

Strukturen der Kraftübertragung  
im quergestreiften Muskel:  
Protein-Protein-Wechselwirkungen  
und Regulationsmechanismen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Zellbiologie“

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
Katja Gehmlich

Potsdam, Dezember 2004

# Abstract

The cell-matrix-contacts (costameres) and cell-cell-contacts (intercalated discs of cardiomyocytes) of cross-striated muscle cells transmit mechanical forces to the exterior. On top of this mechanical function, both structures have been implied to be involved in signal transduction processes.

Dramatic morphological changes in the overall structure of cell-matrix-contacts of skeletal muscle cells were revealed during differentiation. Moreover, this reorganisation was accompanied by alterations in protein composition. Immunofluorescence microscopy indicated that signalling pathways which control the dynamics of focal contacts in non-muscle cells seem to be important only for early differentiation stages of skeletal muscle cells.

To explore novel signalling pathways involved in regulating the formation of costameres, signalling molecules engaged were identified. Thus, paxillin and ponsin transiently interact at the precursors of costameres during muscle development. In addition, biochemical data indicate that a skeletal muscle specific module in the carboxyterminal part of ponsin can recruit the adapter protein Nck2 to this complex. Hence, the three proteins might form a ternary signalling complex involved in controlling the reorganisation of cell-matrix-contacts. Apparently, the activity of this signalling complex is regulated by mitogen activated protein kinases (MAPK).

A second approach has focussed on adaptational processes of the same structures observed in pathological situations. In particular, the role of muscle LIM protein (MLP) in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) was investigated. It was shown that a HCM-causing mutant MLP protein fails to fold properly and that the consequent loss of stability is reflected in altered binding properties: the mutant MLP protein shows decreased binding to both N-RAP and  $\alpha$ -actinin. Hence, the molecular basis for HCM-causing mutations in the MLP gene might be an altered homeostasis of the ternary complex MLP – N-RAP –  $\alpha$ -actinin.

Increasing evidence indicates that the functions of MLP are required not only for the integrity of the myocardium. In addition, MLP seems to have regulatory functions in skeletal muscle tissues.

# Kurzzusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen Signaltransduktionsprozesse in den Strukturen der Kraftübertragung quergestreifter Muskelzellen, d. h. in den Costameren (Zell-Matrix-Kontakten) und den Glanzstreifen (Zell-Zell-Kontakten der Kardiomyozyten).

Es ließ sich zeigen, dass sich die Morphologie der Zell-Matrix-Kontakte während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen dramatisch ändert, was mit einer veränderten Proteinzusammensetzung einhergeht. Immunfluoreszenz-Analysen von Skelettmuskelzellen verschiedener Differenzierungsstadien implizieren, dass die Signalwege, welche die Dynamik der Fokalkontakte in Nichtmuskelzellen bestimmen, nur für frühe Stadien der Muskeldifferenzierung Relevanz haben können. Ausgehend von diesem Befund wurde begonnen, noch unbekannte Signalwege zu identifizieren, welche die Ausbildung von Costameren kontrollieren: In den Vorläuferstrukturen der Costamere gelang es, eine transiente Interaktion der Proteine Paxillin und Ponsin zu identifizieren. Biochemische Untersuchungen legen nahe, dass Ponsin über eine Skelettmuskel-spezifische Insertion im Carboxyterminus das Adapterprotein Nck2 in diesen Komplex rekrutiert. Es wird vorgeschlagen, dass die drei Proteine einen ternären Signalkomplex bilden, der die Umbauvorgänge der Zell-Matrix-Kontakte kontrolliert und dessen Aktivität von *mitogen activated protein kinases* (MAPK) reguliert wird.

Die Anpassungsvorgänge der Strukturen der Kraftübertragung an pathologische Situation (Kardiomyopathien) in der adulten quergestreiften Muskulatur wurden ausgehend von einem zweiten Protein, dem *muscle LIM protein* (MLP), untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein mutiertes MLP-Protein, das im Menschen eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) auslöst, strukturelle Defekte aufweist und weniger stabil ist. Weiterhin zeigte dieses mutierte Protein eine verringerte Bindungsfähigkeit an die beiden Liganden N-RAP und  $\alpha$ -Actinin. Die molekulare Grundlage der HCM-verursachenden Mutationen im MLP-Gen könnte folglich eine Veränderung der Homöostase im ternären Komplex MLP – N-RAP –  $\alpha$ -Actinin sein.

Die Expressionsdaten eines neu generierten monoklonalen MLP-Antikörpers deuten darauf hin, dass die Funktionen des MLP nicht nur für die Integrität des Myokards, sondern auch für die der Skelettmuskulatur notwendig sind.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Geier, C., Perrot, A., Özcelik, C., Binner, P., Counsell, D., Hoffmann, K., Pilz, B., Martiniak, Y., Gehmlich, K., Van der Ven, P. F., Fürst, D. O., Vornwald, A., Von Hodenberg, E., Nürnberg, P., Scheffold, T., Dietz, R., Osterziel, K. J. (2003). Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, **107**(10), 1390–1395.

Gehmlich, K., Geier, C., Osterziel, K. J., Van der Ven, P. F., Fürst, D. O. (2004). Decreased interactions of mutant muscle LIM protein (MLP) with N-RAP and  $\alpha$ -actinin and their implication for hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Tissue Res.*, **317**(2), 129–136.

Gehmlich, K., Hayeß, K., Haebel, S., Van der Ven, P. F., Fürst, D. O. (2004). Paxillin – Ponsin – Nck2 form a transient signalling complex at costameric precursor sites in differentiating skeletal muscle cells. *EMBO J.*, Manuskript in Vorbereitung.

## **Konferenzbeiträge**

Gehmlich, K., Geier, C., Ehler, E., Osterziel, K. J., Fürst, D. O. (2003). Altered Binding properties of mutant muscle LIM protein (MLP) and their implication for hypertrophic cardiomyopathy. Poster, European Muscle Conference, Montpellier, Frankreich.

