenfassung der Aktinbindungs- und -bündelungseigenschaften von Myopodin.** Rechts sind die eingesetzten Myopodinfragmente dargestellt, links die Ergebnisse der Aktin *high speed Cosedimentationsassays*, Aktin *low speed Cosedimentationsassays* sowie der TEM-Analyse. Myopodin besitzt zwei F-Aktinbindungsstellen, hervorgehoben durch gelbe Balken, wobei die erste eine geringere Affinität als die zweite zu haben scheint.

### 3.4.3 Myopodin bildet *in vitro* Dimere

Die Erkenntnis, dass das Myopodinfragment 664-916 in der Lage ist Aktin zu bündeln, führte zu der Frage wie dies möglich ist, obwohl Aktin *high speed Cosedimentationsassays* darauf hindeuteten, dass in diesem Fragment nur eine Aktinbindungsstelle vorhanden ist (siehe Abschnitt 3.4.1. Andere Aktin-bündelnde Proteine, wie z. B.  $\alpha$ -Aktinin, welches ebenfalls nur eine Aktinbindungsdomäne besitzt, erlangen diese Fähigkeit durch Dimerisierung. Deshalb wurde getestet, ob dieses Fragment dimerisieren bzw. oligomerisieren kann. Zunächst wurde dies in einem gezielten Hefe-Zwei-Hybrid Ansatz getestet. Hierzu wurden die Myopodinfragmente 664-916 sowie 664-809 in den Vektor pActPd und in den Vektor pLexPd kloniert, diese in Hefen cotransformiert und auf Interaktion „mit sich selbst“ getestet (Abb. 3.64, A). Die Myopodinkonstrukte zeigten weder im pActPd noch im pLexPd eine Autoaktivierung der Reportergene (Abb. 3.64, B), auch in den cotransformierten Hefen mit 664-809 pLexPd und 664-809 pActPd konnte keine Aktivierung der Reportergene beobachtet werden (Abb. 3.64, C). Die Hefen cotransformiert mit den Konstrukten 664-916 pLexPd und 664-916 pActPd hingegen



zeigten die Aktivierung des LacZ-Reportergens sowie der  $\beta$ -Galaktosidase (Abb. 3.64, B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Myopodinfragment 664-916 mit sich selbst interagieren, also dimerisieren oder oligomerisieren kann.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden *Crosslink*-Versuche mit verschiedenen chemischen Quervernetzern durchgeführt. Zum einen wurde die chemische Quervernetzung mit EGS (Ethylenglykolbis(succinimidylsuccinat)), einem homobifunktionellen NHS-Ester, der eine Länge von etwa 1,6 nm besitzt, durchgeführt. Das Myopodinfragment 664-916 konnte durch diesen Quervernetzer zu Dimeren verbunden werden (Abb. 3.64, D). Allerdings konnten auch Tetramere, bzw. Oligomere nachgewiesen werden. Zum anderen zeigte der chemische *Crosslink* mit dem „zero length“ Quervernetzer EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid-hydrochlorid) ebenfalls die Entstehung von Dimeren, wenn auch schwächer als mit EGS. Dies könnte durch die Länge der eingesetzten Quervernetzer zu erklären sein. Die Kontrollansätze ohne Zugabe von Quervernetzern zeigten keinerlei Dimerisierung oder Oligomerisierung.

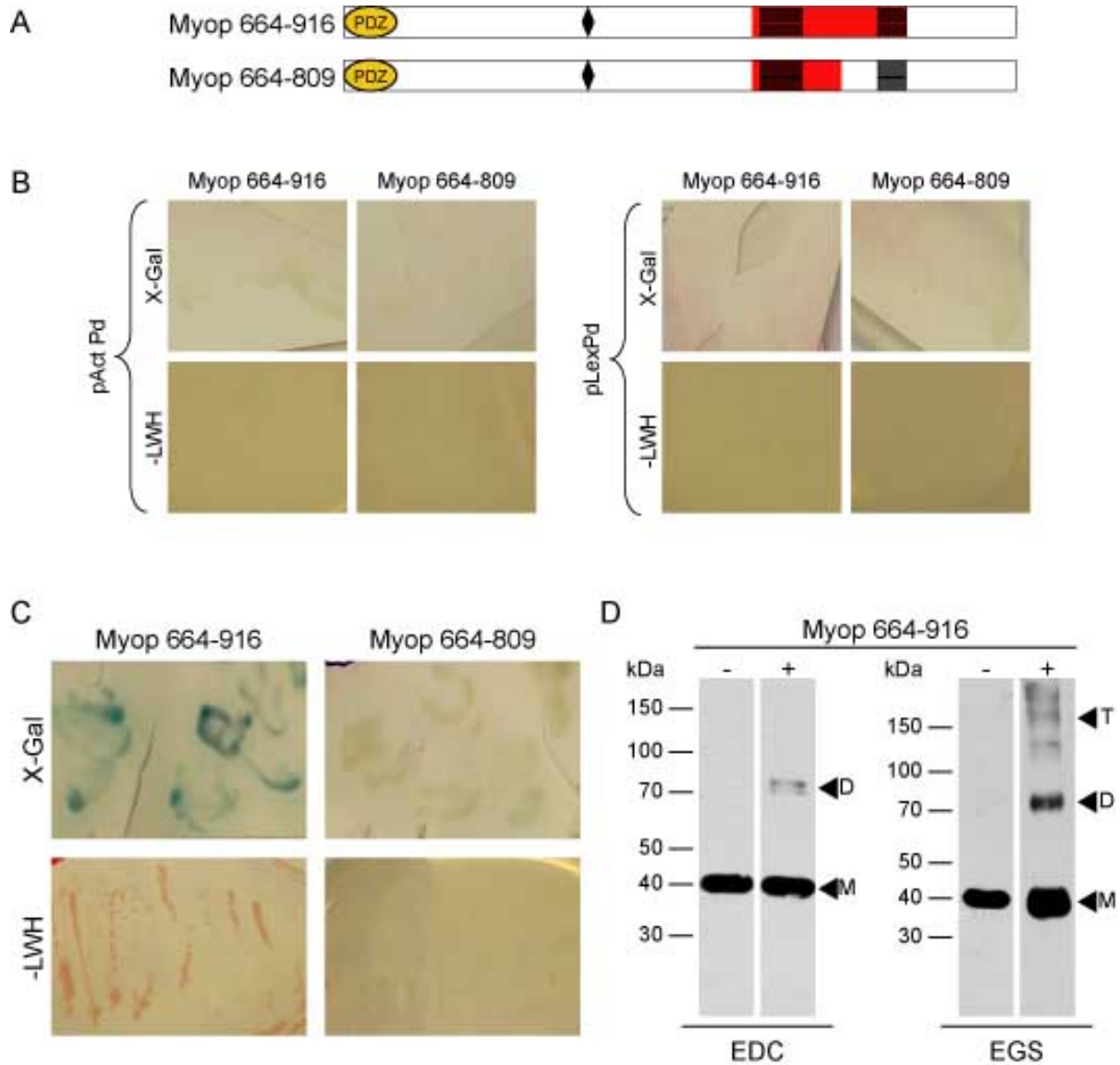


Abbildung 3.64: **Myopodin bildet *in vitro* Dimere.** A: Schematische Darstellung der in gezielten Hefe-Zwei-Hybrid- und Crosslink-Experimenten eingesetzte Myopodinfragmente. B: Untersuchung auf Autoaktivierung der im gezielten Hefe-Zwei-Hybrid System eingesetzten Myopodinkonstrukte. Weder Myop 664-916 noch Myop 664-809 zeigen Aktivierung der Reportergene. C: zeigt die Aktivierung der Reportergene bei Cotransformation von Myop 664-916 pLexPd und 664-916 pActPd, aber nicht bei Myop 664-809 pLexPd und 664-809 pActPd. D: Immunoblots der Crosslink-Versuche mit Myop 664-916 mit EDC (rechts) und EGS (links). (+) zeigt die Zugabe des Crosslinkers an, (-) die Negativkontrolle ohne Crosslinker. Die Pfeilköpfe deuten auf Myopodin-Monomere (M), -Dimere (D) und -Tetramere (T). Mit beiden Crosslinkern konnte eine Dimerisierung gezeigt werden.

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Die Podin-Proteinfamilie und ihre Isoformen

Ziel dieser Arbeit war die detaillierte zellbiologische und biochemische Charakterisierung der Podin-Proteinfamilie, die aus Synaptopodin, Myopodin und Tritopodin besteht. Alle drei Familienmitglieder unterliegen alternativen Spleißvorgängen, welche in verschiedene Isoformen der Proteine resultieren. Die Expression verschiedener Isoformen gibt die Möglichkeit die Eigenschaften eines Proteins zu beeinflussen, indem beispielsweise Bindungsstellen bestimmter Interaktionspartner durch alternatives Spleißen gezielt entfernt werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welche Isoformen der Podine wo existieren, wann diese exprimiert werden und ob diese unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen.

#### 4.1.1 Myopodinisformen

Für humanes Myopodin wurden bisher drei Isoformen beschrieben, welche durch alternative Spleißvorgänge im 3'-Bereich entstehen (de Ganck *et al.*, 2008). Diese drei Isoformen besitzen eine N-terminale PDZ-Domäne. Allerdings stimmen die berechneten molekularen Massen dieser Myopodinisformen mit 120 bis 137 kDa nicht mit in Western Blots detektiertem Myopodin überein. In Western Blots von Skelettmuskelzellen weist Myopodin stets eine apparente Masse von etwa 90 kDa auf (Weins *et al.*, 2001; Schroeter

*et al.*, 2008b; Linnemann, 2005; Vakeel, 2006; Albinus, 2008). Auch Northern Blot-Analysen humaner Prostata deuten auf die Existenz kürzerer mRNA-Transkripte hin (Lin *et al.*, 2001). EST-Datenbankanalysen gaben zudem Hinweise auf einen alternativen Transkriptionsstart im Exon 3 des *SYNPO2*-Gens, der die Generierung weiterer Isoformen ermöglicht, denen der N-terminale Sequenzabschnitt von 395 Aminosäuren inklusive der dortigen PDZ-Domäne fehlt. PDZ-Domänen sind als Interaktionsplattformen für Protein-Protein-Wechselwirkungen (Fanning und Anderson, 1996; Nourry *et al.*, 2003) bekannt und binden überwiegend an den C-Termini ihrer Interaktionspartner (Saras und Heldin, 1996). Ein alternativer Transkriptionsstart würde also die Möglichkeit bieten, die Bindungseigenschaften des Myopodins bereits auf mRNA-Ebene zu regulieren. Durch diesen zusätzlichen Transkriptionsstart ergeben sich in Kombination mit den bekannten alternativen Spleißvorgängen des 3'- Endes drei weitere putative Myopodinisformen. Die Expression dieser insgesamt sechs vorhergesagten Myopodinisformen, dargestellt in Abbildung 3.1, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Eine zusätzliche Zusammenfassung des heutigen Kenntnisstandes der Expression verschiedener Myopodinisformen in unterschiedlichen Geweben bietet Tabelle 4.1.

Zunächst konnte in der vorliegenden Arbeit durch eine 5'- *RACE* und durch diverse RT-PCR-Experimente die Existenz des alternativen Transkriptionsstarts im Exon 3 auf mRNA-Ebene in humanen Skelettmuskelzellen bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.1.1.2). Da weitere RT-PCR-Experimente zeigten, dass in humanen Skelettmuskelzellen vor allem das ungespleißte Exon 4 exprimiert wird (Abb. 3.2, D, E), ist die Expression der Myopodinvariante e auf mRNA-Ebene sehr wahrscheinlich. Diese Annahme konnte durch Untersuchungen der Expression des Myopodins aus Mensch-, Maus- und Rattengeweben auf Proteinebene bestätigt werden. Zahlreiche Immunfärbungen von Western Blots mit Antikörpern gegen zwei verschiedene, in allen bekannten Isoformen vorhandene Epitope des Myopodins, zeigten die Expression einer kurzen Isoform mit einer apparenten Masse von etwa 90 kDa (u. a. Abb. 3.5, A, B). Die Analysen mittels isoformspezifischer Antikörper zeigten weiterhin, dass diese Isoform weder die N-terminale PDZ-Domäne noch den vom Exon 6 kodierten Bereich umfasst. Somit konnte hier bewiesen werden, dass im Skelettmuskel hauptsächlich die Myopodinisform e exprimiert wird (u. a. Abb.

3.5, D, E), der die N-terminale PDZ-Domäne fehlt. In adultem Skelettmuskelgewebe konnte aber zusätzlich die wenn auch eher schwache Expression einer langen Myopodinvariante mit PDZ-Domäne nachgewiesen werden u. a. Abb. 3.5, A, C). Der alternative Transkriptionsstart bietet somit die Möglichkeit der Expression zweier Isoformen, die sich vermutlich auch in ihren Bindungseigenschaften unterscheiden. Zwar konnte bislang kein Interaktionspartner für diese PDZ-Domäne nachgewiesen werden, es gibt allerdings erste Hinweise, dass die PDZ-Domäne des Myopodins mit Synemin, einem Intermediärfilamentprotein, interagieren kann (Vakeel, 2006). Western Blot-Overlays und gezielte Hefeexperimente zeigten, dass die PDZ-Domäne des Myopodins, aber nicht die des Tritopodins, mit dem C-Terminus des Synemins wechselwirken kann (Vakeel, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch versucht, diese Interaktion mit Coimmunpräzipitationen und Pulldown-Assays zu bestätigen, jedoch war dies bislang nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Es ist möglich, dass die hier verwendeten pET-Vektoren zur rekombinanten Expression der Proteine für diese Anwendung nicht geeignet sind, da sie auch C-terminal einige Aminosäuren (His-Tag und Immunotags wie z. B. EEF-Tag) tragen, die die Interaktion stören könnten. Die Wechselwirkung von Myopodin und Synemin würde entsprechend der späten Expression der langen Myopodinisiform vor allem in den fortgeschrittenen und adulten Entwicklungsstadien der Myofibrillogenese stattfinden, in denen die Muskelzellen terminal und lateral mit den benachbarten Zellen u. a. über Intermediärfilamente verbunden sind.

In glattmuskelreichen Geweben wie Prostata, Darm, Uterus und Blase konnte die lange Myopodinisiform a nachgewiesen werden, wobei auch hier zusätzlich die Expression kurzer Isoformen zu beobachten war (Abb. 3.6). Diese kurze Isoform wurde in den Geweben Uterus, Darm und Blase als Myopodinisiform e identifiziert. Die kurze Variante der Prostata zeigte aber verglichen mit der Isoform e des Skelettmuskels interessanterweise ein etwas anderes Laufverhalten in der SDS-Gelelektrophorese mit einer etwas größeren apparenten Masse (Abb. 3.5, A, B). Zusammen mit RT-PCR-Versuchen, die in der Prostata die Expression eines Transkriptes, das Exon 5 einschließt, zeigten (Linnemann, 2005), würde dies für die Expression der Myopodinisiform f im Prostatagewebe sprechen. Eine endgültige Bestätigung der Expression dieser Isoform auf Proteinebene war aufgrund

des Fehlens eines spezifischen Antikörpers gegen den vom Exon 5 kodierten Bereich bislang allerdings nicht möglich.

Im Herzen konnte die Expression einer langen Isoform beobachtet werden, die in Western Blots eine etwas geringere apparente Masse besitzt, als die der glattmuskelreichen Gewebe. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die Western Blots eine Doppelbande zeigen, die aufgrund der zu geringen Laufstrecke nicht aufgetrennt wurde (Abb. 3.5). Auf mRNA-Ebene konnten die Exons 1 bis 3, das ungespleißte Exon 4 sowie in sehr geringen Mengen auch das Exon 6 nachgewiesen werden. Auf Proteinebene konnte ebenfalls die N-terminale PDZ Domäne und der von Exon 6 kodierte Bereich detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass im Herzen vor allem die Myopodinisiform b exprimiert wird, aber auch Myopodinisiform a. Der beobachtete geringe Massenunterschied kann aber auch aus posttranslationalen Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen, die bereits von Faul *et al.* (2008) für Myopodin durch die Kinasen PKA und CAMKII nachgewiesen wurden, resultieren.

Die Detektion von Banden mit apparenten molekularen Massen von 60 bzw. 75 kDa in den neuronalen Geweben von Großhirn und Kleinhirn der Maus und Ratte, sowie in den Organen von Darm und Uterus der Ratte kann anhand des heutigen Kenntnisstandes nicht erklärt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Banden durch bislang unbekannte Spleißvarianten des Myopodins entstehen oder dass es sich um proteolytische Abbaufragmente handelt. Allerdings ist auch die Kreuzreaktivität der Myopodinantikörper HH9 und M2 mit einem Protein dieser Größen nicht vollständig auszuschließen. Die Detektion einer Bande von 45 kDa in der Zunge der Ratte durch die Antikörper HH9, M2 und  $\alpha$ -PDZ lässt vermuten, dass dies eine bislang unbekannte Isoform darstellt. Allerdings besitzt der Bereich des Proteins, der alle drei Epitope abdeckt, bereits eine molekulare Masse von etwa 75 kDa.

Die scheinbare molekulare Masse der kleinen Skelettmuskelisoform wurde hier anhand des Laufverhaltens in der SDS-Gelelektrophorese mit knapp 90 kDa bestimmt, was in etwa zu der berechneten molekularen Masse der Isoform e von 75 kDa passt. Wurde diese Isoform allerdings ektopisch in HEK293- oder A7r5-Zellen exprimiert, zeigt sie in der SDS-

Gelelektrophorese eine scheinbare molekulare Masse von etwa 120 kDa. Diese Diskrepanz wurde ebenso von de Ganck *et al.* (2008) beobachtet. Die Verringerung der molekularen Masse in Muskelzellen könnte z. B. auf gezielte proteolytische Spaltung des Myopodins in Skelettmuskelzellen zurückzuführen sein. In der Tat fanden sich Hinweise, die diese Hypothese befürworten: Im Western Blot von Skelettmuskelgewebeeextrakten der Ratte zeigte sich neben der Hauptbande von 90 kDa eine weitere Bande, deren apparente Größe etwa mit 120 kDa der molekularen Masse der ungespaltenen Isoform e entspricht. Die ektopische Expression der Myopodinvariante a in HEK293-Zellen zeigte hingegen in der SDS-Gelelektrophorese die gleiche Laufhöhe, wie die lange Isoform der humanen Prostata (Krüger, 2007), ein weiteres Indiz dafür, dass die proteolytische Prozessierung spezifisch die kurzen Isoformen betrifft.

Die gezielte proteolytische Spaltung stellt eine Möglichkeit zur Regulation der Funktion eines Proteins dar. So wird z. B. das zytosolische Protein  $\beta$ -Catenin durch Calpain gespalten, wodurch trunke, stabile Fragmente entstehen, die daraufhin im Kern akkumulieren und dort die Transkription bestimmter Gene induzieren (Abe und Takeichi, 2007). Im Skelettmuskelgewebe wird die Isoform Calpain 3 exprimiert (Sorimachi *et al.*, 1989; Beckmann und Spencer, 2008), die, verankert durch Titin, zunächst in einer inaktiven Form vorliegt. Eine Vielzahl von sarkomerischen Proteinen kann durch Calpain3 zumindest *in vitro* gespalten werden, so z. B.: Nebulin (Fanin *et al.*, 2003), MLC1 (Cohen *et al.*, 2006), Filamin C (Guyon *et al.*, 2003; Taveau *et al.*, 2003) und Titin (Kramerova *et al.*, 2004; Taveau *et al.*, 2003). Mit gezielten Experimenten sollte die Annahme der gezielten proteolytischen Prozessierung des Myopodins überprüft werden.

#### 4.1.2 Tritopodinisformen

Für murines Tritopodin werden in der Literatur zwei Isoformen beschrieben: Tritopodin a (mCHAP a) und b (mCHAP b), welche aufgrund eines alternativen Transkriptionsstarts entstehen und entwicklungsabhängige Expression in der quergestreiften Muskulatur der Maus zeigen (Beqqali *et al.*, 2010). EST-Datenbankanalysen geben Hinweise darauf, dass auch humanes Tritopodin diese beiden Isoformen bildet. Die beiden Tritopodinisformen a und b unterscheiden sich, ähnlich wie die kurzen und langen Myopodinisformen in der



Präsenz der N-terminalen PDZ-Domäne. Zudem gibt es aber Hinweise, dass durch einen alternativen, intraexonischen Spleißvorgang im Exon 5 eine weitere Isoform, Tritopodin c, entsteht (Abb. 3.8). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression humaner und muriner Tritopodinvarianten auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Muskelzellen und Geweben untersucht. Eine Zusammenfassung des heutigen Kenntnisstandes der Expression verschiedener Tritopodinisofomen in unterschiedlichen Geweben bietet Tabelle 4.1. PCRs auf muriner cDNA zeigten, dass Tritopodin auf mRNA-Ebene im Skelettmuskel, in der Zunge, im Herz und Großhirn exprimiert wird. Im Skelettmuskel, der Zunge, aber auch im Großhirn konnten die Tritopodinisofomen a und b nachgewiesen werden, im Herzen hingegen ausschließlich die Isoform a (Abb. 3.9). In differenzierenden Hskm-Zellen konnten auf mRNA-Ebene ebenfalls die Isoformen a und b nachgewiesen werden, der für humanes Tritopodin vorhergesagte intraexonische Spleißvorgang im Exon 5 ließ sich, zumindest für Hskm-Zellen, nicht bestätigen. Aus murinem Skelettmuskelgewebe und differenzierenden C2C12-Skelettmuskelzellen konnte unerwarteterweise zudem ein RT-PCR-Produkt bestehend aus den Exons 3 und 4 amplifiziert werden. Sequenzanalysen zeigten, dass unter Annahme des Translationsstarts der Isoform a dieser Spleißvorgang in einer weiteren Isoform resultiert, wobei durch die Translation des vierten Exons eine Verschiebung des Leserasters im Exon 5 hervorgerufen wird. Diese bislang noch nicht beschriebene Isoform besitzt eine molekulare Masse von 32 kDa und wurde hier mTritopodin d genannt.