Gehmlich, K., Geier, C., Osterziel, K. J., Fürst, D. O. (2004). Mutant muscle LIM protein (MLP) is associated with hypertrophic cardiomyopathy and exhibits altered binding properties in the system MLP – N-RAP –  $\alpha$ -actinin. Poster, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Berlin.

Gehmlich, K., Geier, C., Ehler, E., Van der Ven, P. F., Osterziel, K. J., Fürst, D. O. (2004). N-RAP und Muscle LIM Protein - Neue Aspekte für die Pathogenese der hypertrophen Kardiomyopathie. Poster, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim.

Gehmlich, K., Fürst, D. O. (2004). Paxillin interacts with ponsin in differentiating skeletal muscle cells. Vortrag, FEBS Special Meeting on Cytoskeletal Dynamics, Helsinki, Finnland.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Herz- und Skelettmuskulatur . . . . .	1
1.1.1	Kraftgenerierung und Kraftübertragung . . . . .	2
1.1.2	Differenzierung von Skelettmuskelzellen . . . . .	3
1.2	Das Zytoskelett . . . . .	4
1.2.1	Das Actin-Zytoskelett kultivierter Nichtmuskelzellen . . . . .	4
1.2.2	Fokalkontakte . . . . .	5
1.2.3	Spezialisierte Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte in Muskelzellen . . . . .	7
1.2.3.1	Costamere . . . . .	7
1.2.3.2	Glanzstreifen . . . . .	9
1.3	Genetische Erkrankungen der Muskulatur . . . . .	10
1.3.1	Erkrankungen der Skelettmuskulatur . . . . .	10
1.3.2	Dilatative und hypertrophe Kardiomyopathie . . . . .	11
1.4	Ausgangspunkt und Zielstellung der Arbeit . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Verwendete Materialien . . . . .	18
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits . . . . .	18
2.1.2	Geräte . . . . .	18
2.1.3	Bakterien- und Hefe-Stämme . . . . .	19
2.1.4	Zelllinien und Primärkulturen . . . . .	20
2.1.5	Plasmide und cDNA-Bibliotheken . . . . .	20

---

2.1.6	Kulturmedien . . . . .	21
2.1.6.1	Molekularbiologie . . . . .	21
2.1.6.2	Zellkultur . . . . .	21
2.1.7	Antibiotika . . . . .	22
2.1.8	Antikörper . . . . .	22
2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	22
2.2.1	Reverse Transkription . . . . .	22
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	23
2.2.3	Zielgerichtete Mutagenese und andere, PCR-basierte Klonierungsstrategien . . . . .	23
2.2.4	Restriktionsverdau . . . . .	24
2.2.5	Gelelektrophorese . . . . .	24
2.2.6	Ligation . . . . .	24
2.2.7	Transformation in <i>E. coli</i> . . . . .	24
2.2.8	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	25
2.3	Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente . . . . .	26
2.3.1	Transformation in L40 . . . . .	26
2.3.1.1	Prätransformation . . . . .	26
2.3.1.2	Kotransformation . . . . .	26
2.3.2	Selektion auf Aminosäuremangelmedien . . . . .	27
2.3.3	$\beta$ -Galactosidase-Assays . . . . .	27
2.3.3.1	Festphasen-Assay . . . . .	27
2.3.3.2	Flüssigphasen-Assay . . . . .	28
2.3.4	Isolation von Plasmid-DNA aus Hefen . . . . .	28
2.4	Biochemische Methoden . . . . .	29
2.4.1	Expressionskulturen . . . . .	29
2.4.2	Aufreinigung rekombinanter Proteine . . . . .	29
2.4.2.1	Aufreinigung unter Verwendung des His6-Tags . . . . .	29
2.4.2.2	Aufreinigung unter Verwendung des GST-Tags . . . . .	30

---

2.4.3	Proteinbestimmungsmethoden . . . . .	30
2.4.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	30
2.4.3.2	Proteinbestimmung mit Hilfe von Extinktionskoeffizienten . . . . .	31
2.4.4	Zinkbindungsexperimente . . . . .	31
2.4.5	Thermolysin-Verdau . . . . .	31
2.4.6	Gelelektrophorese . . . . .	31
2.4.6.1	SDS-PAGE nach Laemmli . . . . .	31
2.4.6.2	SDS-PAGE nach Schägger und Von Jagow . . . . .	32
2.4.6.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese (NEPHGE) . . . . .	32
2.4.7	Proteintransfer . . . . .	33
2.4.7.1	Semidry-Methode . . . . .	33
2.4.7.2	Tankblot-Methode . . . . .	33
2.4.8	Immundetektion . . . . .	34
2.4.9	Immunpräzipitation . . . . .	34
2.4.10	Antigen-Antikörper-Blockierungsassay . . . . .	34
2.4.11	Westernblot- und Dotblot-Overlay-Experimente . . . . .	35
2.4.12	<i>In vitro</i> Phosphorylierung . . . . .	35
2.4.13	HPLC . . . . .	36
2.4.14	Massenspektrometrie . . . . .	36
2.5	Zellbiologie und Mikroskopie . . . . .	36
2.5.1	Zellkultur . . . . .	36
2.5.1.1	PtK2-Zellen . . . . .	37
2.5.1.2	HskM-Zellen . . . . .	37
2.5.1.3	C2C12-Zellen . . . . .	37
2.5.1.4	NRC . . . . .	37
2.5.2	Transiente Transfektionen . . . . .	38
2.5.3	Herstellung von Zell- und Gewebeextrakten . . . . .	38
2.5.3.1	SDS-Totalextrakte . . . . .	38
2.5.3.2	Triton-Extrakte . . . . .	38