Für die Expressionsanalyse der Tritopodinisofomen auf Proteinebene stand lediglich ein isoformspezifischer Antikörper, generiert gegen die N-terminale PDZ-Domäne, zur Verfügung (Abb. 3.10). Aus diesem Grund kann dieser Antikörper nur die Tritopodinisofomen a, c und d erkennen. Die Western Blots zeigten, dass die Tritopodinexpression ausschließlich in den quergestreiften Muskeln des Herzens und des Skelettmuskels erfolgt. In humanem Herz wurde eine einzelne Bande von 140 kDa, im Skelettmuskel von 125 kDa nachgewiesen. In der Maus zeigte sich hingegen in beiden Geweben je eine einzelne Bande von etwa 130 kDa. Vermutlich entspricht diese der Tritopodinisofom a, denn auf mRNA-Ebene konnte der intraexonische Spleißvorgang 2 der Isoform c nicht nachgewiesen werden und Isoform d ist mit 32 kDa wesentlich kleiner. Die beobachteten Größenunterschiede zwischen den humanen Herz- und Skelettmuskelproben könnten durch posttranslationale

Modifikationen entstehen. In differenzierenden Hskm-Zellen konnte in den fortgeschrittenen Entwicklungsstadien mittels Western Blots die gleiche 125 kDa Isoform wie in adultem Gewebe nachgewiesen werden. Zusätzlich war eine Bande von etwa 40 kDa ab Tag 1 nach Beginn der Differenzierung nachzuweisen. Ob diese Bande auf einer Kreuzreaktivität des ML1-Antikörpers oder auf eine spezifische Erkennung einer kleineren Tritopodinisiform zurückzuführen ist, ließ sich bisher nicht klären. Diese Bande könnte zwar die Isoform d darstellen, welche im murinen Skelettmuskel identifiziert wurde, jedoch fehlt hier der Nachweis des besagten Spleißvorganges auf mRNA-Ebene. Ebenso könnte es sich aber auch um ein proteolytisches Abbaufragment des Tritopodins handeln.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben den bereits beschriebenen Tritopodinisiformen a und b, zwei weitere potentielle Isoformen existieren, deren endgültige Bestätigung allerdings noch fehlt. Die Isoformen a und b unterscheiden sich unter anderem durch das Vorhandensein der N-terminalen PDZ-Domäne. Die Charakterisierung spezifischer Bindungspartner der PDZ-Domäne könnte daher Aufschluss über die unterschiedlichen Funktionen dieser beiden Isoformen geben.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Expressionsdaten der Myopodin- und Tritopodinisiformen

	Expression in				
	Skelettmuskel	Herz	Prostata	andere glattemuskelreiche Gewebe	Gehirn
<b>Myopodin</b>	<b>Isoform e</b>	Isoform a	Isoform a	Isoform a	-
	Isoform a	<b>Isoform b</b>	Isoform f	Isoform e	-
<b>Tritopodin</b>	Isoform a	Isoform a	-	-	<i>Isoform a</i>
	Isoform b		-	-	
	<i>Isoform d*</i>		-	-	

fett: Hauptvariante, kursiv: Nachweis lediglich auf mRNA-Ebene, \*in murinen Geweben und Zellen nachgewiesen, - keine spezifische Expression nachgewiesen

## 4.2 Die Podin-Proteinfamilie und ihre Lokalisation in unterschiedlichen Muskelgeweben

Myopodin und Tritopodin werden in der Literatur als Proteine der Z-Scheibe der quergestreiften Muskulatur beschrieben (Weins *et al.*, 2001; Beqqali *et al.*, 2010). Während Tritopodin laut den Vorhersagen von Datenbanken wie z. B. Affymetrix *All-Exon-Chip-Analysen* ausschließlich in quergestreiften Muskelzellen exprimiert zu werden scheint, konnte Myopodin zudem auch in glattmuskelreichen Organen wie Blase und Prostata detektiert werden, wobei es dort vor allem in den Drüsen- und Epithelzellen nachgewiesen wurde (Sanchez-Carbayo *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2001; Jing *et al.*, 2004). Diese Beobachtung steht allerdings im Widerspruch zu eigenen Immunfluoreszenzfärbungen, die die Expression des Myopodins ausschließlich in den Glattmuskelzellen dieser Gewebe zeigten (Linnemann, 2005; Krüger, 2007). Diese Diskrepanz galt es im Rahmen dieser Arbeit genauer zu untersuchen und zudem zu klären in welchen Gewebe- und Zelltypen Myopodin, aber auch Synaptopodin und Tritopodin exprimiert werden.

### 4.2.1 Die Podin-Proteine in adulten Muskelgeweben

Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Lokalisation der Podin-Proteinfamilie in humanem Skelettmuskelgewebe zeigten, dass alle drei Podin-Proteine, also auch Synaptopodin in den Z-Scheiben der Muskelfasern lokalisiert sind, wo sie mit  $\alpha$ -Aktinin und Filamin colokalisieren (Abb. 3.28 - 3.32, Daten zusammengefasst in Tab. 3.1). Weiterhin konnte aber auch gezeigt werden, dass Myopodin und Synaptopodin in den Glattmuskelzellen der den Muskel durchziehenden Blutgefäße exprimiert werden. Tritopodin hingegen konnte dort nicht detektiert werden, was die Vorhersagen, dass Tritopodin ausschließlich in quergestreiften Muskeln exprimiert wird, bestätigt. In isolierten adulten murinen Kardiomyozyten konnte ebenfalls die Lokalisation von Myopodin und Tritopodin in den Z-Scheiben bestätigt werden (Abb. 3.33).

Aufgrund der bereits beschriebenen widersprüchlichen Beobachtungen der Expression von Myopodin in Prostatagewebe, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation des Myopodins mit drei spezifischen Antikörpern (HH9, M2 und  $\alpha$ -Ex6), alle gegen

unterschiedliche Epitope des Myopodins generiert (Abb. 3.4), untersucht. Alle Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, unabhängig vom verwendeten Antikörper, dass Myopodin ausschließlich in den Glattmuskelzellen der Prostata exprimiert wird (Abb. 3.34 - 3.35). Weder mit dem monoklonalen Antikörper HH9 noch mit dem polyklonalen Antikörper M2 oder dem isoformspezifischen Antikörper  $\alpha$ -Ex6 war Myopodin in den Epithel- oder Drüsenzellen der Prostata nachweisbar. Um auch die Expression des Myopodins auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden zusätzlich *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Interessanterweise konnte das Myopodintranskript tatsächlich in den Epithel- und Drüsenzellen, aber auch in den Glattmuskelzellen der Prostata, nachgewiesen werden (Abb. B.4). Somit konnte gezeigt werden, dass die Myopodin mRNA in den Epithel- und Drüsenzellen zwar transkribiert, diese jedoch nicht translatiert wird. Eine Möglichkeit, die Expression auf post-transkriptionaler Ebene zu kontrollieren sind miRNAs, kurze, hoch konservierte, nicht kodierende RNAs (He und Hannon, 2004). Diese regulieren die Expression durch Bindung an die 3'-untranslatierte Region der mRNA, welche dadurch entweder an der Translation gehemmt, oder durch Zerschneiden abgebaut werden (Wienholds und Plasterk, 2005). Eine Analyse mit Hilfe der Datenbank miRDB (Wang, 2008; Wang und Naqa, 2008) zur Ermittlung von Zielsequenzen von miRNAs ergab, dass 116 verschiedene miRNAs potentiell an *SYNPO2* binden können. Im Gegensatz dazu ließen sich nur 10 miRNAs für *SYNPO* und 7 miRNAs für *SYNPO2L* ermitteln. Die Regulation durch miRNAs ließe sich mit einem gezielten „knock down“ des entsprechenden *Dicers* nachweisen.

Auch im Uterusgewebe der Maus konnte Myopodin auf Proteinebene ausschließlich in den dortigen Glattmuskelzellen nachgewiesen werden, wobei die Betrachtung von höheren Vergrößerungen zudem zeigte, dass Myopodin nicht im Zellkern lokalisiert ist (Abb. 3.36).

#### **4.2.2 Die Podin-Proteinfamilie während der Muskeldifferenzierung**

Skelettmuskelzellen sind, wie bereits unter Abschnitt 1.2.1.3 beschrieben, durch Fusion von Muskelvorläuferzellen entstandene multinukleäre Zellen (Wakelam, 1985). Während der

Myogenese entziehen sich diese Myoblasten dem Zellzyklus und initiieren die Expression muskelspezifischer Gene (Lassar *et al.*, 1994). Da alle drei Podin-Proteine in der adulten sarkomerischen Z-Scheibe der Skelettmuskelzellen lokalisiert sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, wann die Expression dieser Proteine im Verlauf der Muskeldifferenzierung auftritt und wo sie lokalisiert sind. Synaptopodin konnte als einziges Podin bisher nicht in differenzierenden Skelettmuskelzellen detektiert werden (Albinus, 2008).

#### 4.2.2.1 Myopodin während der Muskeldifferenzierung

Weins *et al.* (2001) beschrieben Myopodin als ein Protein, das entwicklungsabhängig eine duale Lokalisation sowohl in der Z-Scheibe als auch im Nukleus aufweist. Demnach war Myopodin in undifferenzierten C2C12-Myoblasten zunächst im Zellkern, in differenzierten Muskelzellen hingegen vorwiegend in der Z-Scheibe lokalisiert. Weiterhin wurde eine stressabhängige Relokalisation des Myopodins in den Zellkern postuliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Myopodin in humanen Skelettmuskelzellen und in murinen C2C12-Zellen untersucht.

Für Myopodin konnte dabei sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass in Hskm-Zellen bereits in sehr frühen Differenzierungsstadien die Isoform e exprimiert wird (siehe Abschnitt 3.2.1). Darüber hinaus gelang hier der Nachweis, dass Myopodin sogar vor dem sarkomerspezifischen  $\alpha$ -Aktinin exprimiert wird (Abb. 3.15), welches als eines der frühesten skelettmuskelspezifischen Proteine während der Muskeldifferenzierung gilt (Ehler *et al.*, 1999; Sanger *et al.*, 2005). Untersuchungen in *Drosophila melanogaster* zeigten, dass die Defizienz von  $\alpha$ -Aktinin zwar Auswirkungen auf die Organisation der Z-Scheiben und Anheftungsstrukturen der extrazellulären Matrix hat, es jedoch für die initiale Sarkomerogenese nicht zwingend notwendig zu sein scheint (Fyrberg *et al.*, 1998). Diese Funktion scheinen andere Proteine zu übernehmen, wobei Myopodin ein interessanter Kandidat für die Organisation und Verankerung der Aktinfilamente der frühen Entwicklung des myofibrillären Apparates ist. Da Myopodin in den differenzierenden Zellen bereits vor  $\alpha$ -Aktinin exprimiert wird, könnte es eine wichtige Rolle in der strukturellen Anordnung verschiedenster muskelspezifischer Proteine in den *Z-bodies* und später in den Z-Scheiben spielen.

Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass während der gesamten weiteren Muskeldifferenzierung Myopodin und  $\alpha$ -Aktinin, von den initialen *Z-bodies* über weiter fortgeschrittene Z-Scheibenvorläuferstrukturen bis zur vollständig ausdifferenzierten sarkomerischen Z-Scheibe, colokalisieren. Diese Beobachtung der Lokalisation von Myopodin konnte auch in den murinen Skelettmuskelzelllinien C2C12 und H2k bestätigt werden. Jedoch konnte murines Myopodin nicht im Western Blot von SDS-Totalextrakten dieser Zellen detektiert werden. Die Ursache dafür ist unklar, eventuell ist jedoch die Affinität der Antikörper HH9 und M2 für murines Myopodin zu schwach oder das Epitop ist für den Antikörper nicht zugänglich. Zudem konnten de Ganck *et al.* (2008) zeigen, dass Myopodin in PC3-Zellen, eine epitheliale Prostatazelllinie, ein sehr geringes Expressionsniveau aufweist, was ein weiteres Problem für die Detektion des Myopodins in murinen Zellen darstellen könnte. Entgegen der von Weins *et al.* (2001) beschriebenen Kernlokalisierung, konnte in der vorliegenden Arbeit in keinem meiner zahlreichen Versuche Myopodin im Zellkern nachgewiesen werden. Alle hier verwendeten Antikörper, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet waren, zeigten Myopodinfärbung im Zytoplasma, der Zellkern hingegen war in keinem Fall angefärbt. Es wäre denkbar, dass der von Weins *et al.* (2001) verwendete Antikörper eine Kreuzreaktivität mit einem in bestimmten Stadien exprimierten Zellkernprotein aufweist.

#### 4.2.2.2 Tritopodin während der Muskeldifferenzierung

Beqqali *et al.* (2010) beschrieben Tritopodin in ihrer Publikation als ein Protein der Z-Scheibe, was bereits in differenzierenden Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert wird. Neben der Lokalisation in der Z-Scheibe, konnte Tritopodin in embryonalen Kardiomyozyten ebenfalls im Bereich der Kernhülle nachgewiesen werden. Da die Tritopodinisoform a im adulten Herz- und Skelettmuskelgewebe, Isoform b (Abb. 3.8) hingegen vorwiegend in embryonalen Stadien nachgewiesen werden konnte, wird eine muskelspezifische und entwicklungsabhängige Expression dieser Isoformen angenommen. In differenzierenden C2C12-Zellen konnten die Autoren allerdings beide Isoformen auf mRNA-Ebene nachweisen, wobei die mRNA der Spleißvariante b ab Tag 1 der Differenzierung und Spleißvariante a ab Tag 3 der Differenzierung nachweisbar war. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Tritopodinexpression sowohl in humanen Skelettmuskelzellen

als auch in murinen C2C12-Zellen auf mRNA- und Proteinebene untersucht, wobei für letzteres lediglich ein Antikörper gegen die Tritopodinisform a zur Verfügung stand. Auf mRNA-Ebene konnte dabei gezeigt werden, dass beide Tritopodinisformen bereits in sehr frühen Stadien der Muskeldifferenzierung exprimiert werden. Ein signifikanter Unterschied der Expression der beiden Isoformen, wie von Beqqali *et al.* (2010) beschrieben, war dabei jedoch nicht zu beobachten. Wie bereits oben erwähnt, konnte in differenzierenden C2C12-Zellen zusätzlich ein PCR-Produkt erhalten werden, das einen Spleißvorgang von Exon 3 zu 4 nachweist und auf die bislang unbekannte Isoform mTrito d hinweist. Auf Proteinebene ließ sich Tritopodinisform a in Extrakten differenzierender Hskm-Zellen ab Tag 3 der Differenzierung detektieren (Abb. 3.23). Die Bande bei 45 kDa, die ab dem ersten Tag der Differenzierung nachweisbar war, stellt entweder, wie bereits erwähnt, die neue Isoform d dar oder ist auf eine Kreuzreaktivität des Antikörpers zurückzuführen. In Western Blots differenzierender C2C12-Zellen konnte dagegen, ähnlich wie auch beim Myopodin (siehe oben), keine Tritopodinexpression nachgewiesen werden. Die Ursache dafür könnte die zu schwache Affinität des Antikörper ML1 für murines Tritopodin sein oder das Epitop ist für den Antikörper nicht zugänglich. Zwar trat an Tag 5 und 6 nach Beginn der Differenzierung eine Bande von etwa 60 kDa auf, allerdings entspricht ihre molekulare Masse keiner vorhergesagten murinen Isoform. Diese Bande könnte aber, unter Annahme des für humanes Tritopodin vorhergesagten intraexonischen Spleißvorganges im Exon 5, die Isoform c darstellen. 3'-RACE- und weitere RT-PCR-Experimente könnten klären, ob dieser Spleißvorgang in murinem Tritopodin stattfindet. Eine Aussage über die Expression der Tritopodinisform b kann zu diesem Zeitpunkt nicht getroffen werden, da ein spezifischer Antikörper zum Nachweis dieser Isoform bislang fehlt.

Im Rahmen dieser Arbeit angefertigte Immunfluoreszenzfärbungen von Hskm-Zellen zeigten bereits in frühen Differenzierungsstadien die Expression von Tritopodin. Während der gesamten Muskeldifferenzierung von in den initialen *Z-bodies*, bis zu den vollständig ausdifferenzierten sarkomerischen Z-Scheiben, colokalisierten Tritopodin und  $\alpha$ -Aktinin. Die Färbung differenzierender C2C12-Zellen bestätigte diese Beobachtungen. Auffallend jedoch war die Färbung im Bereich der Kernhülle, die während der gesamten Differen-

zierung in Hskm-Zellen, nicht aber im adulten Gewebe beobachtet werden konnte. Da diese Färbung nur in Hskm-Zellen und nicht in C2C12-Zellen beobachtet wurde, ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um eine Kreuzreaktivität des Tritopodinantikörpers ML1 mit einem dort lokalisierten Protein handelt, zumal auch im Western Blot differenzierender Hskm-Zellen eine nicht eindeutig zuzuordnende Bande von 45 kDa auftrat. Allerdings beschreiben Beqqali *et al.* (2010) eine ähnliche Färbung im Bereich der Kernhülle für Tritopodin in embryonalen Kardiomyozyten.

Die sehr frühe Expression der beiden Podine Myopodin und Tritopodin in der Skelettmuskeldifferenzierung deutet darauf hin, dass diese Proteine wichtige Bestandteile der initialen Myofibrillogenese sind. Dies wird auch durch die gezielte Herunterregulierung des Expressionslevels von Tritopodin in Zebrafischen bestätigt, die zu einer gestörten Somitenentwicklung, einer abnormalen Herzmorphologie sowie verringerter Kontraktilität und der Ausbildung cardialer Ödeme führte (Beqqali *et al.*, 2010).

## 4.3 Die Podin-Proteinfamilie und ihre Interaktionspartner

### 4.3.1 Die Podin-Proteinfamilie und Filamin C

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals die Interaktion von Myopodin und Filamin C mit biochemischen Bindungsstudien auf die Immunglobulindomänen 20-21 einzuschränken, wobei Ig-Domäne 20 ebenso wie Ig-Domäne 21 alleine keine Interaktion zeigten. Beide Ig-Domänen scheinen also für die Bindung essentiell zu sein. Für Filamin A wurde gezeigt, dass die Ig-Domänen 16-17, 18-19 und 20-21 sogenannte kompakte Domänenpaare bilden, die nicht nur strukturell sondern auch funktionell eine Einheit bilden (Heikkinen *et al.*, 2009). So konnte für die Bindung von Filamin A Ig-Domäne 21 an Integrin  $\beta$ -tails gezeigt werden, dass hier eine Auotinhibition durch einen N-terminalen  $\beta$ -Strang der Ig-Domäne 20 stattfindet, was eine „interne“ Regulation von Interaktionen an Filamin darstellt. Es ist denkbar, dass auch andere Bindungen über ähnliche Mechanismen posi-



tiv oder negativ reguliert werden. Auch für Filamin C wird die Bildung dieser kompakten Domänenpaare postuliert (Heikkinen *et al.*, 2009). Diese strukturelle Besonderheit könnte die Notwendigkeit beider Ig-Domänen für die Bindung an Myopodin erklären.

Die hier durchgeführten Coimmunpräzipitationen und Hefe-Zwei-Hybrid-Versuche mit den Ig-Domänen 19-20 zeigten widersprüchliche Ergebnisse. In diesem Konstrukt liegen Ig-Domänen vor, die eigentlich zu unterschiedlichen kompakten Domänenpaaren (d18-19 und 20-21) gehören. Durch die Zerstörung dieser strukturellen Merkmale könnte die Bindung von Myopodin an Filamin C Ig-Domäne 20 ebenfalls beeinflusst sein, was in den unterschiedlichen Bindungsassays zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt haben könnte.

Dennoch zeigten Hefe-Zwei-Hybrid-Studien auch positive Bindungsergebnisse mit den Domänen 17-19 und 21-23. Strukturelle Analysen aller einzelner Ig-Domänen von Filamin A ergaben, dass diese sich in vier Gruppen (A-D) einteilen lassen, die untereinander ähnliche Bindungseigenschaften aufweisen (Ithychanda *et al.*, 2009). Demnach gehören zur Gruppe A die Ig-Domänen 4, 9, 12, 17, 19, 21 und 23, zur Gruppe B die Ig-Domänen 8, 16, 18, 20, 22 und 24. Weiterhin ließ sich nachweisen, dass z. B. Glykoprotein Ib $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ), an alle Ig-Domänen der Gruppe A bindet, mit der stärksten Affinität zur Ig-Domäne 21, wobei die Affinitäten alle im sub $\mu$ M bis  $\mu$ M -Bereich lagen (Ithychanda *et al.*, 2009). Wenn man dieses Modell auf Filamin C überträgt, würden sich die positiven Hefe-Zwei-Hybrid-Ergebnisse mit der Affinität der Ig-Domänen der Gruppe B, zu der Ig-Domäne 20 des Filamin A gehört, erklären. In diesem Fall würden nämlich auch die Domänen 18 und 22 an Myopodin binden, eventuell aber mit schwächerer Affinität, was wiederum auch die negativen Ergebnisse in den Coimmunpräzipitationen erklären könnte. Allerdings ist die Ig-Domäne 20 des Filamin C durch die enthaltene Insertion strukturell kaum mit der Ig-Domänen 20 des Filamin A vergleichbar, was die Übertragung dieses Modells auf Filamin C fraglich macht. Um diesen Punkt zu klären, müsste man die Bindungsstärken einer großen Anzahl von Fragmenten durch SAW, Biacore oder Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmen.

Für die Proteine Tritopodin und Synaptopodin konnte in der vorliegenden Arbeit bezüglich Filamin C ein sehr ähnliches Bindungsverhalten nachgewiesen werden.

Die Interaktion wurden hier ausschließlich durch Coimmunpräzipitationen mit den Domänenpaaren 18-19, 20-21 und 18-21 getestet, wobei die Bindungsstelle für alle Podine auf die Ig-Domänen 20-21 des Filamin C eingegrenzt werden konnte. Zwar konnte für Synaptopodin auch eine schwache Interaktion mit Filamin C Ig-Domäne 18-19 detektiert werden, diese könnte aber ebenfalls auf die oben erwähnte schwache Bindung an andere Ig-Domänen zurückzuführen sein.