---

2.5.4	Gefrierschnitte von Geweben . . . . .	39
2.5.5	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen und Gefrierschnitten . . .	39
2.5.5.1	Methanol-Aceton-Methode . . . . .	39
2.5.5.2	Formaldehyd-Triton-Methode . . . . .	39
2.5.6	Indirekte Immunfluoreszenz . . . . .	40
2.5.7	Mikroskopie und Bildbearbeitung . . . . .	40
2.6	Sonstige Methoden . . . . .	41
2.6.1	Bioinformatische Analysen und Werkzeuge . . . . .	41
2.6.2	Statistische Auswertung von Daten . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	Integrine und assoziierte Proteinen in differenzierenden Skelettmuskelzellen . .	42
3.2	Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Paxillin-Liganden: Ponsin . .	47
3.2.1	Identifizierung von Paxillin-Liganden mit Hilfe der Hefe-Doppel-Hybrid-Technik . . . . .	47
3.2.1.1	Ermittlung potentieller Paxillin-Liganden in einer Skelettmuskel-cDNA-Bibliothek . . . . .	47
3.2.1.2	Eingrenzung der Paxillin-Bindungsregion im Ponsin . . . . .	48
3.2.2	Biochemische Bestätigung der Paxillin-Ponsin-Interaktion . . . . .	50
3.2.2.1	Bestätigung der Bindungsregion und Spezifität der Bindung .	50
3.2.2.2	Einfluss weiterer Bindungspartner auf die Paxillin-Ponsin-Interaktion . . . . .	52
3.2.3	Klonierung einer Ponsin-cDNA . . . . .	54
3.2.3.1	Klonierungsstrategie . . . . .	54
3.2.3.2	Expression alternativ gespleißter Exone . . . . .	56
3.2.3.3	Expressionsmuster der Exone 30 und 31 in verschiedenen Muskelgeweben . . . . .	57
3.2.4	Expression und Lokalisation von Ponsin . . . . .	58
3.2.4.1	Westernblot-Analyse . . . . .	58



---

3.2.4.2	Immunfluoreszenz-Untersuchungen . . . . .	61
3.2.4.3	Expression der Skelettmuskel-spezifischen Insertion in differenzierenden Skelettmuskelzellen . . . . .	65
3.2.5	Transfektionsstudien . . . . .	67
3.2.5.1	Transfektionsstudien in Nichtmuskelzellen . . . . .	67
3.2.5.2	Transfektionsstudien in Muskelzellen . . . . .	75
3.2.6	Funktionen der Skelettmuskel-spezifischen Insertion . . . . .	78
3.2.6.1	Vermutete Funktionen aufgrund der Aminosäuresequenz . . . . .	78
3.2.6.2	Phosphorylierung der Insertion . . . . .	80
3.2.6.3	Potentielle Interaktionspartner der Insertion . . . . .	86
3.3	Die Anpassung von Zell-Matrix-Kontakten in adulten quergestreiften Muskelzellen: MLP im gesunden und erkrankten Muskelgewebe . . . . .	91
3.3.1	Die Rolle von mutierten MLP-Proteinen in Kardiomyopathien . . . . .	91
3.3.1.1	Lokalisation des Wildtyp-MLP und mutierter Formen in Nichtmuskelzellen und Kardiomyozyten . . . . .	91
3.3.1.2	Überprüfung der MLP-Mutantenproteine auf $\alpha$ -Actinin-Bindung . . . . .	92
3.3.2	Detaillierte biochemische Analyse der MLP C58G Variante . . . . .	95
3.3.2.1	Analyse der Faltung und strukturellen Stabilität . . . . .	95
3.3.2.2	Untersuchung der Bindungseigenschaften . . . . .	97
3.3.3	Charakterisierung eines monoklonalen MLP-Antikörpers . . . . .	101
3.3.3.1	Strategie und Selektion geeigneter Hybridome . . . . .	101
3.3.3.2	Charakterisierung des Antikörpers 79D2 . . . . .	102
3.3.4	Potentielle Beteiligung von MLP an Herz- und Skelettmuskel-Erkrankungen . . . . .	106
3.3.4.1	Analyse der Expression von MLP im Myokard von DCM- und HCM-Patienten . . . . .	106
3.3.4.2	Veränderte Expression von MLP im Skelettmuskel eines Mausmodelles für Kyphoskoliose . . . . .	108

---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>110</b>
4.1	Die Rolle Integrin-assoziiierter Proteine in den Zell-Matrix-Verbindungen differenzierender Skelettmuskelzellen . . . . .	110
4.2	Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Paxillin-Liganden: Ponsin . .	113
4.2.1	Paxillin interagiert mit Ponsin in differenzierenden Skelettmuskelzellen	113
4.2.2	Expression und Lokalisation von Ponsin in Muskelzellen . . . . .	115
4.2.3	Die Skelettmuskel-spezifische Insertion im Ponsin interagiert mit Nck2	118
4.3	Die Anpassung von Zell-Matrix-Kontakten in adulten quergestreiften Muskelzellen: MLP im gesunden und erkrankten Muskelgewebe . . . . .	122
4.3.1	Die Rolle von mutierten MLP-Proteinen in Kardiomyopathien . . . . .	122
4.3.2	Potentielle Beteiligung von MLP an Herz- und Skelettmuskerkrankungen . . . . .	124
4.4	Ausblick . . . . .	128
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>131</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>A</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XVII</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XVIII</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XXI</b>
<b>B</b>	<b>Ergänzende Tabellen und Abbildungen</b>	<b>XXII</b>
<b>C</b>	<b>Nuklein- und Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine</b>	<b>XXIX</b>
<b>D</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>XLII</b>
<b>E</b>	<b>Vektorkarten</b>	<b>XLIV</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Herz- und Skelettmuskulatur

Alle höher entwickelten Tiere besitzen die Fähigkeit, sich zielgerichtet zu bewegen. Diese Bewegungsvorgänge werden über die willkürlich kontrollierbare Skelettmuskulatur realisiert. Gleichzeitig gewährleistet eine spezielle Form der Muskulatur, die Herzmuskulatur, die kontinuierliche Strömung und den Rücktransport des Blutes. Beide Muskulatur-Systeme werden zusammenfassend als quergestreifte Muskulatur<sup>1</sup> bezeichnet, in der spezialisierte Zellen mechanische Kräfte generieren: Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) sind zylindrische oder Y-förmige, 50–120  $\mu\text{m}$  lange Zellen mit ein bis zwei Zellkernen. Im Gegensatz dazu sind Skelettmuskelzellen (Myotuben) polynukleäre, zylindrische Synzytien von 1–40 mm Länge, die durch Fusion von bis zu 100 Vorläuferzellen entstehen. Ein gemeinsames Merkmal beider Zelltypen ist ihr quergestreiftes Erscheinungsbild im Längsschnitt, das durch die regelmäßige Anordnung von dünnen und dicken Filamenten in den kontraktilen Elementen, den Myofibrillen, hervorgerufen wird.

---

<sup>1</sup>Im nachfolgenden Text wird der Begriff „Muskelzellen“ synonym für „quergestreifte Muskelzellen“ verwendet; werden Glattmuskelzellen in die Betrachtung eingeschlossen, ist dies explizit erwähnt.

### 1.1.1 Kraftgenerierung und Kraftübertragung

Die kleinste sich wiederholende Einheit der Myofibrillen ist das Sarkomer. Der schematische Aufbau ist in Abb. 1.1 skizziert. Das dünne Filamentsystem, das von Actin und assoziierten Proteinen gebildet wird, ist in den Z-Scheiben verankert. Das von Myosin und assoziierten Proteinen gebildete System dicker Filamente ist in der M-Bande verankert. Ein drittes Filamentsystem, dessen Hauptkomponente Titin darstellt, gewährleistet die elastische Verknüpfung von Z-Scheibe und M-Bande. Für eine detaillierte Beschreibung dieser Strukturen sei auf Clark *et al.* (2002a) verwiesen.

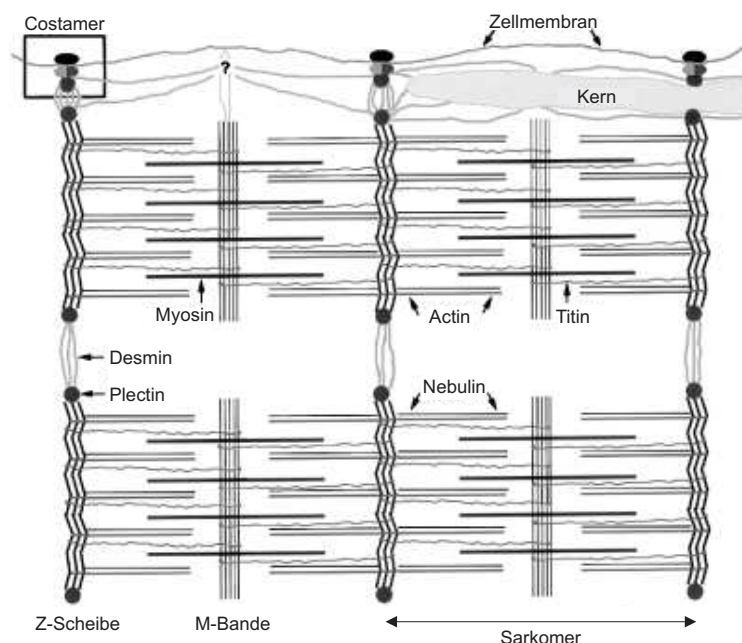


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Sarkomere. Zusätzlich dargestellt sind Strukturelemente der Kraftübertragung (z. B. das Desmin-Filament-System und die Costamere); nach Carlsson und Thornell (2001). Anmerkung: Das Protein Nebulin wird nur im Skelettmuskel exprimiert.

Unter Energieverbrauch können die dünnen und dicken Filamente ineinander gleiten („Gleit-filamenttheorie“, vgl. Huxley und Niedergerke, 1954; Huxley und Hanson, 1954) und so die mechanische Kraft der Muskelkontraktion generieren. Auf molekularer Ebene wird die Bewegung durch Konformationsänderungen im Myosin-Molekül nach Hydrolyse von Adenosin-triphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und unterschiedliche Affinitäten ADP- und ATP-beladener Myosine zu Actin realisiert („Querbrückenzyklus“, Lynn und Taylor, 1971).

Für die Übertragung der generierten mechanischen Kraft auf die umgebende extrazelluläre Matrix bzw. benachbarte Zellen muß der kontraktile Apparat der Myofibrillen mechanisch mit diesen Strukturen verbunden werden. Daran ist zum einen ein Netzwerk von Desmin-haltigen Intermediärfilamenten beteiligt, zum anderen wird die Verbindung über die Zellmembran durch Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte (z. B. Costamere und Glanzstreifen) realisiert.

Sarkomere sind in der Lage, auf extra- und intrazelluläre Stimuli zu reagieren und ihre Eigenschaften an veränderte Bedingungen anzupassen. Als Beispiel seien vielfältige Regulationsmechanismen des Titin-Filamentsystems aufgezählt: Titin verfügt über eine Kinaseaktivität, die durch autoregulatorische Phosphorylierungsereignisse kontrolliert wird (Mayans *et al.*, 1998). Die Bindung des Titin-Moleküls an  $\alpha$ -Actinin, eine Komponente der Z-Scheibe, wird durch eine Phospholipid-abhängige, intramolekulare Interaktion des Liganden reguliert (Young und Gautel, 2000). Ebenso zeigt das M-Banden-Molekül Myomesin nach Phosphorylierung durch die Proteinkinase A eine verminderte Affinität an Titin (Obermann *et al.*, 1997). Ein ungewöhnlicher Mechanismus könnte sogar die Steifheit der elastischen Elemente im Titin kontrollieren: Es wurde vorgeschlagen, dass reversible Disulfid-Brücken innerhalb der Immunglobulin-Domänen ausgebildet werden können, um die mechanischen Eigenschaften des Titins in Antwort auf oxidativen Stress zu modulieren (Mayans *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Differenzierung von Skelettmuskelzellen

Eine Besonderheit von Skelettmuskelzellen ist, dass sie während der Embryonalentwicklung aus der Fusion vieler Vorläuferzellen hervorgehen. Nach Induktion des myogenen Programmes werden proliferierende Myoblasten mitotisch arretiert und fusionieren zu vielkernigen Synzytien. Infolge der Aktivierung myogener Transkriptionsfaktoren (z. B. MyoD, Myogenin) beginnen diese Zellen, muskelspezifische Proteine zu synthetisieren (z. B. Titin, sarkomere Actin- und Myosin-Isoformen) und in Myofibrillen zu assemblieren. Schließlich reifen die Myotuben zu kontraktilen Zellen und bilden spezialisierte Zell-Matrix-Kontakte, die Costamere, aus (Fürst *et al.*, 1989).