Umgekehrt gelang es mir in der vorliegenden Arbeit auch innerhalb der Podine eine Region einzuengen, die die Bindung an Filamin C vermittelt. Mit Hilfe vergleichender Sequenzanalysen ließen sich zunächst zwei Sequenzabschnitte identifizieren, die einen hohen Homologiegrad in allen Podin-Proteinen aufweisen (Homologieregionen 1 und 2, siehe Anhang B.3). Die Vermutung lag nahe, dass diese hochkonservierten Bereiche direkt an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sein könnten.

Es zeigte sich, dass sowohl Homologieregion 1 als auch Homologieregion 2 aller Podin-Proteine mit Filamin C interagieren. Transfektionsstudien dieser Fragmente ergaben für die Homologieregion 1 aller Podine ein schwächeres *Targeting* an *dense bodies* und Fokalkontakte als Homologieregion 2. Dies könnte bedeuten, dass Homologieregion 2 den für die Bindung essentiellen Bereich darstellt. Die Fragmente, die beide Homologieregionen enthielten, zeigten jedoch in allen Fällen eindeutig das stärkste *Targeting*. Es zeichnet sich also ab, dass beide Homologieregionen zusammen die funktionelle Bindungsstelle für Filamin C darstellen, obwohl in diesem Bereich auch Interaktionen mit  $\alpha$ -Aktinin und zumindest für Myopodin auch mit F-Aktin nachgewiesen werden konnten.

Eine noch detailliertere Analyse der für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren bzw. Peptide ist wahrscheinlich nur noch durch die Herstellung von Co-Kristallstrukturen der beteiligten Interaktionspartner möglich.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Myopodin auch mit Filamin A interagiert. Erste gezielte Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente und Western Blot-Overlays deuteten auf eine Interaktion der beiden Proteine hin (Vakeel, 2006). Mit den von mir durchgeführten Coimmunpräzipitationen konnte diese Wechselwirkung allerdings nicht bestätigt werden. Vermutlich besitzt Myopodin eine deutlich geringere Affinität zu Filamin A als zu Filamin C. Um diese Frage zu klären werden aktuell SAW-Messungen zur

Bestimmung der Bindungsstärken von Filamin C im Vergleich zu Filamin A durchgeführt, wobei erste Ergebnisse, in denen Filamin C eine etwa 10-fach stärkere Affinität zu Myopodin besitzt als Filamin A, diese Vermutung bereits bestätigen (Bachelorarbeit Löhner, 2010).

### 4.3.2 Die Podin-Proteinfamilie und $\alpha$ -Aktinin

Wie bereits in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, interagiert Synaptopodin mit  $\alpha$ -Aktinin über mehrere unabhängige  $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstellen (Kremerskothen *et al.*, 2005; Asanuma *et al.*, 2005). Demnach besitzt die Isoform Synpo-short zwei unabhängige  $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstellen, die Isoform Synpo-long hingegen vier (Abb. B.1, C). Zudem scheint Synaptopodin die Aktinbündelungs-Aktivität von  $\alpha$ -Aktinin zu regulieren (Asanuma *et al.*, 2005).

Aufgrund des hohen Homologiegrades der Podin-Proteine untereinander wurde vermutet, dass auch Myopodin und Tritopodin ähnliche Bindungseigenschaften bezüglich  $\alpha$ -Aktinin aufweisen. Deshalb wurde die  $\alpha$ -Aktinin-Interaktion von Myopodin, welche bereits von Takada *et al.* (2001), Pham und Chalovich (2006) und Faul *et al.* (2007) veröffentlicht wurde, sowie von Tritopodin, publiziert von Beqqali *et al.* (2010), im Rahmen dieser Arbeit ausführlich studiert.

Anhand zahlreicher Coimmunpräzipitationen konnte dabei erstmals gezeigt werden, dass sowohl Myopodin als auch Tritopodin jeweils mehrere unabhängige  $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstellen besitzen. In beiden Fällen ließen sich die interagierenden Abschnitte auf die C-terminale Hälfte der Proteine einengen (siehe Abschnitte 3.3.3 und 3.3.4, Daten zusammengefasst in Abb. 4.1). Für Myopodin konnte zudem die isoformspezifische Interaktion des vom Exon 6 kodierten Bereichs mit  $\alpha$ -Aktinin nachgewiesen werden. Somit konnte hier gezeigt werden, dass alle Podin-Proteine ein ausgesprochen ähnliches  $\alpha$ -Aktinin-Bindungsverhalten aufweisen. Aus diesem Grund kann für Myopodin und Tritopodin auch spekuliert werden, dass sie ähnlich wie Synaptopodin die Aktinbündelungs-Aktivität von  $\alpha$ -Aktinin regulieren. In der Literatur gibt es zudem Beispiele dafür, dass PDZ-Domänen die Bindung an  $\alpha$ -Aktinin vermitteln können. So binden die PDZ-Domänen des ALP (*actinin-associated LIM protein*) und des CLP36 (*36 kDa carboxyl terminal LIM domain*

*protein*) an  $\alpha$ -Aktinin (Xia *et al.*, 1997; Vallenius *et al.*, 2000). Dies ließ sich jedoch für die PDZ-Domänen der Podin-Proteine Myopodin und Tritopodin nicht nachweisen (Vakeel, 2006; Rieck, 2010).

Weiterhin stellte sich natürlich die Frage nach der Funktion mehrerer  $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstellen innerhalb eines Proteins. Ausgehend von zwei möglichen Bindungsmodellen, dargestellt in Abbildung 3.44 B, wobei das erste die molare 1:1 Bindung von Myopodin an  $\alpha$ -Aktinin beschreibt, das zweite die mögliche Bindung von mehreren  $\alpha$ -Aktininmolekülen an einem Myopodinmolekül, wurde untersucht, ob unterschiedliche Bereiche des Myopodins auch unterschiedliche Regionen des  $\alpha$ -Aktinins binden. Die Eingrenzung der Bindungsstellen im  $\alpha$ -Aktinin-Molekül zeigte, dass das zentral gelegene  $\alpha$ -Aktinin bindende Myopodinfragment 405-663 ebenso wie das C-terminale Fragment Myop 901-1093 an die Spektrin-ähnliche Domäne 3 (R3) bindet. Daraus kann geschlossen werden, dass wohl mehrere  $\alpha$ -Aktinin-Moleküle an einem Myopodinmolekül binden. Da  $\alpha$ -Aktinin auch eine strukturelle Rolle in der Z-Scheibe einnimmt, könnten mehrere Bindungsstellen die Podine in dieser verankern. Weiterhin muss natürlich bedacht werden, dass nicht alle hier ermittelten Bindungsstellen *in vivo* permanent zugänglich sein könnten. Zum einen könnte durch andere Interaktionspartner, wie z. B. Filamin C oder Aktin, Bindungsstellen bedeckt sein, zum anderen könnte auch durch sterische Hinderung der Zugang zu den Bindungsstellen versperrt sein. Außerdem bieten posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen, die Möglichkeit zur Regulation von Bindungen. Wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben, wird Myopodin *in vitro* durch die Kinasen PKA, PKC und MAPK phosphoryliert. Ob diese einen direkten Einfluss auf die  $\alpha$ -Aktinin-Bindung haben, ließ sich bislang allerdings nicht klären. Faul *et al.* (2008) beschrieben aber die phosphorylierungsabhängige Interaktion von Myopodin mit 14-3-3 Proteinen.

Für  $\alpha$ -Aktinin sind darüber hinaus eine Vielzahl weiterer interagierender Proteine beschrieben (Sjöblom *et al.*, 2008). Durch seine zentrale Rolle bildet es nicht nur eine Verknüpfung der Z-Scheibe mit Signalproteinen und Bestandteilen der Plasmamembran, sondern es führt Molekülkomplexe zu funktionierenden Einheiten zusammen. Proteine des kontraktiven Apparates, die mit  $\alpha$ -Aktinin interagieren sind Titin (Ohtsuka *et al.*, 1997), Nebulin (Nave *et al.*, 1990), CapZ (Papa *et al.*, 1999), die Palladin/Myotilin/Myopalladin-

Familie (Salmikangas *et al.*, 1999; Otey *et al.*, 2005), hCLIM1, ein Mitglied der Enigma/Cypher-Familie (Kotaka *et al.*, 2000), ZASP/Cypher/Oracle (Faulkner *et al.*, 1999), sowie ALP (Klaavuniemi *et al.*, 2004), MLP (Louis *et al.*, 1997), Lasp-2 (Ziesenis *et al.*, 2008), Smithin (Chi *et al.*, 2005) und Calsarcin/FATZ/Myozenin (Faulkner *et al.*, 2000). Die Podin-Proteinfamilie reiht sich somit in eine lange Liste  $\alpha$ -Aktinin bindender Proteine ein. Die zeitliche, örtliche und situationsbedingte Koordination dieser Wechselwirkungen erfordert eine spezifische und exakte Regulation. Die Erforschung dieser Regulationsmechanismen wird ein spannender Bestandteil der zukünftigen Forschung sein.

### 4.3.3 Myopodin und F-Aktin

Die Bindung von Myopodin, bzw. Fesselin an Aktin wurde in Grundzügen bereits von Leinweber *et al.* (1999) gezeigt. Auch Weins *et al.* (2001) konnten in einem Aktin Co-sedimentationsassay zeigen, dass *in vitro* translatiertes und mit  $^{35}\text{S}$ -markiertes Myopodin zusammen mit F-Aktin pelletiert wird. Die Aktinbindungsstelle wurde hier anhand trunkierter Myopodinfragmente und durch Analyse des *Targetings* dieser Konstrukte in C2C12-Myoblasten eingengt (Weins *et al.*, 2001). Mit dem Wissen, dass Myopodin mehrere Bindungspartner besitzt (siehe Abschnitte 3.3.1 und 3.3.3), ist es jedoch ebenso möglich, dass das von Weins *et al.* (2001) beobachtete *Targeting* auf eine der bereits oben beschriebenen Interaktionen, wie z. B. mit Filamin oder  $\alpha$ -Aktinin, zurückzuführen ist. Von Leinweber *et al.* (1999) wurde zudem beobachtet, dass durch die Zugabe von Fesselin/Myopodin Aktin aggregiert, was auf eine Quervernetzung oder Bündelung hindeuten könnte. Deshalb galt es hier, zunächst die F-Aktinbindungsstelle einzugrenzen und zu untersuchen, ob Myopodin tatsächlich aktinbündelnde Eigenschaften besitzt.

Mit Hilfe von Aktin *high speed Cosedimentationsassays* konnte ich zeigen, dass Myopodin zwei voneinander unabhängige F-Aktin-Bindungsstellen besitzt, die beide im von Exon 4 kodierten Bereich situiert sind (siehe Abschnitt 3.4.1), was wiederum bedeutet, dass alle sechs putativen Isoformen diese Bindungsstellen beinhalten. Die Cosedimentationen ergaben zudem, dass die vordere Aktinbindungsstelle im Bereich der Aminosäuren 534-663 eine etwas geringere Affinität zu F-Aktin besitzt, als die hintere im Bereich der Ami-

nosäuren 664-802.

Weiterhin konnten hier mit Hilfe von *low speed Cosedimentationsassays* eindeutig gezeigt werden, dass Myopodin F-Aktin bündeln kann. Das Myopodinfragment 405-916 und interessanterweise auch die Fragmente 635-916 und 664-916, welche nur eine Aktinbindungsstelle beinhalten, waren in der Lage zwischen 70 und 80 % des eingesetzten Aktins zu verknüpfen. Die elektronenmikroskopische Analyse bestätigte, dass diese Myopodinfragmente das Aktin zu prominenten, dicht gepackten Bündeln verknüpft, die strukturell den durch  $\alpha$ -Aktinin hervorgerufenen Bündeln sehr ähnlich sind (siehe Abschnitt 3.4.2). Der scheinbare Widerspruch, dass bereits eine Aktinbindungsstelle für die Bündelung ausreicht, erklärt sich durch die in dieser Arbeit erstmals gezeigte Fähigkeit des Myopodins, Dimere zu bilden (Abb. 3.64). Weitere prominente Beispiele für aktinbündelnde Proteine mit nur einer Aktinbindungsstelle im Molekül sind  $\alpha$ -Aktinin, Filamin und Myotilin (Ylänne *et al.*, 2001; Himmel *et al.*, 2003; von Nandelstadh *et al.*, 2005).

#### 4.3.4 Die Podine sind Multiadapterproteine der Z-Scheibe

Lange Zeit wurde die Z-Scheibe als ein statisches Gebilde zur Verankerung von Aktinfilamenten betrachtet. In den letzten Jahren wurde aber deutlich, dass sie durch eine Vielzahl von Signalproteinen eine Plattform zur Verarbeitung und Weiterleitung mechanischer und chemischer Reize bietet (Hoshijima, 2006). Außerdem unterliegt die Z-Scheibe einer ständigen Dynamik. So werden während der Sarkomerogenese eine Vielzahl von Proteinen ausgetauscht und zugefügt (siehe Abschnitt 1.2.1.3). Weiterhin unterliegen die Z-Scheiben-Proteine einem ständigen *Turnover*, so zeigten z. B. FRAP-Experimente, dass über 90 % des  $\alpha$ -Aktinins als mobile Phase vorliegen (Manisastry *et al.*, 2009). Zudem ist die Z-Scheibe in der Lage sich an bestimmte Bedingungen, wie z. B. unter großer Belastung oder bei pathogenen Zuständen, flexibel an diese Umstände anzupassen. All diese Vorgänge müssen akribisch in Zeit und Raum reguliert und kontrolliert werden. Hierzu sind viele Proteine und deren Wechselwirkung miteinander notwendig, die auch viele Regulationsmöglichkeiten bieten.

Für die Podin-Proteinfamilie konnte gezeigt werden, dass sie mit  $\alpha$ -Aktinin2, Filamin C und zumindest im Falle von Myopodin auch F-Aktin binden (Takada *et al.*, 2001; Pham

und Chalovich, 2006; Faul *et al.*, 2007; Weins *et al.*, 2001), was sie zu wichtigen Adapterproteinen der Z-Scheibe macht. Für Myopodin sind noch weitere Interaktionspartner beschrieben, die die Rolle des Myopodins als Adapterprotein der Z-Scheibe bestärken. So interagiert Myopodin im Herzen direkt mit mAKAP (A-kinase anchoring protein), Calcineurin, CAMKII und Myomegalin, alle Daten zusammengefasst in Abbildung 4.1 (Faul *et al.*, 2008). Die Interaktion von Myopodin mit Zyxin, die von Yu und Luo (2006) beschrieben wurde, scheint aber lediglich auf frühe Entwicklungsstadien des Skelettmuskels beschränkt zu sein, da Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass die beiden Proteine nur in diesen Stadien in den *Z-bodies* colokalisieren. In fortgeschrittenen Differenzierungsstadien zeigt Zyxin Lokalisation in den Fokalkontakten, während Myopodin in den Z-Scheibenvorläuferstrukturen und schließlich in den Z-Scheiben situiert ist (Albinus, 2008; Linnemann *et al.*, 2010).

Einen ähnlich gelagerten Fall mit sehr ähnliche Bindungseigenschaften wie Myopodin, stellt das Protein Myotilin dar (Salmikangas *et al.*, 1999; Mologni *et al.*, 2001). Es bindet ebenso an  $\alpha$ -Aktinin, Filamin C und F-Aktin und ist in der Lage zu dimerisieren (van der Ven *et al.*, 2000; Salmikangas *et al.*, 2003; von Nandelstadh *et al.*, 2005). Diese Parallelen könnten ein Hinweis auf ähnliche Funktionen der beiden Proteine sein. Myotilin wird als ein Strukturprotein der Z-Scheibe beschrieben, wobei es durch die Bindung an F-Aktin die Depolymerisation verhindert (Salmikangas *et al.*, 2003). Myotilin-defiziente Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp, eventuell ein Hinweis darauf, dass der Verlust dieses Proteins, durch ein anderes Protein wie z. B. Palladin, Myopalladin oder Myopodin, kompensiert werden kann (Moza *et al.*, 2007). Das in Glattmuskelzellen exprimierte Myopodin-Ortholog Fesselin bindet zudem an Calmodulin (Kolakowski *et al.*, 2004), Glattmuskelaktin und Myosin (Schroeter und Chalovich, 2004). Weiterhin inhibiert Myopodin dort die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität, weshalb Myopodin bzw. Fesselin im Glattmuskel eine ähnliche Rolle wie Caldesmon zugesprochen wird (Schroeter und Chalovich, 2005). Ob diese Funktionen auch im Skelettmuskel eine Rolle spielen, bleibt zum heutigen Zeitpunkt noch unbekannt.

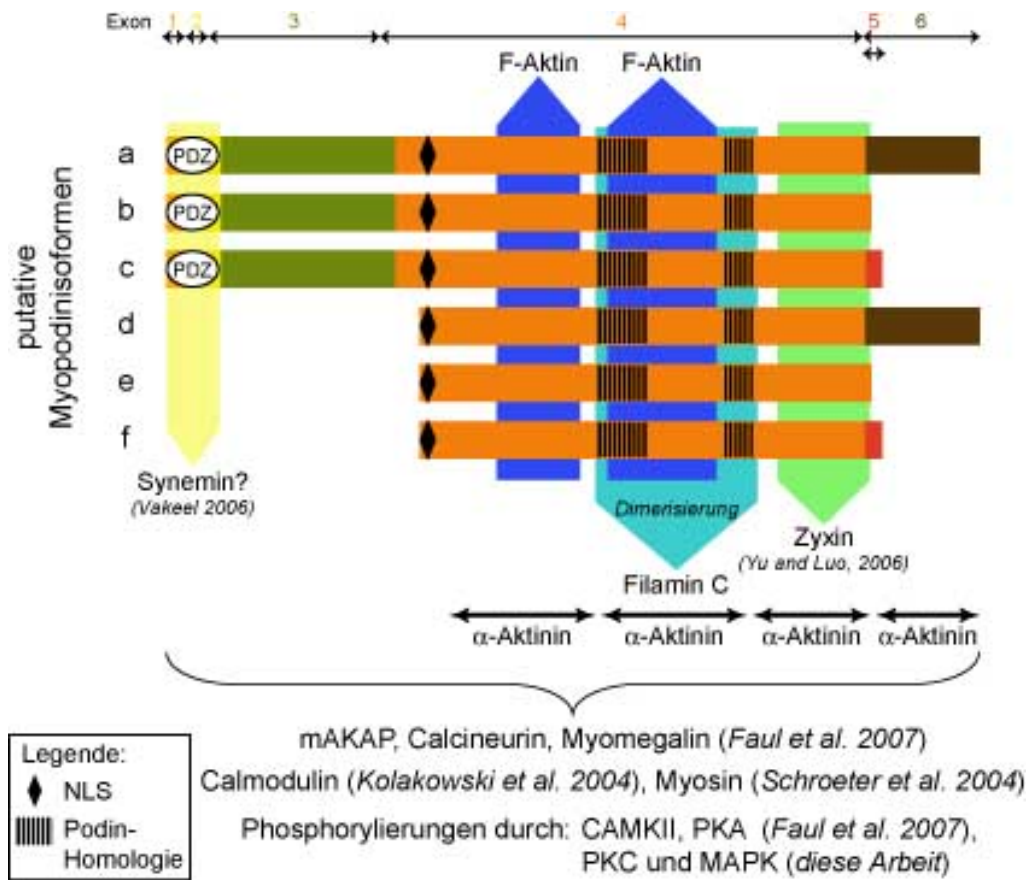


Abbildung 4.1: **Zusammenfassung der Interaktionspartner sowie ihrer Bindungsstellen im Myopodin.** Die schematische Darstellung zeigt die sechs putativen Myopodinisformen sowie die Lage der in dieser Arbeit gezeigten Bindungsstellen von Filamin C,  $\alpha$ -Aktinin und F-Aktin. Zudem sind die potentiellen Bindungsregionen von Synemin und Zyxin eingezeichnet und alle weiteren Interaktionspartner mit den jeweiligen Literaturangaben aufgelistet.

## 4.4 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die detaillierte zellbiologische und biochemische Charakterisierung der Podin-Proteinfamilie. Jedes der drei Familienmitglieder unterliegt alternativen Spleißvorgängen, welche in verschiedene Isoformen der Proteine resultieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Isoformen des Myopodins aber auch des Tritopodins eine wesentlich größere Komplexität aufweisen als bislang angenommen. In Grundzügen gelang es dabei, einige Isoformen und ihre Expression nachzuweisen, allerdings sind für weiterführende Analysen zusätzliche isoformspezifische Antikörper notwendig. So könnten Antikörper gegen den vom Exon 5 kodierten Bereich des Myopodins sowie gegen die für die Isoformen b und e spezifische C-terminale Region helfen,



die Expressionsmuster auf Proteinebene detaillierter zu untersuchen und eventuelle Unterschiede dieser Isoformen nachzuweisen. Da diese Bereiche aber lediglich 24 bzw. 9 Aminosäuren umfassen, könnten spezifische Antikörper gegen diese Bereiche nur durch die Immunisierung mit synthetisch erzeugten Peptiden erhalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dennoch gezeigt werden, dass Myopodinisoform e die Hauptvariante im Skelettmuskel ist. Ein Rätsel bleibt aber, warum die molekulare Masse dieser Isoform in der SDS-Gelelektrophorese eine apparente Masse von 90 kDa, ektopisch exprimiert aber 120 kDa besitzt. Ein proteolytischer Abbau durch skelettmuskelspezifische Proteasen, wie zum Beispiel Calpain 3, könnte durch Inkubation des ektopisch exprimierten Proteins und anschließender Analyse der molekularen Masse in der SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Zudem könnte auch versucht werden endogenes und ektopisch exprimiertes Myopodin mittels spezifischer Antikörper zu präzipitieren, anschließend mittels Massenspektrometrie zu sequenzieren und diese miteinander zu vergleichen. Für die Untersuchung der Tritopodinisoformen und deren Expression stand bislang lediglich ein Antikörper zur Verfügung, der die langen Isoformen a und c erkennt. Ein Antikörper, der alle Isoformen erkennt, befindet sich in Arbeit und kann in Zukunft für Expressionsanalysen verwendet werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien zeigten, dass alle Podin-Proteine mit Filamin C Ig-Domäne 20-21 interagieren können und zudem multiple Bindungsstellen für  $\alpha$ -Aktinin besitzen. Es ist zu vermuten, dass diese Bindungsereignisse einer strengen Kontrolle unterliegen. Erste Phosphorylierungsexperimente zeigten, dass Myopodin *in vitro* phosphoryliert wird. Gezielte Interaktionsstudien z. B. mit Phospho-Mimikry-Mutanten, könnten Aufschluss darüber geben, ob diese posttranslationalen Modifikationen die Bindungen beeinflussen und regulieren können. Hierzu müssten allerdings zunächst die Phosphorylierungsstellen im Myopodinmolekül lokalisiert werden. Zudem können Co-Kristalle der jeweiligen Bindungspartner die konformationelle Anordnung und wichtige Aminosäurereste, die zu der Bindung beitragen, aufschlüsseln. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Myopodin zwei Aktinbindungsstellen besitzt und F-Aktin zu Bündeln verknüpfen kann. Aufgrund des hohen Homologiegrades der Podin-Proteine ist anzunehmen, dass auch Synaptopodin und Tritopodin diese Eigenschaften besitzen.