Ähnliche Differenzierungsvorgänge treten auch bei Regenerationsprozessen in der adulten Muskulatur auf: Ruhende, einkernige Stammzellen, die sogenannten Satellitenzellen, werden

bei Verletzungen von Muskelzellen aktiviert und beginnen, sich zu teilen. Sie fusionieren miteinander oder mit geschädigten Myotuben und durchlaufen gleichzeitig das oben beschriebene myogene Programm (Charge und Rudnicki, 2004).

Es ist möglich, Satellitenzellen aus Skelettmuskel-Biopsien zu isolieren, *in vitro* zu kultivieren und zur Differenzierung anzuregen (Van der Ven, 2001). Mit diesen humanen Skelettmuskelzellen (HSkM) steht ein wertvolles Modellsystem zur Verfügung, um Teilaspekte – z. B. die Umorganisation des Zytoskeletts während der Differenzierung – im Detail zu untersuchen.

## 1.2 Das Zytoskelett

Alle eukaryontischen Zellen verfügen über verschiedene Zytoskelett-Systeme, die für die Gestalt und Bewegung der Zellen sowie für Transportvorgänge innerhalb der Zellen Voraussetzung sind. Aufgrund des Durchmessers der beteiligten Filamente unterscheidet man das Mikrofilamentsystem, bestehend aus polymerisiertem Actin (F-Actin) und assoziierten Proteinen, das Intermediärfilamentsystem und das Mikrotubulsystem.

Nachfolgend sollen einige Aspekte des Actin-assoziierten Zytoskeletts von Nichtmuskelzellen und Muskelzellen erläutert werden.

### 1.2.1 Das Actin-Zytoskelett kultivierter Nichtmuskelzellen

Das Actin-Zytoskelett ist maßgeblich an den Bewegungsvorgängen von Zellen beteiligt. Die Dynamik seiner vielfältigen Gestalt wird durch die Aktivität Actin-bindender Proteine bestimmt (zusammengefasst in Schmidt und Hall, 1998).

Kultivierte adhärente Zellen bieten ein leicht zugängliches Modellsystem, das es ermöglicht, die Struktur und Dynamik des Actin-Zytoskeletts zu studieren. Je nach Grad der Motilität sind in den Zellen verschiedene Zytoskelettstrukturen mehr oder weniger stark ausgeprägt. Beispielsweise sind motile Zellen durch Lamellipodia charakterisiert, ein Netzwerk von dynamischen, verzweigten Actin-Filamenten. Im Gegensatz dazu bilden weniger motile Zellen vermehrt Stressfasern und Fokalkontakte aus (Abb. 1.2). Stressfasern sind Bündel kontraktiler Actinfilamente, die u. a. Myosin II-Moleküle enthalten und in denen  $\alpha$ -Actinin-haltige Struktu-

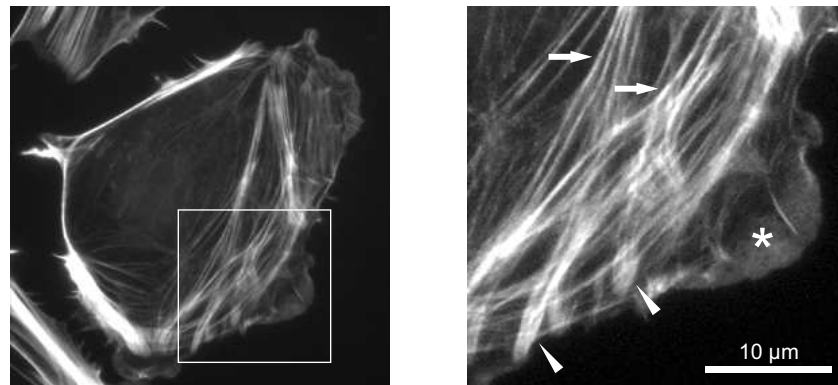


Abbildung 1.2: Das Actin-Zytoskelett von Nichtmuskelzellen. Dargestellt sind F-Actin-haltige Strukturen (angefärbt mit Phalloidin) einer PtK2-Zelle (*links*). Der markierte Bereich ist zusätzlich vergrößert dargestellt (*rechts*). Deutlich zu erkennen sind Stressfasern (Pfeile), die in Fokalkontakten (Pfeilspitzen) enden, sowie ein Lamellipodium (\*).

ren, die *dense bodies*, die Actinfilamente in periodischen Abständen verankern. Damit ähneln Stressfasern in ihrer prinzipiellen Architektur den Myofibrillen der Muskelfasern (Kreis und Birchmeier, 1980). Über spezialisierte Zell-Matrix-Kontakte an ihren Enden, die Fokalkontakte, sind Stressfasern in der Lage, Spannung aufzubauen und diese auf die extrazelluläre Matrix zu übertragen. Diese Kontraktilität von Zellen kann nicht nur *in vitro* beobachtet werden, sie spielt auch eine wichtige Rolle bei der durch Myofibroblasten vermittelten Wundheilung (Hinz und Gabbiani, 2003).

## 1.2.2 Fokalkontakte

Die Fokalkontakte kultivierter, adherenter Säugerzellen gehören zu den am besten charakterisierten Zell-Matrix-Verbindungen mit einer Vielzahl identifizierter Komponenten (Zamir und Geiger, 2001). Exemplarisch können hier nur wenige Schlüsselkomponenten genannt werden (Abb. 1.3): Integrine sind heterodimere Transmembran-Proteine, die aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Es existieren nach heutigem Kenntnisstand 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten. Diese werden zu mehr als 24 verschiedenen Integrinen kombiniert (Rupp und Little, 2001), die mit verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix interagieren, z. B. mit Collagen, Laminin oder Fibronectin (zusammengefasst in Stupack und Cheresch, 2002).

Verschiedene Adapterproteine können an den zytoplasmatischen Teil der Integrine binden: z. B.

Vinculin,  $\alpha$ -Actinin, Talin und Paxillin (zusammengefasst in Hemler, 1998). Diese Proteine rekrutieren zusammen mit den Integrinen Signaltransduktionsmoleküle in die Fokalkontakte. Stellvertretend seien hier nur die Proteinkinasen Src, *focal adhesion kinase* (FAK) und *integrin linked kinase* (ILK) genannt (Hannigan *et al.*, 1996; Critchley, 2000).

Weiterhin sind viele dieser Adapterproteine entweder direkt (z. B. Vinculin,  $\alpha$ -Actinin, Filamin, Talin, Zyxin) oder indirekt mit dem Actin-Filamentsystem verknüpft bzw. interagieren mit Proteinen, die die Dynamik des Actin-Zytoskelletts regulieren, wie z. B. Ena/VASP und Nck (Campellone *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Renfranz und Beckerle, 2002).

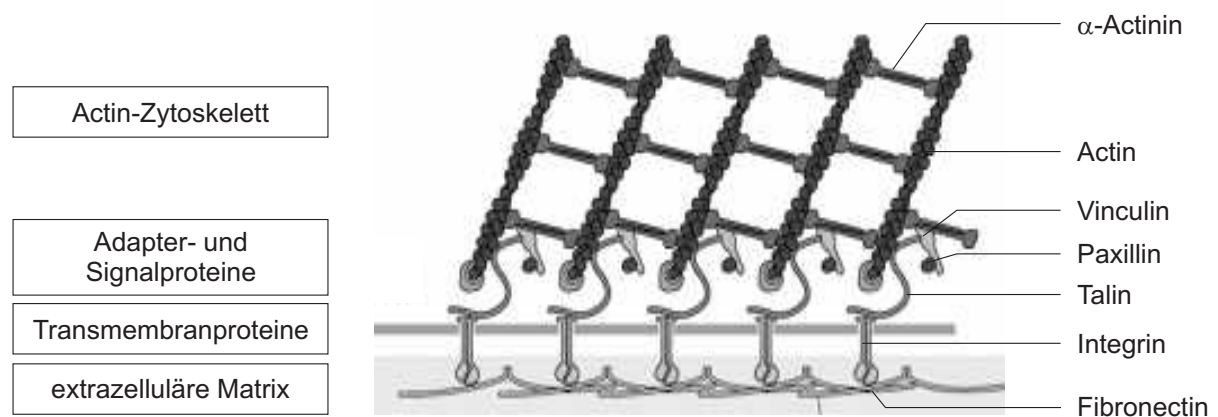


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau von Fokalkontakten. Die Fokalkontakte stellen eine Verbindung der Actin-haltigen Stressfasern zu Proteinen der extrazellulären Matrix dar, die über Transmembran-Proteine (Integrine) und Actin-assoziierte Adapter- und Signalproteine realisiert wird. Es sind nur ausgewählte Proteine dargestellt (aus Alberts *et al.*, 2002; modifiziert).

Morphologisch werden drei Typen von Fokalkontakten unterschieden – *focal complexes*, *focal adhesions* und *fibrillar adhesions* – die hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung ebenfalls differieren (Tab. 1.1). Auch innerhalb dieser Gruppen weisen die Fokalkontakte eine erstaunliche Heterogenität in ihrer Proteinzusammensetzung in Abhängigkeit von Zelltyp, Entwicklungsstadien sowie intra- und extrazellulären Stimuli auf (Zamir *et al.*, 1999).

Fokalkontakte stellen nicht nur mechanische Verbindungen des Zytoskelletts zur extrazellulären Matrix dar, sie sind vielmehr auch in der Lage, Signale zu detektieren und weiterzuleiten. Im Speziellen werden Fokalkontakte als Mechanosensoren diskutiert (zusammengefasst in Geiger und Bershadsky, 2002; Bershadsky *et al.*, 2003). Als Antwort auf lokal detektierte Kräfte finden Umbauprozesse in den Zell-Matrix-Strukturen statt, deren Dynamik maßgeblich von den Tyrosin-Kinasen FAK und Src – unter Kontrolle der GTPasen Rac und Rho –



Tabelle 1.1: Charakteristika verschiedener Typen von Fokalkontakten (nach Geiger *et al.*, 2001). (\*) pTyr - Proteine, die an Tyrosinresten phosphoryliert sind.

	<i>focal complexes</i>	<i>focal adhesions</i>	<i>fibrillar adhesions</i>
Lage	Rand von Lamellipodia	Zellperipherie	zentrale Regionen der Zelle
Morphologie	punktförmig	oval bis elongiert	perlenschnurartig
Größe	1 $\mu\text{m}$	2–5 $\mu\text{m}$	1–10 $\mu\text{m}$ (variabel)
typische Proteine	Paxillin Vinculin pTyr(*)	$\alpha_V$ Integrin Paxillin Vinculin Talin FAK pTyr(*)	$\alpha_5$ Integrin Tensin Vinculin

mitbestimmt wird. Umgekehrt können die Fokalkontakte aktiv die selektive Umorganisation von Komponenten der extrazellulären Matrix bewirken (Geiger *et al.*, 2001).

Diese Tatsachen machen deutlich, dass Fokalkontakte bidirektionale Signaltransduktionszentren sind, die Signale von außen in die Zelle und umgekehrt weiterleiten können.