Mit Hilfe biochemischer und elektronenmikroskopischer Analysen sollte dies überprüft werden.

Da alle drei Podin-Proteine im Skelettmuskel exprimiert werden und ähnliche Bindungseigenschaften aufweisen, wird eine wichtige Rolle der Podin-Proteine im Skelettmuskel postuliert. Aufgrund der Expression von Myopodin und Tritopodin in sehr frühen Stadien der Differenzierung, wird weiterhin eine wichtige Funktion in der Muskeldifferenzierung postuliert. Um die Rolle der Podin-Proteinfamilie im Muskel näher zu untersuchen, ist es notwendig, mindestens eines der drei Gene auszuschalten bzw. den Expressionslevel durch RNA-Interferenz zu reduzieren. Möglicherweise wird aber der Verlust eines Podins durch die Hochregulierung der Expression der anderen Familienmitglieder kompensiert. Um Rückschlüsse über die Funktionen dieser Proteine machen zu können, wäre es also notwendig mindestens zwei, wenn nicht sogar alle drei Podin-Gene auszuschalten bzw. den Expressionslevel durch siRNAs zu reduzieren. Eine weitere interessante Frage ist, warum es eine solch große Vielfalt unterschiedlicher Isoformen der Podin-Proteine gibt. Haben diese unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen? Ein erster Ansatz zur Klärung dieser Frage wäre die Bestimmung isoformspezifischer Bindungspartner. Die N-terminalen PDZ-Domänen des Myopodins und Tritopodins, die nur in bestimmten Isoformen exprimiert werden, geben Anlass zur Vermutung, dass sie wichtige Rollen in Bezug auf die Wechselwirkung mit anderen Proteinen einnehmen. Eine gezielte Untersuchung der Funktionen der unterschiedlichen Isoformen wäre durch sogenannte *Rescue*-Versuche möglich, in denen zunächst die Expression eines Podins ausgeschaltet wird und anschließend der Einfluss der künstlich hervorgerufenen Expression einer einzelnen Isoform untersucht wird.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die Ausbildung der kontraktilen Myofibrillen ist ein komplexer Vorgang, der die kontrollierten Wechselwirkungen vieler Proteine bedarf. Um diesen Prozess auf molekularer Ebene aufzuklären, ist es notwendig die Reihenfolge, die Lokalisation sowie die Regulation dieser Interaktionen zu bestimmen. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die zellbiologische und biochemische Charakterisierung der Podin-Proteinfamilie hinsichtlich der Expressionsmuster, Spleißvarianten und Liganden. Bei Säugetieren besteht diese Proteinfamilie aus Synaptopodin, Myopodin und Tritopodin, die über Sequenzabschnitte mit hoher Homologie definiert ist.

Die Analyse der Genstruktur und putativer resultierender Isoformen des Myopodins, aber auch des Tritopodins wies eine wesentlich größere Komplexität auf, als bislang angenommen. Im Fall des Myopodins konnten sechs putative Isoformen identifiziert werden, wobei diese auf alternative Spleißvorgänge im 3'-Bereich, sowie auf einem zusätzlichen Transkriptionsstart beruhen. Um die Expression dieser Proteine untersuchen zu können, wurden verschiedene Antikörper generiert, teils auch mit isoformspezifischen Epitopen. Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene zeigten, dass die kurze Isoform e die Hauptvariante des Skelettmuskels darstellt, während die lange Isoform a in allen glattmuskelreichen Geweben nachweisbar ist. Für Tritopodin konnten bis zu vier putative Isoformen vorhergesagt werden, deren Expression auf Proteinebene auf die quergestreifte Muskulatur beschränkt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass alle drei Podin-Proteine

im adulten Skelettmuskel in der Z-Scheibe lokalisieren. Die Untersuchungen der Expression in verschiedenen differenzierenden Skelettmuskelzelllinien zeigten, dass Myopodin und Tritopodin in sehr frühen Stadien bereits exprimiert werden, wobei Myopodin noch vor sarkomerspezifischem  $\alpha$ -Aktinin nachgewiesen werden konnte. Myopodin und Tritopodin kolokalisieren während der gesamten Differenzierung mit  $\alpha$ -Aktinin entlang des Aktinzytoskeletts, obwohl Tritopodin zumindest in Hskm-Zellen zusätzlich im Bereich der Kernhülle nachgewiesen werden konnte. Die Synaptopodinexpression hingegen konnte ausschließlich in adulten Stadien detektiert werden.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass alle Podin-Proteine mit Filamin C interagieren. Die Bindungsregionen ließen sich seitens der Podine auf einen Bereich, der zwei Sequenzabschnitte mit hohem Homologiegrad in allen Podinen aufweist, eingrenzen. Die Bindungsstelle im Filamin konnte für alle Podin-Proteine auf die Immunglobulindomänen 20-21 eingeeengt werden.

Die Untersuchung der  $\alpha$ -Aktinin Bindungseigenschaften zeigten, dass Myopodin und Tritopodin mehrere voneinander unabhängige  $\alpha$ -Aktininbindungsstellen besitzen. Dieses Bindungsverhalten wurde von Asanuma *et al.* (2005) auch für Synaptopodin beschrieben.

Diese Vielzahl an Bindungen müssen *in vivo* einer exakten Kontrolle unterliegen. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Phosphorylierungsassays zeigten die Phosphorylierung des Myopodins durch die Kinasen CAMKII, PKA und PKC, eventuell ein erster Hinweis darauf, dass diese posttranslationalen Modifikationen durchaus eine Rolle in der Regulation der unterschiedlichen Bindungspartner spielen könnten.

Nachdem bereits die grundlegende Fähigkeit des Myopodins an F-Aktin zu binden bekannt war, konnte hier gezeigt werden, dass Myopodin sogar zwei nicht überlappende F-Aktinbindungsstellen besitzt, die in allen putativen Isoformen vorhanden sind. Die Aktin-Cosedimentationen zeigten, dass die N-terminal gelegene erste Bindungsstelle eine etwas schwächere Affinität als die weiter C-terminal gelegene zweite Bindungsstelle besitzt. Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Myopodin, ähnlich wie  $\alpha$ -Aktinin, Aktin zu dicken Bündeln verknüpft. Die Aktinbündelungsaktivität ist dabei nicht nur auf die zwei vorhandenen Aktinbindungsstellen, sondern auch auf die hier erstmals gezeigte Neigung zur Selbstassoziation des Myopodins zu Dimeren, zurückzuführen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier erzielten Ergebnisse deutliche Hinweise auf eine Funktion der Podine-Proteine als Multiadapterproteine der Z-Scheibe liefern, wobei die ausgesprochen ähnlichen Bindungseigenschaften der einzelnen Podin-Proteine eine komplementäre Funktion implizieren. Weiterhin deutet die sehr frühe Expression von Myopodin und Tritopodin in der Skelettmuskeldifferenzierung darauf hin, dass diese Proteine wichtige Bestandteile der initialen Myofibrillogenese sind.

# Literaturverzeichnis

- Abe, K. and Takeichi, M. (2007). Nmda-receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression. *Neuron*, **53**(3), 387–397.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science Textbooks.
- Albinus, B. (2008). Charakterisierung der Podin-Proteinfamilie mit Hilfe spezifischer Antikörper. Bachelorarbeit, Institut für Zellbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Asanuma, K., Kim, K., Oh, J., Giardino, L., Chabanis, S., Faul, C., Reiser, J., and Mundel, P. (2005). Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest*, **115**(5), 1188–1198.
- Ayscough, K. R. (1998). In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **10**(1), 102–111.
- Bauer, K., Kratzer, M., Otte, M., de Quintana, K. L., Hagmann, J., Arnold, G. J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., and Siess, W. (2000). Human clp36, a pdz-domain and lim-domain protein, binds to alpha-actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. *Blood*, **96**(13), 4236–4245.
- Beall, B. and Chalovich, J. M. (2001). Fesselin, a synaptopodin-like protein, stimulates actin nucleation and polymerization. *Biochemistry*, **40**(47), 14252–14259.
- Beatham, J., Romero, R., Townsend, S. K. M., Hacker, T., van der Ven, P. F. M., and Blanco, G. (2004). Filamin c interacts with the muscular dystrophy ky protein and is abnormally distributed in mouse ky deficient muscle fibres. *Hum Mol Genet*, **13**(22), 2863–2874.
- Beckmann, J. S. and Spencer, M. (2008). Calpain 3, the gatekeeper of proper sarcomere assembly, turnover and maintenance. *Neuromuscul Disord*, **18**(12), 913–921.
- Bellanger, J. M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T. P., and Debant, A. (2000). The rac1- and rhog-specific gef domain of trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol*, **2**(12), 888–892.
- Beqqali, A., Monshouwer-Kloots, J., Monteiro, R., Welling, M., Bakkers, J., Ehler, E., Verkleij, A., Mummery, C., and Passier, R. (2010). Chap is a newly identified z-disc protein essential for heart and skeletal muscle function. *J Cell Sci*, **123**(Pt 7), 1141–1150.

- Berthier, C. and Blaineau, S. (1997). Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. a review. *Biol Cell*, **89**(7), 413–434.
- Blanchard, A., Ohanian, V., and Critchley, D. (1989). The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil*, **10**(4), 280–289.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Burridge, K. and Feramisco, J. R. (1981). Non-muscle alpha actinins are calcium-sensitive actin-binding proteins. *Nature*, **294**(5841), 565–567.
- Burtnick, L. D., Urosev, D., Irobi, E., Narayan, K., and Robinson, R. C. (2004). Structure of the n-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and f-actin. *EMBO J*, **23**(14), 2713–2722.
- Casella, J. F. and Torres, M. A. (1994). Interaction of capping protein with actin. the nh2-terminal domains of the alpha 1 and beta subunits are not required for actin capping, and alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers bind differentially to actin. *J Biol Chem*, **269**(9), 6992–6998.
- Castresana, J. and Saraste, M. (1995). Does vav bind to f-actin through a ch domain? *FEBS Lett*, **374**(2), 149–151.
- Chesarone, M. A., DuPage, A. G., and Goode, B. L. (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**(1), 62–74.
- Chi, R. J., Olenych, S. G., Kim, K., and Keller, T. C. S. (2005). Smooth muscle alpha-actinin interaction with smitin. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**(7), 1470–1482.
- Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C., and Gregorio, C. C. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 637–706.
- Clontech (2000). *Yeast Protocols Handbook*. Clontech Laboratories, Palo Alto.
- Cohen, N., Kudryashova, E., Kramerova, I., Anderson, L. V. B., Beckmann, J. S., Busby, K., and Spencer, M. J. (2006). Identification of putative in vivo substrates of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice. *Proteomics*, **6**(22), 6075–6084.
- Crawford, A. W., Michelsen, J. W., and Beckerle, M. C. (1992). An interaction between zyxin and alpha-actinin. *J Cell Biol*, **116**(6), 1381–1393.
- Davison, M. D. and Critchley, D. R. (1988). alpha-actinins and the dmd protein contain spectrin-like repeats. *Cell*, **52**(2), 159–160.
- de Ganck, A., Corte, V. D., Staes, A., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., and Gettemans, J. (2008). Multiple isoforms of the tumor suppressor myopodin are simultaneously transcribed in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **370**(2), 269–273.

- Deller, T., Merten, T., Roth, S. U., Mundel, P., and Frotscher, M. (2000a). Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J Comp Neurol*, **418**(2), 164–181.
- Deller, T., Mundel, P., and Frotscher, M. (2000b). Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus*, **10**(5), 569–581.
- Deller, T., Korte, M., Chabanis, S., Drakew, A., Schwegler, H., Stefani, G. G., Zuniga, A., Schwarz, K., Bonhoeffer, T., Zeller, R., Frotscher, M., and Mundel, P. (2003). Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(18), 10494–10499.
- Djinovic-Carugo, K., Young, P., Gautel, M., and Saraste, M. (1999). Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell*, **98**(4), 537–546.
- Dominguez, R. (2009). Actin filament nucleation and elongation factors—structure-function relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **44**(6), 351–366.
- dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., and Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, **83**(2), 433–473.
- Ehler, E., Rothen, B. M., Hämmerle, S. P., Komiyama, M., and Perriard, J. C. (1999). Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of z-disk, m-line and the thick filaments. *J Cell Sci*, **112** ( Pt 10), 1529–1539.
- Fanin, M., Nascimbeni, A. C., Fulizio, L., Trevisan, C. P., Meznaric-Petrusa, M., and Angelini, C. (2003). Loss of calpain-3 autocatalytic activity in lgmd2a patients with normal protein expression. *Am J Pathol*, **163**(5), 1929–1936.
- Fanning, A. S. and Anderson, J. M. (1996). Protein-protein interactions: PdZ domain networks. *Curr Biol*, **6**(11), 1385–1388.
- Faul, C., Dhume, A., Schechter, A. D., and Mundel, P. (2007). Protein kinase a, ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase ii, and calcineurin regulate the intracellular trafficking of myopodin between the z-disc and the nucleus of cardiac myocytes. *Mol Cell Biol*, **27**(23), 8215–8227.
- Faul, C., Donnelly, M., Merscher-Gomez, S., Chang, Y. H., Franz, S., Delfgaauw, J., Chang, J.-M., Choi, H. Y., Campbell, K. N., Kim, K., Reiser, J., and Mundel, P. (2008). The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine a. *Nat Med*, **14**(9), 931–938.
- Faulkner, G., Pallavicini, A., Formentin, E., Comelli, A., Ievolella, C., Trevisan, S., Bortoletto, G., Scannapieco, P., Salamon, M., Mouly, V., Valle, G., and Lanfranchi, G. (1999). Zasp: a new z-band alternatively spliced pdz-motif protein. *J Cell Biol*, **146**(2), 465–475.
- Faulkner, G., Pallavicini, A., Comelli, A., Salamon, M., Bortoletto, G., Ievolella, C., Trevisan, S., Kojic', S., Vecchia, F. D., Laveder, P., Valle, G., and Lanfranchi, G. (2000). Fatz, a filamin-, actinin-, and telethonin-binding protein of the z-disc of skeletal muscle. *J Biol Chem*, **275**(52), 41234–41242.



- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**(6230), 245–246.
- Fraley, T. S., Tran, T. C., Corgan, A. M., Nash, C. A., Hao, J., Critchley, D. R., and Greenwood, J. A. (2003). Phosphoinositide binding inhibits alpha-actinin bundling activity. *J Biol Chem*, **278**(26), 24039–24045.
- Frank, D., Kuhn, C., Katus, H. A., and Frey, N. (2006). The sarcomeric z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med*, **84**(6), 446–468.
- Freshney, R. I. (2000). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*. John Wiley and Sons, New York.
- Frey, N. and Olson, E. N. (2002). Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple z-disc proteins. *J Biol Chem*, **277**(16), 13998–14004.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cdnas from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(23), 8998–9002.
- Fürst, D. O., Osborn, M., Nave, R., and Weber, K. (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the z line extends close to the m line. *J Cell Biol*, **106**(5), 1563–1572.
- Fucini, P., Renner, C., Herberhold, C., Noegel, A. A., and Holak, T. A. (1997). The repeating segments of the f-actin cross-linking gelation factor (abp-120) have an immunoglobulin-like fold. *Nat Struct Biol*, **4**(3), 223–230.
- Fyrberg, C., Ketchum, A., Ball, E., and Fyrberg, E. (1998). Characterization of lethal drosophila melanogaster alpha-actinin mutants. *Biochem Genet*, **36**(9-10), 299–310.
- Gautel, M. (2008). The sarcomere and the nucleus: functional links to hypertrophy, atrophy and sarcopenia. *Adv Exp Med Biol*, **642**, 176–191.
- Gläser, S. (2009). Charakterisierung der Interaktion von Filamin C mit Proteinen der Podin-Familie. Diplomarbeit, Institut für Zellbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Gontier, Y., Taivainen, A., Fontao, L., Sonnenberg, A., van der Flier, A., Carpen, O., Faulkner, G., and Borradori, L. (2005). The z-disc proteins myotilin and fatz-1 interact with each other and are connected to the sarcolemma via muscle-specific filamins. *J Cell Sci*, **118**(Pt 16), 3739–3749.
- Gorlin, J. B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J., and Hartwig, J. H. (1990). Human endothelial actin-binding protein (abp-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol*, **111**(3), 1089–1105.
- Guyon, J. R., Kudryashova, E., Potts, A., Dalkilic, I., Brosius, M. A., Thompson, T. G., Beckmann, J. S., Kunkel, L. M., and Spencer, M. J. (2003). Calpain 3 cleaves filamin c and regulates its ability to interact with gamma- and delta-sarcoglycans. *Muscle Nerve*, **28**(4), 472–483.

- Hartwig, J. H. and Stossel, T. P. (1975). Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem*, **250**(14), 5696–5705.
- He, L. and Hannon, G. J. (2004). Micrnas: small rnas with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, **5**(7), 522–531.
- Heikkinen, O. K., Ruskamo, S., Konarev, P. V., Svergun, D. I., Iivanainen, T., Heikkinen, S. M., Permi, P., Koskela, H., Kilpeläinen, I., and Yläanne, J. (2009). Atomic structures of two novel immunoglobulin-like domain pairs in the actin cross-linking protein filamin. *J Biol Chem*, **284**(37), 25450–25458.
- Himmel, M., Ven, P. F. M. V. D., Stöcklein, W., and Fürst, D. O. (2003). The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins. *Biochemistry*, **42**(2), 430–439.
- Hitchcock-DeGregori, S. E. (2008). Tropomyosin: function follows structure. *Adv Exp Med Biol*, **644**, 60–72.
- Holmes, W. B. and Moncman, C. L. (2008). Nebulette interacts with filamin c. *Cell Motil Cytoskeleton*, **65**(2), 130–142.
- Horsley, V. and Pavlath, G. K. (2004). Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs*, **176**(1-3), 67–78.
- Hoshijima, M. (2006). Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**(4), H1313–H1325.
- Huxley, H. and Hanson, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, **173**(4412), 973–976.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of escherichia coli with plasmids. *Gene*, **96**(1), 23–28.
- Ithychanda, S. S., Hsu, D., Li, H., Yan, L., Liu, D. D., Liu, D., Das, M., Plow, E. F., and Qin, J. (2009). Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk. *J Biol Chem*, **284**(50), 35113–35121.
- Jing, L., Liu, L., Yu, Y. P., Dhir, R., Acquafondada, M., Landsittel, D., Cieply, K., Wells, A., and Luo, J.-H. (2004). Expression of myopodin induces suppression of tumor growth and metastasis. *Am J Pathol*, **164**(5), 1799–1806.
- Khaymina, S. S., Kenney, J. M., Schroeter, M. M., and Chalovich, J. M. (2007). Fesselin is a natively unfolded protein. *J Proteome Res*, **6**(9), 3648–3654.
- Kim, T. H., Barrera, L. O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M. A., Richmond, T. A., Wu, Y., Green, R. D., and Ren, B. (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature*, **436**(7052), 876–880.
- Klaavuniemi, T., Kelloniemi, A., and Yläanne, J. (2004). The zasp-like motif in actinin-associated lim protein is required for interaction with the alpha-actinin rod and for targeting to the muscle z-line. *J Biol Chem*, **279**(25), 26402–26410.

- Kolakowski, J., Wrzosek, A., and Dabrowska, R. (2004). Fesselin is a target protein for calmodulin in a calcium-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**(4), 1251–1256.
- Kostyukova, A. S. (2008). Tropomodulin/tropomyosin interactions regulate actin pointed end dynamics. *Adv Exp Med Biol*, **644**, 283–292.
- Kotaka, M., Kostin, S., Ngai, S., Chan, K., Lau, Y., Lee, S. M., Li, H., Ng, E. K., Schaper, J., Tsui, S. K., Fung, K., Lee, C., and Waye, M. M. (2000). Interaction of hclim1, an enigma family protein, with alpha-actinin 2. *J Cell Biochem*, **78**(4), 558–565.
- Kramerova, I., Kudryashova, E., Tidball, J. G., and Spencer, M. J. (2004). Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet*, **13**(13), 1373–1388.
- Kremerskothen, J., Plaas, C., Kindler, S., Frotscher, M., and Barnekow, A. (2005). Synaptopodin, a molecule involved in the formation of the dendritic spine apparatus, is a dual actin/alpha-actinin binding protein. *J Neurochem*, **92**(3), 597–606.
- Krüger, U. (2007). Eigenschaften des Myopodins: Charakterisierung der Spleißvarianten und der Expression im Prostatagewebe. Diplomarbeit, Institut für Zellbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Lad, Y., Kiema, T., Jiang, P., Pentikäinen, O. T., Coles, C. H., Campbell, I. D., Calderwood, D. A., and Yläanne, J. (2007). Structure of three tandem filamin domains reveals auto-inhibition of ligand binding. *EMBO J*, **26**(17), 3993–4004.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(259), 680–685.
- Lassar, A. B., Skapek, S. X., and Novitch, B. (1994). Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr Opin Cell Biol*, **6**(6), 788–794.
- Lazarides, E. and Burridge, K. (1975). Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell*, **6**(3), 289–298.
- Leinweber, B. D., Fredricksen, R. S., Hoffman, D. R., and Chalovich, J. M. (1999). Fesselin: a novel synaptopodin-like actin binding protein from muscle tissue. *J Muscle Res Cell Motil*, **20**(5-6), 539–545.
- Lin, F., Yu, Y. P., Woods, J., Cieply, K., Gooding, B., Finkelstein, P., Dhir, R., Krill, D., Becich, M. J., Michalopoulos, G., Finkelstein, S., and Luo, J. H. (2001). Myopodin, a synaptopodin homologue, is frequently deleted in invasive prostate cancers. *Am J Pathol*, **159**(5), 1603–1612.
- Linnemann, A. (2005). Myopodin: Eine Analyse der Expressionsmuster, Spleissvarianten und Liganden. Diplomarbeit, Institut für Zellbiologie der Universität Potsdam.
- Linnemann, A., van der Ven, P. F. M., Vakeel, P., Albinus, B., Simonis, D., Bendas, G., Schenk, J. A., Micheel, B., Kley, R. A., and Fürst, D. O. (2010). The sarcomeric Z-disc component myopodin is a multiadapter protein that interacts with filamin and alpha-actinin. *Eur J Cell Biol*.