## 1.2.3 Spezialisierte Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte in Muskelzellen

### 1.2.3.1 Costamere

Costamere, die lateralen Strukturen der Kraftübertragung in Herz- und Skelettmuskelzellen, wurden ursprünglich als Vinculin-haltige, rippenförmige Gebilde beschrieben, die unter der Zellmembran auf Höhe der Z-Scheiben der Myofibrillen liegen (Abb. 1.4; Pardo *et al.*, 1983). Bezüglich ihrer Proteinzusammensetzung zeigen sie eine gewisse Analogie zu anderen Zell-Matrix-Kontakten: Sie enthalten Vinculin, Talin und  $\beta_1$ -Integrin (zusammengefasst in Small *et al.*, 1992). Die Spezialisierung der Costamere wird ebenfalls in ihrer Ausstattung mit muskelspezifischen Proteinkomponenten bzw. Isoformen deutlich: z. B. sind die muskelspezifischen Proteine Dystrophin (Byers *et al.*, 1991; Masuda *et al.*, 1992), *muscle LIM protein*<sup>2</sup> (MLP; Flick und Konieczny, 2000) und Melusin (Brancaccio *et al.*, 1999) sowie die muskelspezifische Filamin Isoform C (Thompson *et al.*, 2000) als costamerische Komponenten beschrieben worden.

<sup>2</sup>weitere Namen: *cysteine rich protein 3* (CRP3) bzw. *cardiac LIM protein* (CLP)

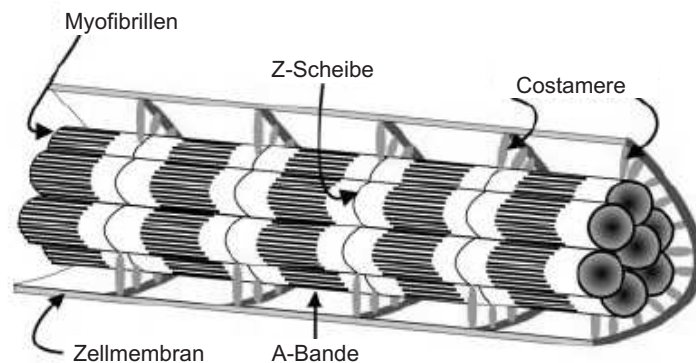


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Lokalisation von Costameren im Muskel (aus Ervasti, 2003).

Im Verlauf der Muskeldifferenzierung bilden sich Costamer-Strukturen relativ spät aus. In Myoblasten und frühen Myotuben treten punktförmige Fokalkontakte auf. Später bilden sich einzelne längsgestreckte Zell-Matrix-Kontakte, die *primary longitudinal adhesion sites* (PLAS), aus denen die Costamere hervorgehen, wenn die Zellen Kontraktilität erlangen (Schröder *et al.*, 2002). Auch im adulten Muskel ist die Stabilität der Costamere mit der Kontraktilität der Zellen verknüpft. Wird diese z. B. pharmakologisch durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Nifedipin blockiert, erfolgt ein rascher Umbau der costamerischen Strukturen (Sharp *et al.*, 1997).

Viele Tatsachen weisen darauf hin, dass die Costamere neben der mechanischen Kraftübertragung auf die extrazelluläre Matrix (Danowski *et al.*, 1992) ebenfalls eine wichtige Funktion in der Detektion und Transduktion von Signalen wahrnehmen. Untersuchungen an Mausmodellen unterstützen das Konzept eines costamerischen Mechanosensors: MLP-defiziente Mäuse entwickeln eine dilatative Kardiomyopathie mit hypertrophen Kardiomyozyten (s. Abschnitt 1.3.2; Arber *et al.*, 1997; Ehler *et al.*, 2001). Auf molekularer Ebene könnte MLP über die Interaktion mit den Proteinen Telethonin und Titin den Dehnungszustand der Kardiomyozyten detektieren und ein Wegfall dieser Funktion in MLP *knock out* Tieren zur Erkrankung führen (Knöll *et al.*, 2002).

Die Costamere sind sicherlich auch Orte der Signalübertragung weiterer Signalwege: Beispielsweise bewirkt eine myokardiale Ischämie eine dramatische Reorganisation des Proteins Vinculin (Ganote und Heide, 1987; Steenbergen *et al.*, 1987). Weiterhin wurde Ponsin, das ebenfalls als costamerisches Protein identifiziert wurde (Mandai *et al.*, 1999), ausgiebig in Adipozyten untersucht, wo es eine kritische Rolle in einem Phosphatidylinositol-3-Kinase-unabhängigen

Signalweg der insulinvermittelten Glucoseaufnahme spielt (Baumann *et al.*, 2000). Untersuchungen in L6-Myotuben zeigen jedoch, dass die Erkenntnisse über diese Signalkaskade nicht ohne weiteres auf Muskelzellen übertragbar sind (JeBailey *et al.*, 2004).

Die Anwesenheit einer Vielzahl solcher Signaltransduktionsmoleküle in den Costameren wirft die Frage auf, welche Signalübertragungen an den Costameren stattfinden und wie diese zeitlich und räumlich koordiniert werden.

### 1.2.3.2 Glanzstreifen

Glanzstreifen (*Disci intercalares*) sind spezialisierte Zell-Zell-Verbindungen der Herzmuskelzellen, in denen drei Arten von Zell-Zell-Kontaktstrukturen die mechanische und chemische Verbindung benachbarter Zellen gewährleisten (Abb. 1.5; Perriard *et al.*, 2003).

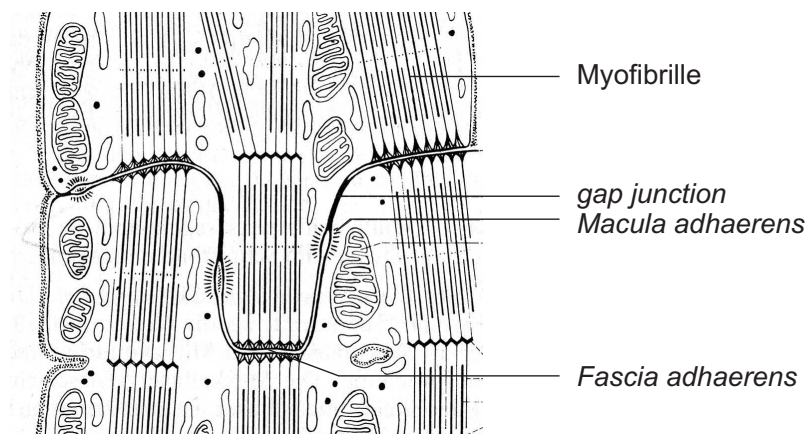


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Glanzstreifen (aus Leonhardt, 1990.) Glanzstreifen verbinden benachbarte Herzmuskelzellen miteinander, wobei verschiedene Arten von Zell-Zell-Kontakten (*Maculae adhaerentes*, *Fasciae adhaerentes* und *gap junctions*) eine mechanische und chemische Kopplung gewährleisten. Nähere Erläuterungen im Text.