- Littlefield, R. S. and Fowler, V. M. (2008). Thin filament length regulation in striated muscle sarcomeres: pointed-end dynamics go beyond a nebulin ruler. *Semin Cell Dev Biol*, **19**(6), 511–519.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. E. (1999). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman & Co.
- Louis, H. A., Pino, J. D., Schmeichel, K. L., Pomiès, P., and Beckerle, M. C. (1997). Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem*, **272**(43), 27484–27491.
- Manisastry, S. M., Zaal, K. J. M., and Horowitz, R. (2009). Myofibril assembly visualized by imaging n-rap, alpha-actinin, and actin in living cardiomyocytes. *Exp Cell Res*, **315**(12), 2126–2139.
- Maruyama, K., Murakami, F., and Ohashi, K. (1977). Connectin, an elastic protein of muscle. comparative biochemistry. *J Biochem*, **82**(2), 339–345.
- Miroux, B. and Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, **260**(3), 289–298.
- Mologni, L., Salmikangas, P., Fougèrouse, F., Beckmann, J. S., and Carpén, O. (2001). Developmental expression of myotilin, a gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 1a. *Mech Dev*, **103**(1-2), 121–125.
- Moza, M., Mologni, L., Trokovic, R., Faulkner, G., Partanen, J., and Carpén, O. (2007). Targeted deletion of the muscular dystrophy gene myotilin does not perturb muscle structure or function in mice. *Mol Cell Biol*, **27**(1), 244–252.
- Mundel, P., Heid, H. W., Mundel, T. M., Krüger, M., Reiser, J., and Kriz, W. (1997). Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol*, **139**(1), 193–204.
- Nave, R., Fürst, D. O., and Weber, K. (1990). Interaction of alpha-actinin and nebulin in vitro. support for the existence of a fourth filament system in skeletal muscle. *FEBS Lett*, **269**(1), 163–166.
- Neuhaus, J. M., Wanger, M., Keiser, T., and Wegner, A. (1983). Treadmilling of actin. *J Muscle Res Cell Motil*, **4**(5), 507–527.
- Noegel, A., Witke, W., and Schleicher, M. (1987). Calcium-sensitive non-muscle alpha-actinin contains ef-hand structures and highly conserved regions. *FEBS Lett*, **221**(2), 391–396.
- Nourry, C., Grant, S. G. N., and Borg, J.-P. (2003). Pdz domain proteins: plug and play! *Sci STKE*, **2003**(179), RE7.
- Nowak, M. (2008). Suche nach neuen Bindungspartnern des Z-Banden-Proteins Filamin C. Diplomarbeit, Institut für Zellbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Obermann, W. M., Gautel, M., Steiner, F., Van der Ven, P. F., Weber, K., and Fürst, D. O. (1996). The structure of the sarcomeric M-band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kd carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.*, **134**(6), 1441–1453.
- Obermann, W. M., van der Ven, P. F., Steiner, F., Weber, K., and Fürst, D. O. (1998). Mapping of a myosin-binding domain and a regulatory phosphorylation site in m-protein, a structural protein of the sarcomeric m band. *Mol Biol Cell*, **9**(4), 829–840.
- Ohta, Y. and Hartwig, J. H. (1995). Actin filament cross-linking by chicken gizzard filamin is regulated by phosphorylation in vitro. *Biochemistry*, **34**(20), 6745–6754.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. H., and Stossel, T. P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(5), 2122–2128.
- Ohtsuka, H., Yajima, H., Maruyama, K., and Kimura, S. (1997). The n-terminal z repeat 5 of connectin/titin binds to the c-terminal region of alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun*, **235**(1), 1–3.
- Otey, C. A., Pavalko, F. M., and Burridge, K. (1990). An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol*, **111**(2), 721–729.
- Otey, C. A., Rachlin, A., Moza, M., Arneman, D., and Carpen, O. (2005). The palladin/myotilin/myopalladin family of actin-associated scaffolds. *Int Rev Cytol*, **246**, 31–58.
- Otterbein, L. R., Graceffa, P., and Dominguez, R. (2001). The crystal structure of uncomplexed actin in the adp state. *Science*, **293**(5530), 708–711.
- Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falck, S., and Lappalainen, P. (2004). Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol*, **14**(7), 386–394.
- Pacholsky, D. (2003). *Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte während der Muskelentwicklung*. Dissertation, Universität Potsdam.
- Papa, I., Astier, C., Kwiatek, O., Raynaud, F., Bonnal, C., Lebart, M. C., Roustan, C., and Benyamin, Y. (1999). Alpha actinin-capz, an anchoring complex for thin filaments in z-line. *J Muscle Res Cell Motil*, **20**(2), 187–197.
- Perriard, J.-C., Hirschy, A., and Ehler, E. (2003). Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med*, **13**(1), 30–38.
- Pham, M. and Chalovich, J. M. (2006). Smooth muscle alpha-actinin binds tightly to fesselin and attenuates its activity toward actin polymerization. *J Muscle Res Cell Motil*, **27**(1), 45–51.
- Pollard, T. (1999). *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins*. Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**(4), 453–465.

- Pollard, T. D., Almo, S., Quirk, S., Vinson, V., and Lattman, E. E. (1994). Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 207–249.
- Popowicz, G. M., Schleicher, M., Noegel, A. A., and Holak, T. A. (2006). Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci*, **31**(7), 411–419.
- Pudas, R., Kiema, T.-R., Butler, P. J. G., Stewart, M., and Ylännä, J. (2005). Structural basis for vertebrate filamin dimerization. *Structure*, **13**(1), 111–119.
- Raynaud, F., Fabrice, R., Jond-Necand, C., Carole, J.-N., Marcilhac, A., Anne, M., Fürst, D., Dieter, F., Benyamin, Y., and Yves, B. (2006). Calpain 1-gamma filamin interaction in muscle cells: a possible in situ regulation by pkc-alpha. *Int J Biochem Cell Biol*, **38**(3), 404–413.
- Rieck, S. (2010). Charakterisierung der familie der podin-proteine. Diplomarbeit, Institut für Zellbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Rottner, K., Krause, M., Gimona, M., Small, J. V., and Wehland, J. (2001). Zyxin is not colocalized with vasodilator-stimulated phosphoprotein (vasp) at lamellipodial tips and exhibits different dynamics to vinculin, paxillin, and vasp in focal adhesions. *Mol Biol Cell*, **12**(10), 3103–3113.
- Salmikangas, P., Mykkänen, O. M., Grönholm, M., Heiska, L., Kere, J., and Carpén, O. (1999). Myotilin, a novel sarcomeric protein with two ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, **8**(7), 1329–1336.
- Salmikangas, P., van der Ven, P. F. M., Lalowski, M., Taivainen, A., Zhao, F., Suila, H., Schröder, R., Lappalainen, P., Fürst, D. O., and Carpén, O. (2003). Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1a (lgmd1a) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum Mol Genet*, **12**(2), 189–203.
- Sanchez-Carbayo, M., Schwarz, K., Charytonowicz, E., Cordon-Cardo, C., and Mundel, P. (2003). Tumor suppressor role for myopodin in bladder cancer: loss of nuclear expression of myopodin is cell-cycle dependent and predicts clinical outcome. *Oncogene*, **22**(34), 5298–5305.
- Sanger, J. W., Chowrashi, P., Shaner, N. C., Spalhoff, S., Wang, J., Freeman, N. L., and Sanger, J. M. (2002). Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin Orthop Relat Res*, **1**(403 Suppl), S153–S162.
- Sanger, J. W., Kang, S., Siebrands, C. C., Freeman, N., Du, A., Wang, J., Stout, A. L., and Sanger, J. M. (2005). How to build a myofibril. *J Muscle Res Cell Motil*, **26**(6-8), 343–354.
- Saras, J. and Heldin, C. H. (1996). Pdz domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci*, **21**(12), 455–458.
- Schlensog, M. D., Gronewold, T. M. A., Tewes, M., Famulok, M., and Quandt, E. (2004). A love-wave biosensor using nucleic acids as ligands. *Sensors & Actuators - Part B - Chemical Sensors*, **101**, 308–315.
- Schroeter, M. and Chalovich, J. M. (2004). Ca<sup>2+</sup>-calmodulin regulates fesselin-induced actin polymerization. *Biochemistry*, **43**(43), 13875–13882.

- Schroeter, M. M. and Chalovich, J. M. (2005). Fesselin binds to actin and myosin and inhibits actin-activated atpase activity. *J Muscle Res Cell Motil*, **26**(4-5), 183–189.
- Schroeter, M. M., Beall, B., Heid, H. W., and Chalovich, J. M. (2008a). The actin binding protein, fesselin, is a member of the synaptopodin family. *Biochem Biophys Res Commun*, **371**(3), 582–586.
- Schroeter, M. M., Beall, B., Heid, H. W., and Chalovich, J. M. (2008b). In vitro characterization of native mammalian smooth-muscle protein synaptopodin 2. *Biosci Rep*, **28**(4), 195–203.
- Sellers, J. R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, **1496**(1), 3–22.
- Sjöblom, B., Salmazo, A., and Djinovic-Carugo, K. (2008). Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci*, **65**(17), 2688–2701.
- Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y., and Suzuki, K. (1989). Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. specific expression of the mrna in skeletal muscle. *J Biol Chem*, **264**(33), 20106–20111.
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O., and Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, **83**(3), 423–432.
- Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M., and Shapiro, S. S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**(2), 138–145.
- Takada, F., Woude, D. L. V., Tong, H. Q., Thompson, T. G., Watkins, S. C., Kunkel, L. M., and Beggs, A. H. (2001). Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle z lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(4), 1595–1600.
- Taveau, M., Bourg, N., Sillon, G., Roudaut, C., Bartoli, M., and Richard, I. (2003). Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol*, **23**(24), 9127–9135.
- Thompson, T. G., Chan, Y. M., Hack, A. A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H. G., McNally, E. M., Watkins, S., and Kunkel, L. M. (2000). Filamin 2 (fln2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol*, **148**(1), 115–126.
- Tigges, U., Koch, B., Wissing, J., Jockusch, B. M., and Ziegler, W. H. (2003). The f-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin a is a ligand and in vivo substrate for protein kinase c alpha. *J Biol Chem*, **278**(26), 23561–23569.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(9), 4350–4354.
- Travé, G., Pastore, A., Hyvönen, M., and Saraste, M. (1995). The c-terminal domain of alpha-spectrin is structurally related to calmodulin. *Eur J Biochem*, **227**(1-2), 35–42.

- Troys, M. V., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (1999). Structural modules in actin-binding proteins: towards a new classification. *Biochim Biophys Acta*, **1448**(3), 323–348.
- Tseng, Y., An, K. M., Esue, O., and Wirtz, D. (2004). The bimodal role of filamin in controlling the architecture and mechanics of f-actin networks. *J Biol Chem*, **279**(3), 1819–1826.
- Tskhovrebova, L. and Trinick, J. (2003). Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**(9), 679–689.
- Vakeel, P. (2006). Biochemical and cellular characterization of filamin binding proteins in cross striated muscle. Dissertation, Institut für Zellbiologie der Universität Potsdam.
- Vallenius, T., Luukko, K., and Mäkelä, T. P. (2000). Clp-36 pdz-lim protein associates with nonmuscle alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4. *J Biol Chem*, **275**(15), 11100–11105.
- van der Flier, A. and Sonnenberg, A. (2001). Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta*, **1538**(2-3), 99–117.
- van der Ven, P. F., Obermann, W. M., Lemke, B., Gautel, M., Weber, K., and Fürst, D. O. (2000). Characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of gamma-filamin/abp-1 in sarcomeric z-disc formation. *Cell Motil Cytoskeleton*, **45**(2), 149–162.
- Van der Ven, P. F., Obermann, W. M., Lemke, B., Gautel, M., Weber, K., and Fürst, D. O. (2000). Characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of  $\gamma$ -filamin/ABP-L in sarcomeric Z-disc formation. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **45**(2), 149–162.
- van der Ven, P. F., Wiesner, S., Salmikangas, P., Auerbach, D., Himmel, M., Kempa, S., Hayess, K., Pacholsky, D., Taivainen, A., Schröder, R., Carpén, O., and Fürst, D. O. (2000). Indications for a novel muscular dystrophy pathway. gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *J Cell Biol*, **151**(2), 235–248.
- van der Ven, P. F. M., Ehler, E., Vakeel, P., Eulitz, S., Schenk, J. A., Milting, H., Micheel, B., and Fürst, D. O. (2006). Unusual splicing events result in distinct xin isoforms that associate differentially with filamin c and mena/vasp. *Exp Cell Res*, **312**(11), 2154–2167.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol*, **126**(4), 783–802.
- Vinkemeier, U., Obermann, W., Weber, K., and Fürst, D. O. (1993). The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric m band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *J Cell Sci*, **106** ( Pt 1), 319–330.
- Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., and Cooper, J. A. (1993). Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell*, **74**(1), 205–214.



- von Nandelstadh, P., Grönholm, M., Moza, M., Lamberg, A., Savilahti, H., and Carpén, O. (2005). Actin-organising properties of the muscular dystrophy protein myotilin. *Exp Cell Res*, **310**(1), 131–139.
- Wachsstock, D. H., Wilkins, J. A., and Lin, S. (1987). Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun*, **146**(2), 554–560.
- Wakelam, M. J. (1985). The fusion of myoblasts. *Biochem J*, **228**(1), 1–12.
- Wallach, D., Davies, P. J., and Pastan, I. (1978). Cyclic amp-dependent phosphorylation of filamin in mammalian smooth muscle. *J Biol Chem*, **253**(13), 4739–4745.
- Wang, K., Ash, J. F., and Singer, S. J. (1975). Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**(11), 4483–4486.
- Wang, K., McClure, J., and Tu, A. (1979). Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(8), 3698–3702.
- Wang, K., McCarter, R., Wright, J., Beverly, J., and Ramirez-Mitchell, R. (1991). Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: a test of the segmental extension model of resting tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(16), 7101–7105.
- Wang, X. (2008). mirdb: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*, **14**(6), 1012–1017.
- Wang, X. and Naqa, I. M. E. (2008). Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics*, **24**(3), 325–332.
- Wanger, M., Keiser, T., Neuhaus, J. M., and Wegner, A. (1985). The actin treadmill. *Can J Biochem Cell Biol*, **63**(6), 414–421.
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, **108**(1), 139–150.
- Wehland, J., Willingham, M. C., and Sandoval, I. V. (1983). A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of  $\alpha$ -tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization in vitro, and microtubule polymerization and organization in vivo. *J. Cell Biol.*, **97**(5), 1467–1475.
- Weins, A., Schwarz, K., Faul, C., Barisoni, L., Linke, W. A., and Mundel, P. (2001). Differentiation- and stress-dependent nuclear cytoplasmic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein. *J Cell Biol*, **155**(3), 393–404.
- Wienholds, E. and Plasterk, R. H. A. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*, **579**(26), 5911–5922.
- Winder, S. J. and Ayscough, K. R. (2005). Actin-binding proteins. *J Cell Sci*, **118**(Pt 4), 651–654.
- Xia, H., Winokur, S. T., Kuo, W. L., Altherr, M. R., and Bredt, D. S. (1997). Actinin-associated lim protein: identification of a domain interaction between pdz and spectrin-like repeat motifs. *J Cell Biol*, **139**(2), 507–515.

- Xie, Z., Xu, W., Davie, E. W., and Chung, D. W. (1998). Molecular cloning of human abpl, an actin-binding protein homologue. *Biochem Biophys Res Commun*, **251**(3), 914–919.
- Yamaguchi, M., Yamano, S., Muguruma, M., and Robson, R. M. (1988). Polarity and length of actin filaments at the fascia adherens of the cardiac intercalated disk. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, **100**(3), 235–244.
- Ylänne, J., Scheffzek, K., Young, P., and Saraste, M. (2001). Crystal structure of the alpha-actinin rod: Four spectrin repeats forming a tight dimer. *Cell Mol Biol Lett*, **6**(2), 234.
- Young, P. and Gautel, M. (2000). The interaction of titin and alpha-actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism. *EMBO J*, **19**(23), 6331–6340.
- Yu, Y. P. and Luo, J.-H. (2006). Myopodin-mediated suppression of prostate cancer cell migration involves interaction with zyxin. *Cancer Res*, **66**(15), 7414–7419.
- Zhang, M., Liu, J., Cheng, A., Deyoung, S. M., and Saltiel, A. R. (2007). Identification of cap as a costameric protein that interacts with filamin c. *Mol Biol Cell*, **18**(12), 4731–4740.
- Zieseniss, A., Terasaki, A. G., and Gregorio, C. C. (2008). Lasp-2 expression, localization, and ligand interactions: a new z-disc scaffolding protein. *Cell Motil Cytoskeleton*, **65**(1), 59–72.

# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
ABP	<i>actin binding protein</i> ; Aktin bindendes Protein
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complenetary DNA</i> ; komplementäre DNA
CoIP	Coimmunpräzipitation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOB	<i>drop out base</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; grün fluoreszierendes Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> ; Hepatozyten Wachstumsfaktor
His6	Hexa-Histidin
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HS	<i>Horse Herum</i> ; Pferdeserum
Hskm	humaner Skelettmuskel
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ktr	Kontrolle
M	mol/l
mAB	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted-laser-desorption/ionization time-of-flight</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NEAA	<i>Non Essential Amino Acids</i> ; nicht-essentielle Aminosäuren
NLS	<i>nuclear localization signal</i> ; Kernlokalisationssequenz
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PRR	Prolin-reiche Region
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SkM	Skelettmuskel
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXR	Texas-Rot
U	<i>Unit</i>
ÜNK	Übernachtkultur
UTR	<i>untranslated region</i> ; untranslatierte Region
WB	Westernblot
WBO	Westernblot Overlay
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-indoxyl- $\beta$ -D-galaktosid

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Aktinfilamente entstehen durch Polymerisation . . . . .	4
1.2	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Skelettmuskels . . . . .	6
1.3	Schematische Darstellung eines Skelettmuskels . . . . .	7
1.4	Molekularer Aufbau des Sarkomers . . . . .	8
1.5	Prämyofibrillenmodell nach Sanger . . . . .	10
1.6	Schematische Darstellung der Struktur des $\alpha$ -Aktinins . . . . .	12
1.7	Filamin C und seine Bindungspartner . . . . .	14
1.8	Übersicht über den Aufbau der glatten Muskulatur . . . . .	16
2.1	Modell zur Errechnung kinetischer Bindungskonstanten aus einem SAW-Experiment	50
3.1	Organisation des humanen Myopodin-Gens ( <i>SYNPO2</i> ) und daraus resultierende Spleißvarianten bzw. Isoformen . . . . .	61
3.2	Expressionsanalyse humaner Myopodinvarianten auf mRNA-Ebene . . . . .	64
3.3	5'-RACE . . . . .	66
3.4	Epitope der Myopodinantikörper . . . . .	68
3.5	Expressionsanalyse humaner Myopodinisformen auf Proteinebene . . . . .	71
3.6	Expressionsanalyse muriner Myopodinvarianten auf Proteinebene . . . . .	73
3.7	Expressionsanalyse von Myopodinisformen in Rattengewebe auf Proteinebene .	76
3.8	Organisation des humanen Tritopodin-Gens ( <i>SYNPO2L</i> ) und daraus resultieren- de Spleißvarianten bzw. Isoformen . . . . .	78
3.9	Expressionsanalyse muriner Tritopodinvarianten auf mRNA-Ebene . . . . .	80
3.10	Epitope der Tritopodinantikörper . . . . .	81
3.11	Expressionsanalyse humanen und murinen Tritopodins auf Proteinebene . . . . .	82
3.12	Expressionsanalyse verschiedener Myopodinvarianten in differenzierenden Ske- lettmuskelzellen auf mRNA-Ebene . . . . .	84
3.13	Expressionsanalyse von Myopodin in differenzierenden humanen Skelettmuskel- zellen auf Proteinebene . . . . .	86
3.14	Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in Hskm-Zellen früher Differenzierungsstadien . . . . .	87

3.15 Statistik zur Expression von Myopodin und $\alpha$ -Aktinin in undifferenzierten Hskm-Zellen . . . . .	88
3.16 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in Hskm-Zellen später Differenzierungsstadien . . . . .	90
3.17 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung einer Hskm-Myotube . . . . .	91
3.18 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in C2C12-Zellen früher Differenzierungsstadien . . . . .	93
3.19 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in C2C12-Zellen später Differenzierungsstadien . . . . .	94
3.20 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in H2k-Zellen später Differenzierungsstadien . . . . .	95
3.21 Expressionsanalyse von Tritopodin in differenzierenden Skelettmuskelzellen auf mRNA-Ebene . . . . .	97
3.22 Schematische Darstellung aller putativer muriner Tritopodinisoformentypen . . . . .	98
3.23 Expressionsanalyse von Tritopodin in differenzierenden Skelettmuskelzellen auf Proteinebene . . . . .	99
3.24 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin in Hskm-Zellen früher Differenzierungsstadien . . . . .	101
3.25 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin in Hskm-Zellen später Differenzierungsstadien . . . . .	102
3.26 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin in differenzierenden C2C12-Zellen . . . . .	104
3.27 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin und Tritopodin in differenzierten C2C12-Zellen . . . . .	106
3.28 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin und $\alpha$ -Aktinin in adultem humanen Skelettmuskel . . . . .	108
3.29 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin und Filamin in adultem humanen Skelettmuskel . . . . .	109
3.30 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Synaptopodin und Myopodin in adultem humanen Skelettmuskel . . . . .	110
3.31 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin und Tritopodin in adultem humanen Skelettmuskel . . . . .	111
3.32 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Tritopodin und Filamin in adultem humanen Skelettmuskel . . . . .	112
3.33 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in adultem murinen Herzmuskelzellen . . . . .	114
3.34 Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in adultem humanen Prostatagewebe . . . . .	116

3.35	Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodinisoformen in adultem humanen Prostatagewebe . . . .	117
3.36	Konfokale Aufnahme der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Myopodin in murinem Uterusgewebe . . . . .	118
3.37	Bindungsstudie zur Bestätigung der Interaktion von Myopodin mit Filamin C . .	122
3.38	Bindungsstudie zur Untersuchung der Interaktion von Myopodin mit Filamin A .	124
3.39	Bindungsstudie zur Einengung der Filaminbindungsstelle im Myopodin . . . . .	125
3.40	Nachweis der Bindung von Tritopodin mit Filamin C . . . . .	127
3.41	Nachweis der Bindung von Synaptopodin mit Filamin C . . . . .	128
3.42	Bindungsstudien zur Einengung der $\alpha$ -Aktinin-Bindungsstelle im Myopodin . . .	130
3.43	Zusammenfassung der Coimmunpräzipitationen verschiedener Myopodinfragmente mit $\alpha$ -Aktinin2 . . . . .	131
3.44	Bindungsstudien zur Charakterisierung der Myopodin- $\alpha$ -Aktinin2-Interaktion . .	133
3.45	Bindungsstudien der $\alpha$ -Aktinin2-Tritopodin-Interaktion . . . . .	135
3.46	Zusammenfassung der Bindungsstudien verschiedener Tritopodinfragmente mit $\alpha$ -Aktinin2 . . . . .	136
3.47	Transiente Transfektionen verschiedener Myopodinfragmente in A7r5-Zellen . . .	138
3.48	Transiente Transfektionen verschiedener Synaptopodinfragmente in A7r5-Zellen .	140
3.49	Transiente Transfektionen verschiedener Tritopodinfragmente in A7r5-Zellen . . .	141
3.50	Phosphorylierung von Myopodin . . . . .	142
3.51	Aktin <i>high speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 405-916 . . . . .	146
3.52	Aktin <i>high speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 405-663 . . . . .	147
3.53	Aktin <i>high speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 396-533 . . . . .	148
3.54	Aktin <i>high speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 635-916 . . . . .	149
3.55	Aktin <i>high speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 664-916 . . . . .	150
3.56	Aktin <i>high speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 803-916 . . . . .	151
3.57	Aktin <i>low speed Cosedimentation</i> mit $\alpha$ -Aktinin . . . . .	153
3.58	Aktin <i>low speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 405-916 . . . . .	155
3.59	Aktin <i>low speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 405-663 . . . . .	156
3.60	Aktin <i>low speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 635-916 . . . . .	157
3.61	Aktin <i>low speed Cosedimentation</i> mit Myopodinfragment 664-916 . . . . .	158
3.62	TEM-Aufnahmen zur Analyse der Aktinbündelungsaktivität von Myopodin . . .	160
3.63	Zusammenfassung der Aktinbindungs- und -bündelungseigenschaften von Myopodin	161
3.64	Myopodin bildet <i>in vitro</i> Dimere . . . . .	163
4.1	Zusammenfassung der Interaktionspartner sowie ihrer Bindungsstellen im Myopodin	184
B.1	Organisation des humanen Synaptopodin-Gens ( <i>SYNPO</i> ) und daraus resultierende Spleißvarianten bzw. Isoformen . . . . .	XXII
B.2	<i>Affymetrix All Exon Chip</i> Analyse . . . . .	XXII
B.3	<i>Alignment</i> der Homologieblöcke der Podin Proteine . . . . .	XXIII

---

B.4	<i>In situ</i> -Hybridisierungen humaner Prostata . . . . .	XXIV
C.1	cDNA-Sequenz der Myopodinisiform b FN422000 . . . . .	XXIX
C.2	cDNA-Sequenz der murinen Tritopodinisiform d . . . . .	XXXI
D.1	Vektorkarte pET23aEEF . . . . .	XXXIII
D.2	Vektorkarte pET23aT7 . . . . .	XXXIV
D.3	Vektorkarte pLexPd . . . . .	XXXV
D.4	Vektorkarte pACT2 . . . . .	XXXVI
D.5	Vektorkarte pMypG . . . . .	XXXVII
D.6	Vektorkarte pAMC . . . . .	XXXVIII
D.7	Vektorkarte pGEM-T . . . . .	XXXIX



# Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht zu verschiedenen Klassen von Aktin-bindenden Proteinen, sowie deren Funktionen	5
2.1	Kulturmedien	25
2.2	Antibiotika	26
2.3	Eigenschaften der verwendeten Plasmide	27
2.4	primäre Antikörper	28
2.5	sekundäre Antikörper	29
2.6	Reaktionsansatz für Reverse Transkription	30
2.7	Temperaturprofil für PCR	31
2.8	Proteinkinasen	46
2.9	Immobilisierung von Proteinen auf der Sensoroberfläche	49
2.10	Zellkulturmedien	54
2.11	Epifluoreszenzmikroskope	58
2.12	konfokale Laserscanningmikroskopie	59
3.1	Zusammenfassung der Immunfluoreszenzstudien zur Lokalisation der Podine in humanen Skelettmuskelgewebe	113
3.2	Bindungsstudien von Myopodin an Filamin C	120
3.3	Kinetische Daten der Bindung von Myopodin an Filamin C	123
3.4	Zusammenfassung der CoIPs von den Podin-Proteinen mit Filamin C	129
3.5	Kinetische Daten der Bindung von Myopodin an $\alpha$ -Aktinin	132
4.1	Zusammenfassung der Expressionsdaten der Myopodin- und Tritopodinisformen	170
C.1	Klonierungsprimer für Myopodinkonstrukte	XXVI
C.2	Klonierungsprimer für Tritopodinkonstrukte	XXVI
C.3	Klonierungsprimer für $\alpha$ -Aktininkonstrukte	XXVII
C.4	Primer für 5'-RACE	XXVII
C.5	RT-PCR-Primer zur Amplifikation humanen (h) und murinen (m) Myopodin	XXVII
C.6	RT-PCR-Primer zur Amplifikation humanen (h) und murinen (m) Tritopodins	XXVIII
C.7	Sequenzen der Primer für Ladekontrollen	XXVIII

Anhang B

Ergänzende Abbildungen

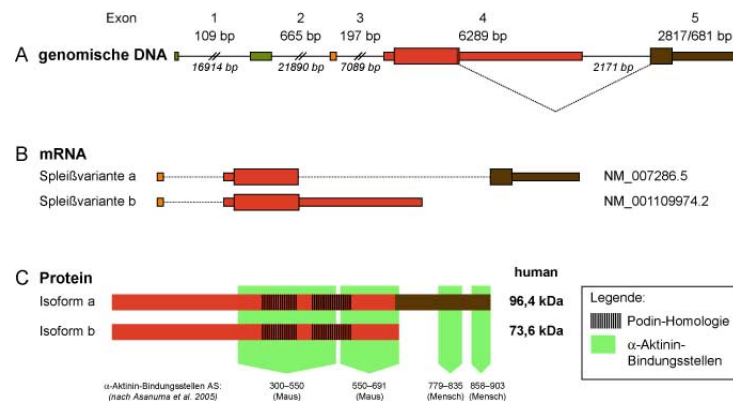


Abbildung B.1: **Organisation des humanen Synaptopodin-Gens (*SYNPO*) und daraus resultierende Spleißvarianten bzw. Isoformen.** A: Exon-Intron-Struktur der genomischen DNA. Die Exons sind als farbgefüllte Balken dargestellt, wobei translatierte Bereiche dicker veranschaulicht sind als nicht-translatierte. Die Introns sind als Linien gezeigt. Die Zahlen ober- bzw. unterhalb zeigen die Länge der Exons, bzw. Introns. Alternative Spleißvorgänge sind durch punktierte Linien verdeutlicht. B: mRNA-Varianten mit entsprechenden Referenzsequenzen, die aus den oben gezeigten Spleißvorgängen, sowie aus dem alternativen Transkriptionsstart resultieren. C: Protein-Isoformen mit den aus der Aminosäurezusammensetzung berechneten molekularen Massen für humanes Synaptopodin. Hervorgehoben sind die zwei homologen Regionen, die in allen Podinen zu identifizieren sind, sowie die von Asanuma *et al.* (2005) ermittelten  $\alpha$ -Aktininbindungsstellen.

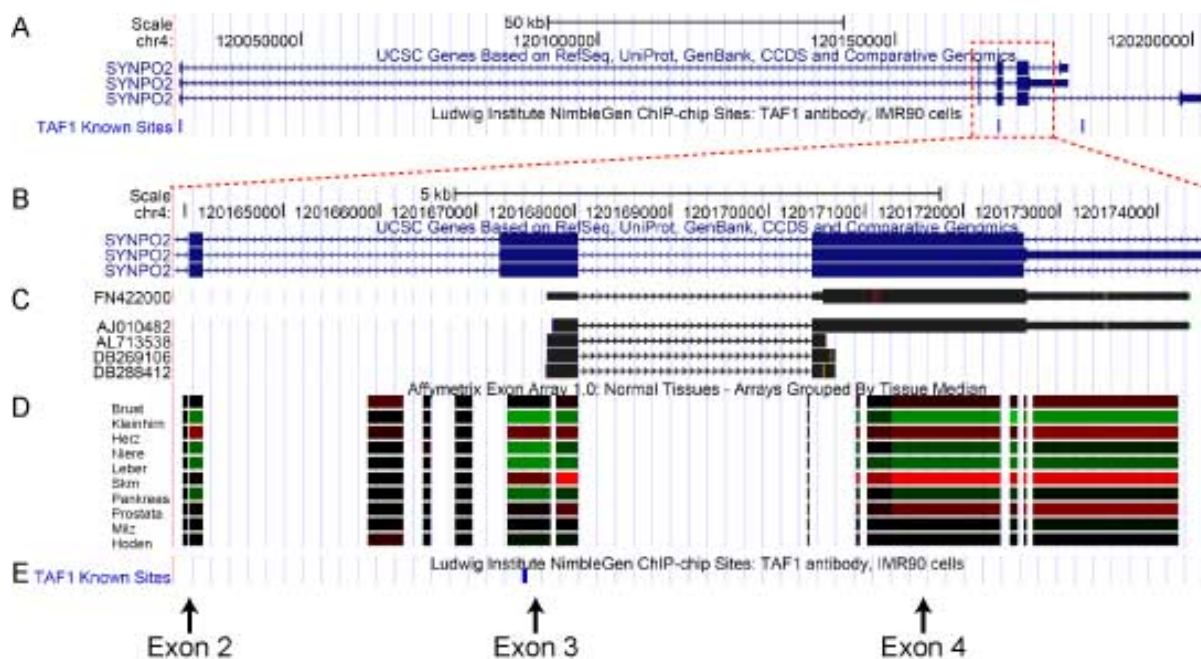


Abbildung B.2: **Genomische Organisation von *SYNPO2* und Ergebnisse der Datenbankrecherche in Hinblick auf die Existenz des alternativen Transkriptionsstarts.** A: Genomische Organisation von *SYNPO2* mit Lokalisation der ermittelten TAF1-Bindungsstellen. B: Detailansicht der Exons 2-4. C: mRNA- und EST-Sequenzen, die die Existenz des alternativen Transkriptionsstarts unterstützen. D: Ergebnisse der *Affymetrix All Exon Chip* Analysen, wobei rot eine erhöhte Expression in dem angegebenen Gewebe bedeutet. E: Lokalisation der TAF1-Bindungsstelle. Alle Daten wurden vom UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) eingeholt.

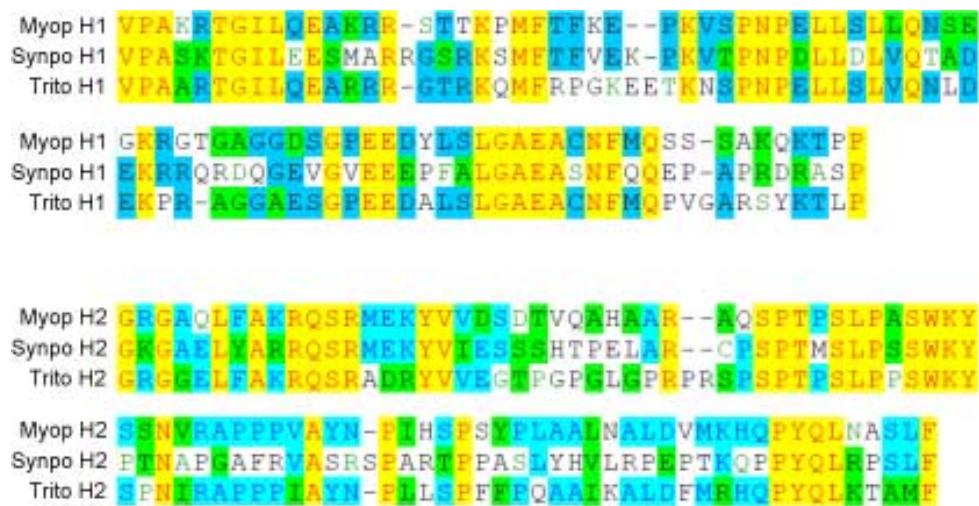


Abbildung B.3: *Alignment der Homologieblöcke der Podin Proteine.* Gezeigt sind *Alignments* der Homologieblöcke 1 (H1) und 2 (H2) von Myopodin (Myop), Synaptopodin (Synpo) and Tritopodin (Trito). Gelb: Aminosäuren sind identisch in allen Podinen, blau: Aminosäuren sind identisch in zwei Podinen, grün: Aminosäuren sind strukturell ähnlich.

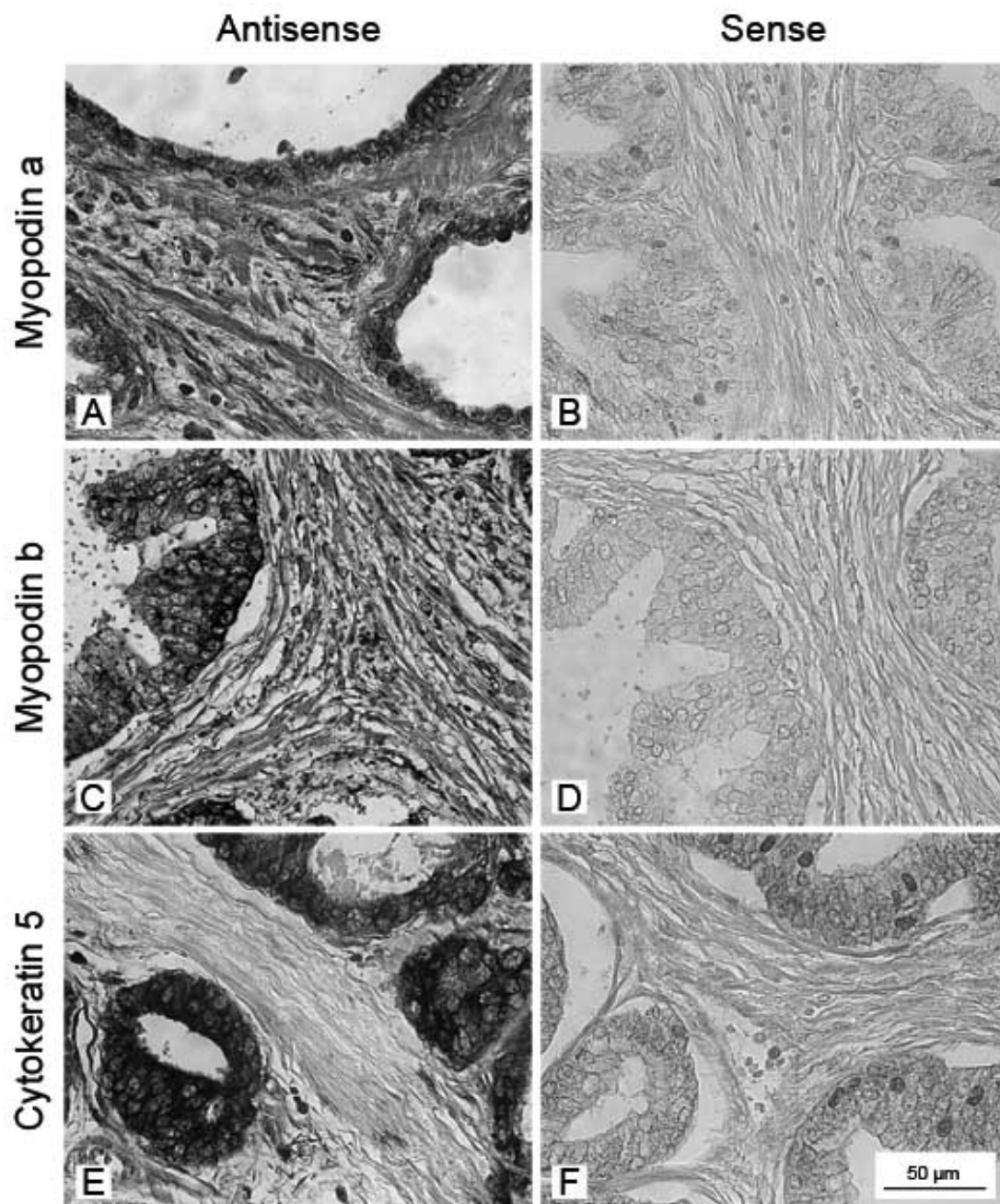


Abbildung B.4: *In situ*-Hybridisierungen humaner Prostata mit Sonden gegen das 3'-Ende der Myopodinisform a bzw. d und b bzw. e. Die Antisense-Sonden gegen beide Isoformen (A und C) zeigen die Expression der Myopodin-mRNA sowohl in den Glattmuskelzellen des Stromas, als auch in den Epithelzellen, während die Sense-Sonden keine spezifische Reaktion zeigen (B und D). Die Positivkontrolle mit einer Sonde gegen Cytokeratin V zeigt die ausschließliche Expression dieser mRNA in den Epithelzellen (E und F). Die *In situ*-Hybridisierungen wurden angefertigt von Dr. Andrea Katharina Stranzenbach.

## Anhang C

### Primer-, Nuklein- und Aminosäuresequenzen

Tabelle C.1: Klonierungsprimer für Myopodinkonstrukte. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme für Klonierungszwecke (*MluI* und *SalI*) sind kursiv dargestellt.

Name	Nukeotidsequenz	Klonierung von
Myop fw 268aa	TTTACGCGTGAAGTGGTGTGATTTCAGGAA	Myop 268-391
Myop rv 391aa	TTTGTGCGACGGAGTTGGGGTTGGGAGCATC	Myop 268-391
MYOP ORFf	TTTACGCGTATGTTTAAGAAGCGACGTCGG	Myop 399-533
MYOP Y2Hf	TTTACGCGTAGGAAATACACCCCTAGTAGC	Myop 405-916; 405-633
MYOP 1441f	TTTACGCGTATGGAGATGTTACCAGACACC	Myop 481-663
MYOP 1599r	TTTGTGCGACCGTGGTTCTCAGGCCATCGGT	Myop 399-533
MYOP 1396f	TTTACGCGTGGGGTTTCAAGTCCGATTGC	Myop 635-916
MYOP 1482r	TTTGTGCGACCGAATCGTAAAAGGCTGGCTG	Myop 481-663
MYOP 1990f	TTTACGCGTTCTGAGCGAATAGCTTCCCGA	Myop 664-916; 664-809
LMYOP 2023f	TTTACGCGTTCAGTGCCAGCAAAAAGAACA	Myop 675-749
LMYOP 2247r	TTTGTGCGACGGAGCTTTGCATGAAATTACA	Myop 675-749
MYOP 1899f	TTTACGCGTGTCTCCTCCATCAAAATAGCC	Myop 803-916
MYOP 1920r	TTTGTGCGACGGCTATTTTGATGGAGGAGAC	Myop 664-809
MYOP 2244r	TTTGTGCGACATTGGAGGAGTACTTCCAAC	Myop 405-916; 635-916; 664-916; 803-916
MYOP 2194f	TTTACGCGTCAGTCTCCCACTCCATCTCTC	Myop 901-1093
MYOP endr2	TTGTGCGACCTCTTCCACAACAGATGGTTTC	Myop 901-1093
MYOPaex5f	TTTACGCGTGAGAGTGGGCGCTCCCTTTCT	Myop 1085-1261
altMYOPendr	TTTGTGCGACTGTTTGGCGTCTCCATCCCC	Myop 1085-1261

Tabelle C.2: Klonierungsprimer für Tritopodinkonstrukte. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme für Klonierungszwecke (*MluI* und *SalI*) sind kursiv dargestellt.

Name	Nukeotidsequenz	Klonierung von
PDZ40a 1f	TTTACGCGTATGGAGACCTTTGAGCCCATC	„Trito(b)1-385“; „Tritopodin(b)fl“
PDZ40a endr	TTTGTGCGACCTGGTGCCCTGCCCCAGGCCT	„Trito H1-H2“; „Trito H2“ „Tritopodin(b)fl“
PDZ40b 1f	TTTACGCGTATGGGTGCTGAGGAGGAGGTG	„Trito(a)1-85“; „Trito 1-198“
PDZ40b endr	TTTCTCGAGAGATTGGAGATCAGGACCTGA	„Trito H1“
PDZ40b PDZr	TTTGTGCGACCTGCACAGTGAGGACAAGCTG	Trito(a)1-85
MYOPLa 597r	TTTGTGCGACAGGTGGTACTGCAGGCCTTC	„Trito(b) 40-206“
MYOPLb 441r	TTTGTGCGACGCCATCAGCATCACTGTCAGT	„Trito 1-198“
MYOPLa 97f	TTTACGCGTGCGAAGTGC AACGTGCAGAG	„Trito(b) 40-206“
SYNPO2L FBSf	TTTACGCGTTCTCGAGGGCTCCTTGATGGG	„Trito H2“
trito EPPSf	TTTACGCGTGAGCCCCCAGCGCTCGCGAG	„Trito H1“; „Trito H1-H2“
trito GAASr	TTTGTGCGACAGAGGCTGCCCATTCACGAG	„Trito H2“
SYNPO2L QLVLTF	TTTACGCGTCAGCTTGTCCTCACTGTGCAG	„Trito(a)79-278“; „Trito(c)79-602“
SYNPO2L KTKCRr	TTTCTCGAGCCTGCATTTGGTCTTGGCCTC	„Trito(a)79-278“
SYNPO2L GAPEPPr	TTTCTCGAGAGCGCTGGGGGGCTCAGGAGC	„Trito(b)1-385“

Tabelle C.3: Klonierungsprimer für  $\alpha$ -Aktininkonstrukte. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme für Klonierungszwecke (*MluI* und *SalI*) sind kursiv dargestellt.

Name	Nukeotidsequenz	Klonierung von
aAct2aNHfw	TTT <i>ACGCGT</i> ATGAACCAGATAGAGCCCGGC	ABD-R1
aAct2aCHrv	TTT <i>GTCGAC</i> CAGATCGCTCTCCCCGTAGAG	R4-CAM; CAM
Actn2 CAM f	TTT <i>ACGCGT</i> AAGGGCATCACCCAGGAGCAG	CAM
Actn r1 fw	TTT <i>ACGCGT</i> GCGGAGCAGCCGAGACAGCG	R1-R2; R1-R3; R1-R4
Actn r2 rev	TTT <i>GTCGACT</i> CTCCTCTTCTGAGTAAGCGT	R1-R2
Actn r3 rev	TTT <i>GTCGAC</i> ACGCTCGTTAGCATGCTGGCG	R1-R3
Actn r4 rev2	TTT <i>GTCGAC</i> CCGCATCTCTCGTCAGGATCTG	R1-R4
Actn r4 fw	TTT <i>ACGCGT</i> CTGCGTCGTCAAGTTGCGGCG	R4-CAM

Tabelle C.4: Primer für 5'-RACE

Name	Nukeotidsequenz	Verwendung
Myop 1303r	TTCACATGTATCCTCCTTGTC	cDNA-Synthese für 5'-RACE
GSP1: Myop 391r	TTTGTTCGACGGAGTTGGGGTTGGGAGCATC	Gene Specific Primer 1
GSP2: Myop 1185r	TTTGTTCGACCAACACCCCTTGGAGTTGGG	Gene Specific Primer 2

Tabelle C.5: RT-PCR-Primer zur Amplifikation humanen (h) und murinen (m) Myopdin

Name	Nukeotidsequenz
ex1 m/h f	ATGACTGGAGGGGCGCCCTG
ex2 m/h f	TACCCTGAAGTCATCAAGCC
ex2 m/h r	GGCTTGATGACTTCAGGGTA
ex3 m/h f	TGTCCACATAAATTCGATCC
ex3 m/h f 1036	AGCAGACCACACAAGCACCG
ex3 m/h r	CTGCAGGGTGGTACTTTCCA
ex4a m/h r 1090	ACTTTCACTCCTCCTGAGCC
ex4a m/h r 1262	CCTCTCGCTCAAGCTCGCCA
ex4a m/h f 3240	TTCTCAGCCAAGAAAAGTGG
ex5 m/h r	TCATCCACTAGACCGAGAGG
Myop 2977f	TTTACGCGTTCAGTCAAGGTCAATTCAGCC
Myop 4b r	TCCACAACAGATGGTTTCCA
ex4a/b m rev	GTTTCCACACCTGAACTGTG
ex4a m 3008 f	GGCGAATGTTGGGTCTCCCA



Tabelle C.6: RT-PCR-Primer zur Amplifikation humanen (h) und murinen (m) Tritopodins

Name	Nukeotidsequenz
hTrito Ex1 fw	GAG GAG GTG CTG GTC ACA CT
hTrito Ex2 fw	ATC AAT GGG GTC TCT TGC AC
hTrito Ex2 rev	GTG CAA GAG ACC CCA TTG AT
hTrito Ex3 fw	CTG AGG CTC TGC TGT TAC CC
hTrito Ex3 rev	AAG GGT GAC AGC ACC TGA AG
hTrito Ex4 fw	AGC TAT GAC AAA GCC CCA GA
hTrito Ex 5a fw	CAG CTT CAC TTC AGG GGT TC
hTrito Ex 5a rev	GCC GCC GTT TCT TAA ACA TA
hTrito Ex 5b rev	CAA AGG CGC AGA TAG GAA GA
hTrito Ex 5c rev	GCA ATA GCT GGG GTT TTG AG
mTrito Ex1 fw	ATG GGT GCT GAG GAG GAG GT
mTrito Ex2 fw	ACT CCG GGA GAG GGA CCA GC
mTrito Ex2 rev	ATG GCA CTG GCA TGG GAG AA
mTrito Ex3 fw	GAC AGC CGT GTA AGC TCC CC
mTrito Ex3 rev	TGG CAG GGC CAT CAA CAT CA
mTrito Ex4 fw	CTC CAG CCA GCA CCA CCT TT
mTrito Ex4 rev	AGA ACG GGT CTT GGA GCT CA
mTrito Ex5 fw	TGC AAC GCG CAG AAA GCC TC
mTrito Ex5 1130 rev	TTA GCT GCC CTC CCA GTC CA

Tabelle C.7: Sequenzen der Primer für Ladekontrollen

Amplifikation von	Name	Nukeotidsequenz
humanes GAPDH	huGAPDH fw	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GGA G
humanes GAPDH	hu GAPDH rev	TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT
murines GAPDH	moGAPDH p1 fw	AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG
murines GAPDH	moGAPDH p1 rev	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA
murines HPRT	HPRT p1 fw	TCA GTC AAC GGG GGA CAT AAA
murines HPRT	HPRT p1 rev	GGG GCT GTA CTG CTT AAC CAG

1	AAGACCTTTC CTGAGTCTCA GCGAGTATAT CCGAGTCTCC AGTGGGCGAG AGTTGAGAT
	TCCTGGAAAG GACTCCAGAT CATTCTAATA GCTTCTAGAG TCAGCCCTCTC TCAGACTCTCA
61	GATTCAGAAA ATTGAGGCGG GAGTATCCCG ATTGGCCCGG GTGAGAGTGA TCTGCTGACT
	CTAGTCTTTC TCACTCTGTC CTTGACGCTC TCAAGGCTCC CACTCTGACT AGAGTCTGAC
121	CTCTGCGGG GCGAGGAG AGGGTGTGAG GCTTCAGCGA GGAAGAGAT GTGTGATTC
	GAGACTGTCC GTTCTCTGTC TTCCAGACTC GGAAGTCCGT CTTTCTCTCA CAGACTTAG
181	TCGACTGAAA GAGAGGCAAT CAGAGACCC TCTTCTCTG GATCCCTGG CCGCTCTCAT
	AGGTCCAGCT CCGCCCTCTCA GTTCTCTGAG AGAGAGAC CAGTGAAGAC GCGAGGATAG
241	AGAGAGTCA GCGAGGCGG AGATCCCG TCCTGAAA GATTCAGTCA GACTTCAGAA
	TCTCCAGT CTTGCTCTTC TCTAGATCC GAGCTCTTTC CTAGTCTGAT CTGAGTGTAT
301	GCGCGAGCG CCGCTCTGAC GCTCTCAGAG GAGTGAAGC CTCTCAGAAA CAGTGAATTA
	GTTGCTCTGC CCGTGAAGTTC CTGACTCTTC GAGTCTCTG TGTCTGACT
361	GAGAGCGAAA TGTAAATGCA AAGAGATTC CTTCTCTTCA AGGAGATTC CAGACCGAAA
	CCTCTCTTTC AGATTGAGT TTCTGTAAG GAGAGAGAT TCTCTCTCAG GCTTGGGATTT
	M E K K R R R A R K V T L V
421	CTGAAAGCG GTTGTGTGT TTAGAGTGG ACTGTGAGG GCGGGAAT ACGCTCTGAT
	GAGTCTCC CAGACTTACA AATCTCTGTC TCGAGCTCC CAGTCTCTTA TGTGGAGTCA
481	TAGTACGGT ACTGCGAGC TTGAGCGAGA GCGCGAGCG GAGGAGAGG GTGACAGAGA
	ATGATGCGCA TCGACTCTG AACTGCTGAT CCGCTCTGTC GTCTCTCTC CACTCTTACT
541	GAGTACATGT GAGTGAAGT TTCTGTGTC AGCGAATCA GAGTGTAGT AAGAGTATTT
	CTGATTTACA CTTGATGTA AAGAGAGCG TTGCTGTAAT CTGACTACT TTTCTGATTA
601	GTGAGAGGT GAGCAGACA CAGAGTGT GACTGTGAC TGGAGTGG GACTGTGGA
	CAGACTGCA CTTGCTTGT GTTGTGACA CTTGAACTG ACCGTGAGC CTGAGACT
661	GATGGAGG AACTGAGCA GAGGAGCA GATGGAGT TTAGCAGCA CAGAGCGAA
	GTACTTTC TTTACTGCT CTTCCCTGAT CTTGCTGAC AATGCTGCT GTGTGCTTT
721	GCGAGCCCTC ATGTTTGTCA AGCGAGGCGA GCGATGTAT CAGTGTGAG CCGAAGAG
	CCTCGAGAG TACAGAGGAT TCTCTCTGAT CTTTACTGTA GTTATGATTC GAGTCTTCT
781	AGGAGAGAG GTAGGTGAAA CCGCAGAGCA AGAGAGAT GCTCCCGAGA CCGATGCGCT
	TCTCTGCTC GTCAGACTTC GCGGTGATC TCTTGTCTCA GAGCGGCTC GAGTACCGGA
841	GAGAGAGAG ACTCTTACC AAGAGAGGA GAGAGATGG GTAGAGAGC AGAGCTGAT
	CTTGTGATCC TGGAGAGTGG TTTCTTCTC CTTCTCTGAC CAGTCTGTGG TCTCGAGCA
901	GAGCAGAGC TACATCGAGG TGAATCATG TCTTGTGAT GTTCCCGAC AGAGATGCTT
	CTGTTTGG ATGACTTCC ACTGATTACC AGAGCGGTA CAGGZHTTG TCTTACGAA
961	GAGTGGGCA TGTGAGAG CAGACTTCA GAGTGTGTC CCGATGATTA GAGCGCGAA
	GTGACCCGAT AGACTCTGCT GTTGTGAT CTTCTGAGG GAGTACTTCT GTTGTGCTT
1021	AGCTTCTCA GCGTGTGTA ATGAGCGCC TACCCCTTC TCGCCAGCC GAGAGATGAC
	TGGAGAGGAT CCGAGACTC TAGTGTGTCG ATGCGGAGAG AGCGGTTGG GTTGTACTG
1081	GAGTCCCAT GTCACTTTC CTGACCTCC ACTTACTT CAGGACTC CTTCCCTGA
	CTGAGGTTAA CAGACTGAAA GACTGTGAGG TCGATGATCA CTTGACTTGG GAGGAGGACT
1141	GGCTTCTC AAGAGGATTT CAGTCTGAT TGTCTGGCCA CCGAGAGCC CTCTATGACC
	CCGAGAGAG TCTCTCCGAAA GTTCAGGCTTA ACGCCCGGTT CATTCTCGGG GAGGTACCGG
1201	CGAGCTGCG CCGTGTGTC AGCCAGCTT TTAGCATTC TTCTGAGCGAA TAGCTGCGG
	GGAGTGAAG GAGACTGAGG TGGTGTGAAA AATGCTGAGG AGACTCTT ATTGAGAGAC
1261	AGATGAGG ATTCAGTTC CAGCAGAAA AGCCAGATA TTCCAGTAG CCGAAGAGAG
	TGTACTTTC TAGAGTAGG GTGCTTTC TTGTTTAT AAGTCTGTC GGTTCTCTC
1321	AGAGCAGCA AAGCAGAT TTACTTCTTA AGGCGCGAAA GTAGCGCAA ATCTGACT
	TGTACTTCT TTGAGTACA AATGAAAT TCTCGGATTT CATTGCGGTT TAGACTTTA
1381	L L S L L Q N S E G K R G T G A G D G D S D
	CTGTGCTC CTTCAGAAAT CAGAGCGCA ACGGCGACT GAGCTGTGAG GTGATTCGG
	GAGACTGAG GAGTTTGA GTCTCTGTT TCCCGCTGA CTTGACGTC CAGTAAAGCC
1441	ACCGAGAGA GACTTACTA GCTTGGGCG AGGAGCTGAT AATTCAGC AAGCTCTC
	TGGCTTTC CTGAGTGAAT CAGACTGAG TCGCGGACT TCGCGGCTT TTTGAGAG
1501	TCGACAGCA AAGCCTTTC CTCTCTGTC TCGAAGAT CAGTGTGAT CTTATCTC
	AGGTTTTC TCTCGGAG GAGAGAGAG AGTHTTGA CTTGACTCA GAGTATGAG
1561	CGAGCAGTA ACTGCTTTC CCGGCTTGG GTCTCAGTA GTGCTGCGA CCGAAGCTC
	TGGTGTGAT TGGGTTGAAA GAGGCTGAG CAGAGTCTCT CAGCGGAT CAGTCTGAGG
1621	TGCTCTCC ACATCAAGC CAGTCAAGG CAGCTGTTC TCTCTCAGCA AAGTACCG
	ACGAGCGGG GTTATGTTGG GTTHTTTC GTGCGAGAG AGGAGGAT TTTATGCGAT
1681	GCTCTCTAC GTTCTGCGG GCGCTGAGG TACTTGTGAC GTGCGTGGTC CTTGAGAG
	CAGAGATG CAGAGAGAG CCGAGATTC ATGACTTAC CAGTCTGAG CAGAGATTC
1741	ACGACAGCA GCAATGACA GTACAGATA CAGCAGCAA CCGAGATTT CAGCAGCAG
	TGGTGTGAT GGTCTAGGCT CAGTCTTAA GTGCGGATTT GCTTGTGAAA GCTGTGATG
1801	AGTCAATGCT GTTCTGAGCTG GTGCGAGTGG ACGTCTGAT CAGCTGTGAG GATGATG
	TGATTTACA CAGTGTGAC CAGCTGCTCC TGTGAGGTTA CTTGAGGCTC CTTACTGAC
1861	GAGAGAGCT CAGCTCTTC CTAGAGCA GTGCGAGAG GTGAGATG TGTGTGATC
	CTCTCTGAG GTGCGAGAG GTTTCTGAT CAGCTTTC CTTCTTAC CAGAGATG
1921	AGCGAGGTC CAGGCTGAG CTTCTGAG TCGATTCCT ACTGATTC TCGCGAG
	TCTCTGAC GTCGAGTCC GAGCAGTCC AGTCAAGAG TGAAGTAG AGAGCGGCTC
1981	TGGAGTAC TCGTCAATG TCGAGAGC TCGCTTGG CTTTATAC CTTGACTC
	AAGCTTGT AAGATTTAC AGCTCTGCG AAGAGAGAC CCGATATGAG GATGATGAG
2041	GCGCTTAC CAGCTGCTC CTTGAGCTC TCGAGATA CTTGCGAGC CTTGCGAGCT
	CAGAGATG GTTCAAGCC GAGTGTGAG ATGCGTATG CAGCTGTG CCGAGTGTTA
2101	CGCGAGAGA AAGAGAGAA AAGCTTCAA TCGATTAAT GTGCGAGC ACGAAGCTTA
	CGGCTTTC TCGCTTCT TGGGAGAT ACCTAATCA CAGTACTG TGGTGTGAT
42	D A F S R O V S E S P I A B P A G P A G P P W F
48	H O P A P B D P A S V U S S B H I A S H
54	C M A C T G C C G T T G A C C T T A G C A T T C T T A G C A T T C T T G A G C A A T A G C T T G C C G
60	N D F W H I E V P A K N T G I L G E A K R H
66	A G T G A G G A T C T G A C C A A A A G A A C K G A A T T T C G A G G C C A A A G G C C A A A G G A G
72	T Y A C T I C T T A G A G T C A G G T G C T T T T T C T T T G T T A T A A G T C T G C G G T T T C T C T C
78	A S G A T A R K P E V T F F A K E C P A A P K V P N P E L
84	M G A C A G C A A A A C C A T T T T A C T T T A A A G C C C A
90	T P C A C T
96	L L S L L Q N S E G K R G T G A G D G D S D
102	CTGTGCTC CTTCAGAAAT CAGAGCGCA ACGGCGACT GAGCTGTGAG GTGATTCGG
108	GAGACTGAG GAGTTTGA GTCTCTGTT TCCCGCTGA CTTGACGTC CAGTAAAGCC
114	ACCGAGAGA GACTTACTA GCTTGGGCG AGGAGCTGAT AATTCAGC AAGCTCTC
120	TGGCTTTC CTGAGTGAAT CAGACTGAG TCGCGGACT TCGCGGCTT TTTGAGAG
126	TCGACAGCA AAGCCTTTC CTCTCTGTC TCGAAGAT CAGTGTGAT CTTATCTC
132	AGGTTTTC TCTCGGAG GAGAGAGAG AGTHTTGA CTTGACTCA GAGTATGAG
138	CGAGCAGTA ACTGCTTTC CCGGCTTGG GTCTCAGTA GTGCTGCGA CCGAAGCTC
144	TGGTGTGAT TGGGTTGAAA GAGGCTGAG CAGAGTCTCT CAGCGGAT CAGTCTGAGG
150	TGCTCTCC ACATCAAGC CAGTCAAGG CAGCTGTTC TCTCTCAGCA AAGTACCG
156	ACGAGCGGG GTTATGTTGG GTTHTTTC GTGCGAGAG AGGAGGAT TTTATGCGAT
162	GCTCTCTAC GTTCTGCGG GCGCTGAGG TACTTGTGAC GTGCGTGGTC CTTGAGAG
168	CAGAGATG CAGAGAGAG CCGAGATTC ATGACTTAC CAGTCTGAG CAGAGATTC
174	ACGACAGCA GCAATGACA GTACAGATA CAGCAGCAA CCGAGATTT CAGCAGCAG
180	TGGTGTGAT GGTCTAGGCT CAGTCTTAA GTGCGGATTT GCTTGTGAAA GCTGTGATG
186	AGTCAATGCT GTTCTGAGCTG GTGCGAGTGG ACGTCTGAT CAGCTGTGAG GATGATG
192	TGATTTACA CAGTGTGAC CAGCTGCTCC TGTGAGGTTA CTTGAGGCTC CTTACTGAC
198	GAGAGAGCT CAGCTCTTC CTAGAGCA GTGCGAGAG GTGAGATG TGTGTGATC
204	CTCTCTGAG GTGCGAGAG GTTTCTGAT CAGCTTTC CTTCTTAC CAGAGATG
210	AGCGAGGTC CAGGCTGAG CTTCTGAG TCGATTCCT ACTGATTC TCGCGAG
216	TCTCTGAC GTCGAGTCC GAGCAGTCC AGTCAAGAG TGAAGTAG AGAGCGGCTC
222	TGGAGTAC TCGTCAATG TCGAGAGC TCGCTTGG CTTTATAC CTTGACTC
228	AAGCTTGT AAGATTTAC AGCTCTGCG AAGAGAGAC CCGATATGAG GATGATGAG
234	GCGCTTAC CAGCTGCTC CTTGAGCTC TCGAGATA CTTGCGAGC CTTGCGAGCT
240	CAGAGATG GTTCAAGCC GAGTGTGAG ATGCGTATG CAGCTGTG CCGAGTGTTA
246	CGCGAGAGA AAGAGAGAA AAGCTTCAA TCGATTAAT GTGCGAGC ACGAAGCTTA
252	CGGCTTTC TCGCTTCT TGGGAGAT ACCTAATCA CAGTACTG TGGTGTGAT

Abbildung C.1: cDNA-Sequenz der Myopodinisform e. Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank mit der *Accession Number* FN422000 hinterlegt. Die Übersetzung des ORFs ist im *Single-Letter-Code* angegeben. Das entsprechende Protein hat die *Accession Number* CAZ66141.





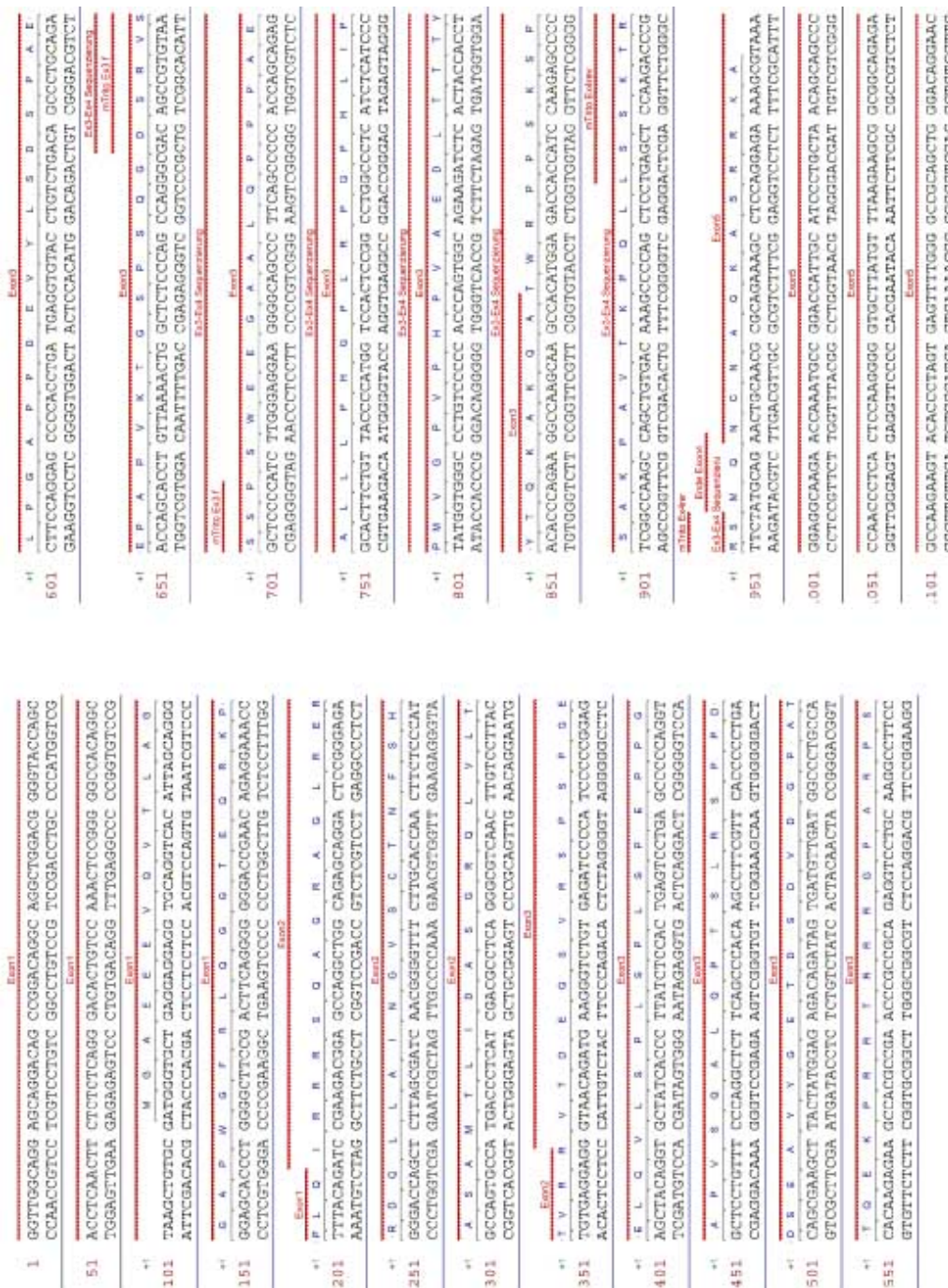


Abbildung C.2: cDNA-Sequenz der murinen Tritopodinin isoform d. Die Exons, die für die Amplifikation aus muriner Skelettmuskel-cDNA verwendeten Primer sowie die durch Sequenzierung des in pGEMT-T klonierten PCR-Produktes erhaltene Sequenz sind markiert. Die Übersetzung des ORFs ist im *Single-Letter-Code* angegeben. Das entsprechende Protein hat eine vorhergesagte molare Masse von 32 kDa.

Anhang D

Vektorkarten

Name des Plasmids: **pET23aEEF**  
 Länge: 3,6 kb  
 Herkunft: Firma Novagen (pET23a)

T7 Promotor  
 His6-Tag, EEF-Immuntag  
 F1 Origin  
 Ampicillin Resistenzgen

```

                                T7 Promotor
                                →
BglII
AGATCTCGATCCC CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAGACCACAACGGTTTCCC

XbaI                               rbs                               NdeI  MluI       SalI
TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACGCGTTTTGTTCGAC

His6-Tag   Immuno-Tag   XhoI
CACCACCACCACCACCACGAGGAGTTCTGACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGAT
 H H H H H H  E E F Stop
CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAA

                                T7-Terminator
                                →
CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT
    
```

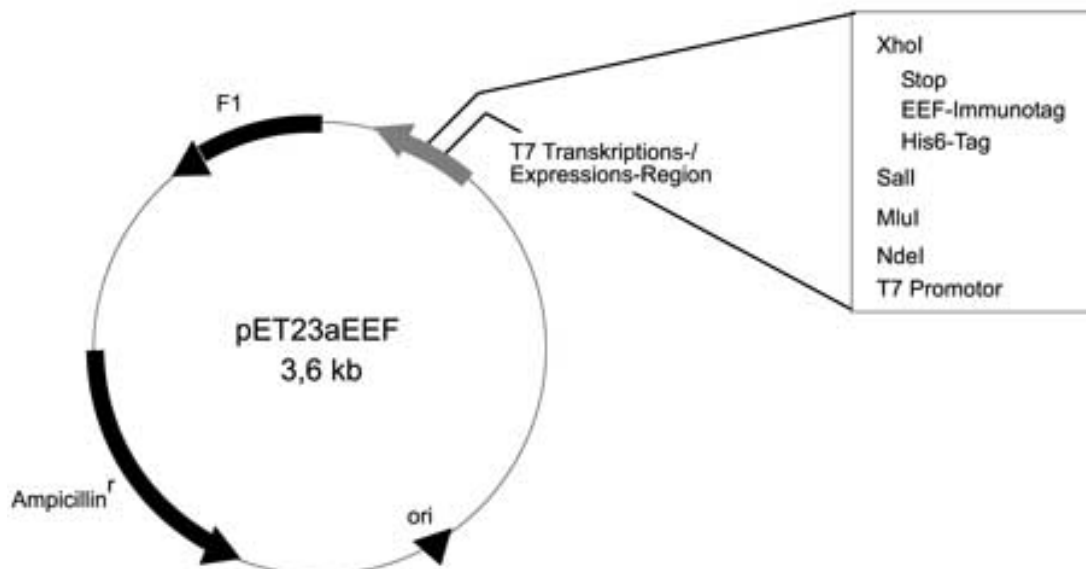


Abbildung D.1: Vektorkarte pET23aEEF

Name des Plasmids: **pET23aT7**  
 Länge: 3,7 kb  
 Herkunft: Firma Novagen (pET23a)

T7 Promotor  
 His6-Tag, T7-Immunitag  
 F1 Origin  
 Ampicillin Resistenzgen

T7 Promotor →

BglIII  
 AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC

XbaI rbs NdeI NheI  
 TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACT  
M A S M T

T7-Immunitag BamHI MluI SalI  
GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCACGCGT Insert GTCGAC  
G G Q Q M G R G S T R V D

XhoI His6-Tag  
 CTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAG  
 L E H H H H H H Stop

T7-Terminator

CTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAA  
ACGGGTCTTGAGGGT

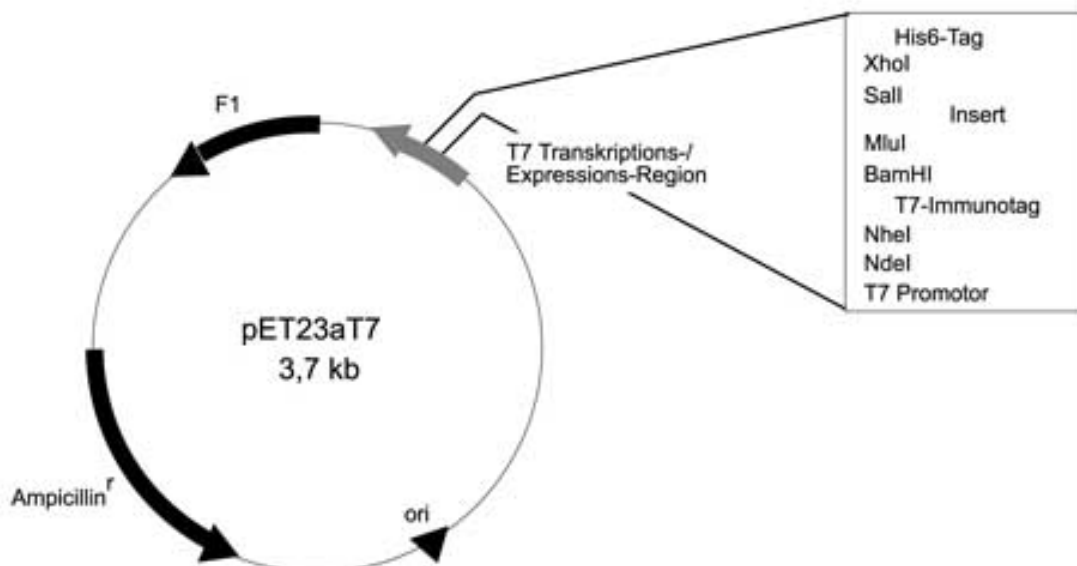


Abbildung D.2: Vektorkarte pET23aT7

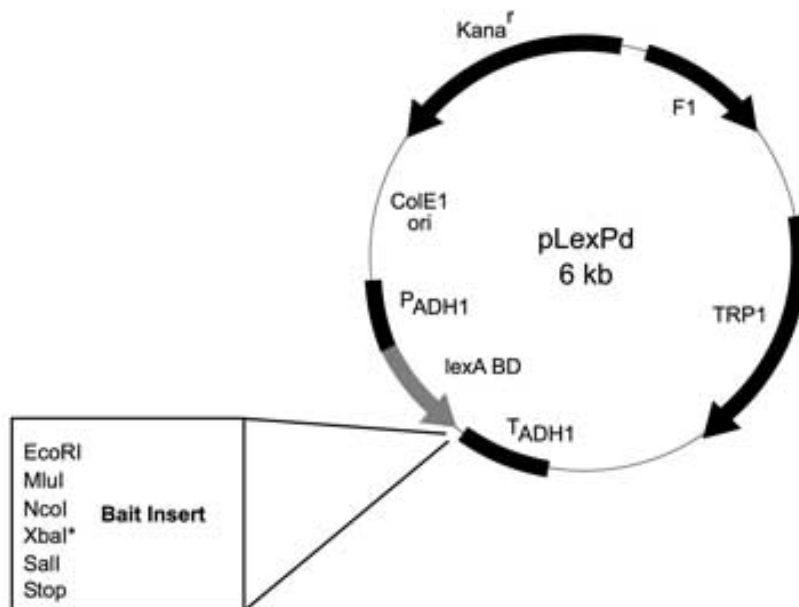
Name des Plasmids: **pLexPd**

Länge: 6 kb

Herkunft: Firma Clontech

TRP1 (für Tryptophan-Synthese in Hefe)  
 P<sub>ADH1</sub> (ADH-Promotor; konstitutiv, mittlere Expression)  
 T<sub>ADH1</sub> (ADH-Terminator)  
 lexA DNA-Bindungsdomäne  
 ColE1 Origin  
 Kanamycin Resistenzgen

CCA AAA AAA GAA TTC ACG CGT CCA TGG TCT AGA GTC GAC TAA TTC GAC  
 GGT TTT TTT CTT AAG TGC GCA GGT ACC AGA TCT CAG CTG ATT AAG CTG  
 - - LexA BD EcoRI MluI NcoI XbaI SallI Stop



\* nicht unique!!!

Abbildung D.3: Vektorkarte pLexPd



Name des Plasmids: **pACT2**  
 Länge: 8,1 kb  
 Herkunft: Firma Clontech  
 Alkoholdehydrogenasepromotor  
 GAL4 Aktivierungsdomäne  
 Gen für Leucin-Synthese  
 Ampicillin Resistenzgen

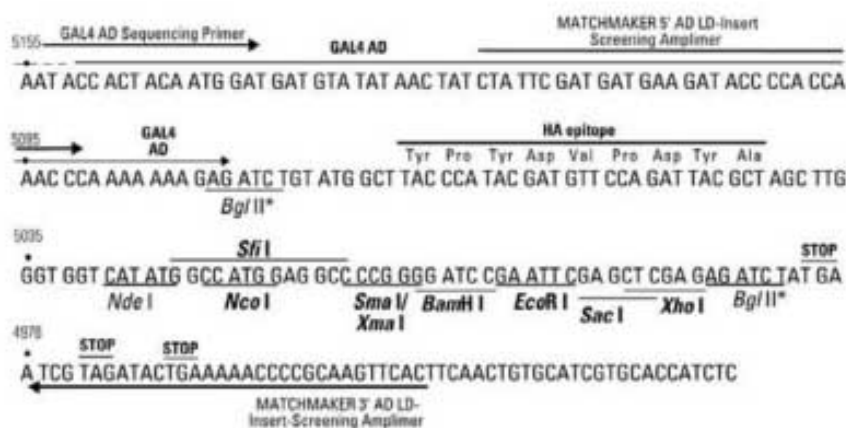
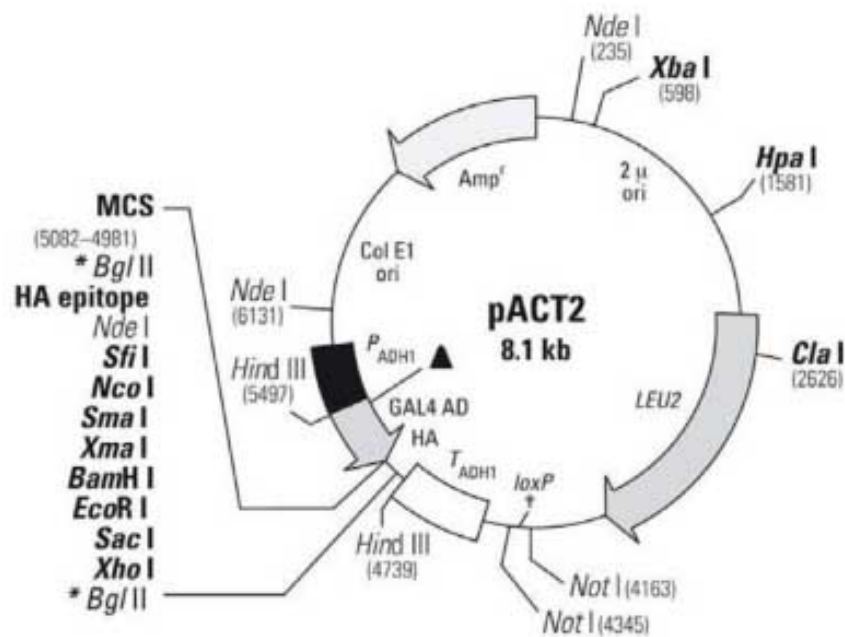


Abb. 6.13: pACT2

Abbildung D.4: Vektorkarte pACT2. Der Vektor pACT2Pd entstammt dem Umbau des dargestellten pACT2-Vektors, dem eine andere MCS eingefügt wurde, die das Klonieren über die Restriktionsenzyme *MluI* bzw. *XhoI* und *SalI* ermöglichte.

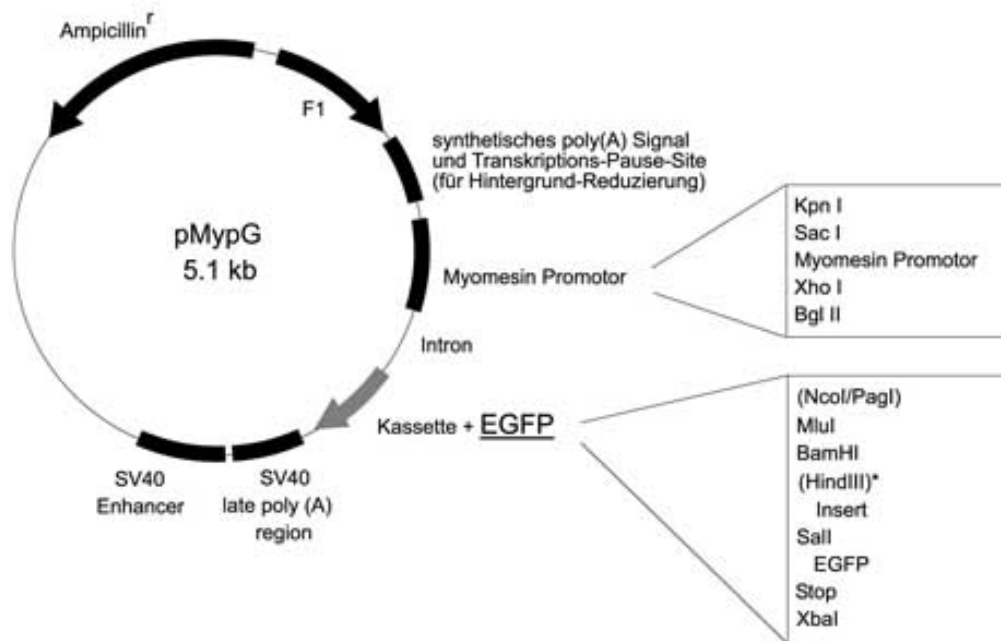
Name des Plasmids: **pMypG**  
 Länge: 5,1 kb  
 Herkunft: Firma Promega (pCAT3-Enhancer)

Synthetisches poly(A) Signal und Transkriptions-Pause-Site  
 SV40 Enhancer  
 SV40 late poly(A) region  
 Myomesin Promotor  
 F1 Origin  
 Ampicillin Resistenzgen  
 EGFP + Cloning Kasette

PagI cloned into NcoI

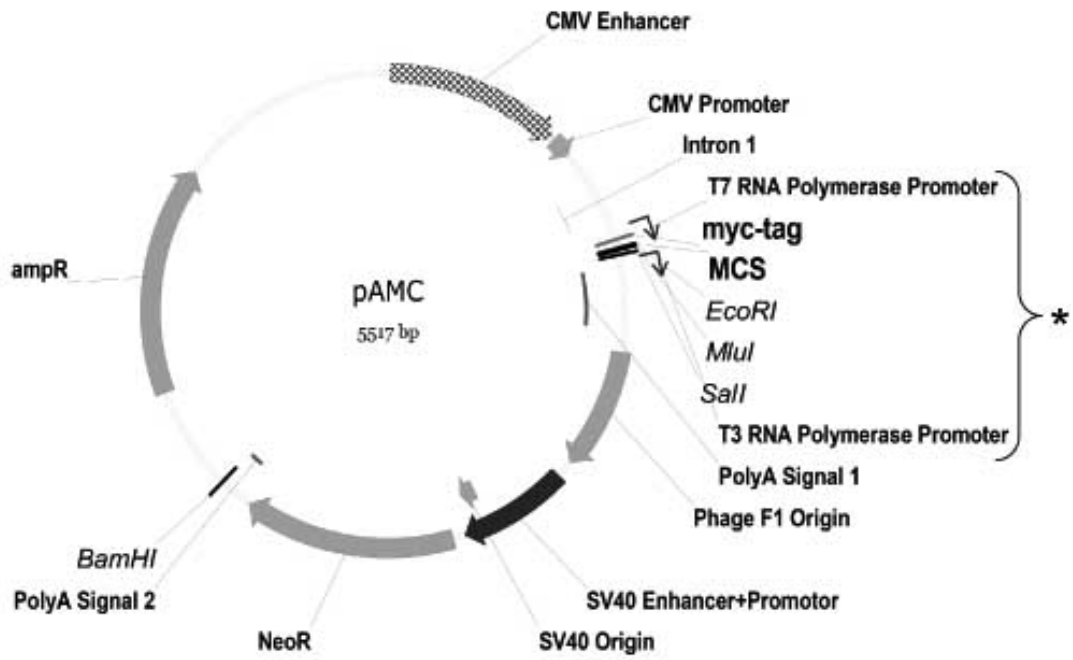
```

                (HindIII)
          MluI  BamHI      SalI                XbaI
ACCATGACGCGTGGATCCAAGCTTGTTCGAC  -  EGFP  -  TCTAGA
TGGTACTGCGCACCTAGGTCGAACAGCTG      AGATCT
      M  T  R  G  S          V  D
    
```



\* nicht unique!!!

Abbildung D.5: Vektorkarte pMypG



\* T7 RNA Polymerase Promoter

TAATACG ACTCACT ATAGGCT AGCCTCG AGAATTA ACCACCA TGAACA AAAGCTG ATTTCTG AAGAAGA  
 ATTATGC TGAGTGA TATCCGA TCGGAGC TCTTAAT TGGTGGT ACCTTGT TTTCGAC TAAAGAC TTCTTCT

MCS

myc-tag EcoRI MluI Sall T3 RNA Polymerase Promoter

CTTGGAA TTCACGC GTGGTAC CTCTAGA GTCGACC CGGGCGG CCGCTTC CCTTTAG TGAGGGT TAAT  
 GAACCTT AAGTGC CACCATG GAGATCT CAGCTGG GCCCGCC GGCGAAG GGAAATC ACTCCCA ATTA

Abbildung D.6: Vektorkarte pAMC

Name des Plasmids: **pGEM-T**  
 Länge: 3,0 kb  
 Herkunft: Firma Promega

SP6 RNA Polymerase Promoter (-17 to +3)	124-143
pUC/M13 Rev Sequencing Primer Binding Site	161-177
lacZ Start Codon	165
lac Operator	185-201
Amp <sup>R</sup>	1322-2182
Phage f1 Region	2365-2820
lac Operon Sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 Fw Sequencing Primer Binding Site	2941-2957
T7 RNA Polymerase Promoter (-17 to +3)	2984-3

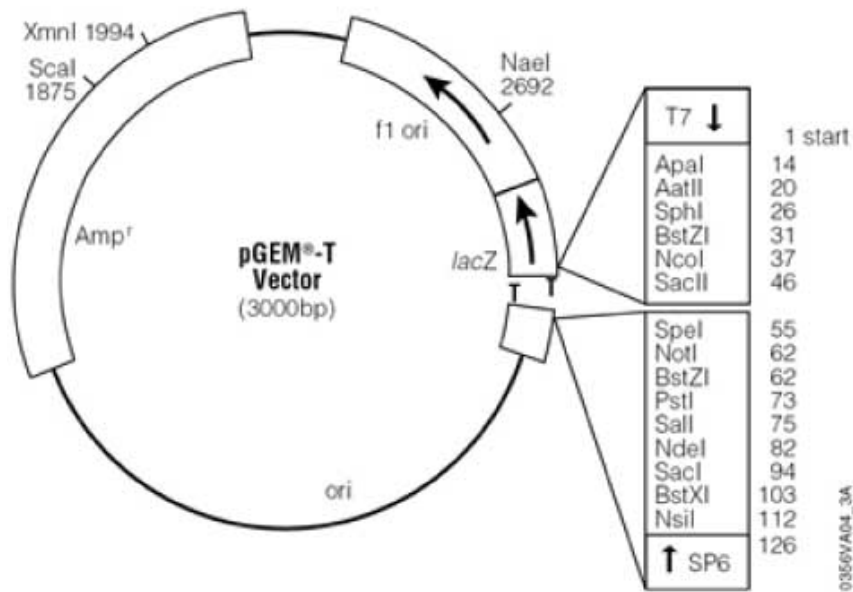


Abbildung D.7: Vektorkarte pGEM-T