Die transversale Strecke der stufenförmigen Glanzstreifen wird von *Fasciae adhaerentes* gebildet, in denen transmembrane Cadherine die Myofibrillen über zytoplasmatische Proteine (z. B. Catenin, Plakoglobin und *nebulin-related anchoring protein*; N-RAP) verankern. In den longitudinalen Abschnitten sind *Maculae adhaerentes* (Desmosomen) und *gap junctions* ausgebildet. Die Desmosomen verbinden die Intermediärfilamentsysteme benachbarter Zellen miteinander und sorgen so für eine mechanische Stabilisierung. Als Schlüsselkomponenten dieser Strukturen sind die transmembranen Proteine Desmoglein und Desmocollin sowie die zytoplasmatischen Proteine Desmoplakin, Plakophilin und Plakoglobin zu nennen. Die *gap junctions* be-

stehen hauptsächlich aus dem Transmembranprotein Connexin, welches hexamere Ionenkanäle zwischen benachbarten Zellen ausbildet, die der chemischen Kommunikation dienen.

Da bei der dilatativen Kardiomyopathie (s. Abschnitt 1.3.2) morphologische Veränderungen in den Glanzstreifen beobachtet wurden (Perriard *et al.*, 2003), ist davon auszugehen, dass auch diese Strukturen mechanische Signale detektieren und als Antwort Umorganisationsprozesse einleiten können.

## **1.3 Genetische Erkrankungen der Muskulatur**

### **1.3.1 Erkrankungen der Skelettmuskulatur**

Bereits im Jahre 1868 wurde die Duchenne-Muskeldystrophie als Erbkrankheit des Bewegungsapparates beschrieben, aber erst mehr als ein Jahrhundert später konnten Deletionen im Dystrophin-Gen als Ursache dieser Erkrankung nachgewiesen werden (Monaco *et al.*, 1986). Die Identifizierung von Krankheitsgenen kann Aufschlüsse über funktionelle Zusammenhänge in der Muskulatur liefern. Ungeklärt ist beispielweise noch, über welche Mechanismen Mutationen in verschiedenartigen Proteinen – wie z. B. dem Kernhüllen-Protein Lamin A/C, der Protease Calpain 3, den transmembranen Sarkoglycanen, dem Z-Banden-Protein Telethonin sowie der Hauptkomponente des elastischen Filamentsystems (Titin) – das gleiche Krankheitsbild der Gliedergürteldystrophie (LGMD) verursachen (zusammengefasst in Bushby, 1999; Nigro, 2003).

Auch Mutationen in Genen, die für Proteine der Kraftübertragung kodieren, z. B. für das Intermediärfilamentprotein Desmin, können Muskelerkrankungen auslösen. Das Krankheitsbild ist in diesem Fall heterogen und mikroskopisch durch die Ablagerung von Desmin und assoziierten Proteinen in Plaques gekennzeichnet (Goldfarb *et al.*, 2004).

Es ist bekannt, dass Mutationen im Dystrophin Muskeldystrophien vom Duchenne- und Becker-Typ auslösen können (zusammengefasst in Biggar *et al.*, 2002). Andere Komponenten des Dystrophin-Glycoproteinkomplexes wurden als Krankheitsgene für Gliedergürteldystrophien (LGMD2C-2F) identifiziert (Bushby, 1999). Weiterhin stellen Gene, die für Proteine in den Integrin-assoziierten Strukturen der Costamere kodieren, Kandidatengene für Myopathien dar: Von Hayashi *et al.* (1998) wurde eine kongenitale Muskeldystrophie mit autosomal-rezessivem

Erbgang beschrieben, die durch Mutationen in der  $\alpha_7$ -Untereinheit des Integrins verursacht wird. In den betroffenen Patienten war immunologisch kein  $\alpha_7$ -Integrin nachweisbar, obwohl  $\alpha_7\beta_1$ -Heterodimere die dominierende Integrin-Form des gesunden Skelettmuskels darstellen (Mayer, 2003). Die Hypothese, dass die Integrität der Costamere für die Muskelfunktion notwendig ist, wird durch den Befund unterstützt, dass Integrin- $\alpha_7$  *knock out* Mäuse ebenfalls eine progressive Muskeldystrophie zeigen (Mayer *et al.*, 1997).

### 1.3.2 Dilatative und hypertrophe Kardiomyopathie

Kardiomyopathien sind definiert als „Erkrankungen des Myokards, die mit einer kardialen Dysfunktion assoziiert sind“ (World Health Organization, 1996). Unter diesem Begriff werden primäre und sekundäre Erkrankungen zusammengefasst: Primäre Kardiomyopathien sind solche, denen eine genetische Ursache zugrunde liegt sowie solche, für die keine Ursache bekannt ist („idiopathisch“). Sekundäre Kardiomyopathien sind Erkrankungen infolge von entzündlichen Prozessen, Intoxikationen oder anderen Erkrankungen.

Die beiden häufigsten Formen der Kardiomyopathie, die dilatative und die hypertrophe Kardiomyopathie, sollen nachfolgend näher erläutert werden.

**Dilatative Kardiomyopathie (DCM)** Die DCM ist durch eine Erweiterung (Dilatation) des linken oder beider Ventrikel und eine Erhöhung des enddiastolischen Volumens gekennzeichnet (Abb. 1.6, C). Klinisch äußert sich die Erkrankung in einer linksventrikulären Funktionsstörung, aus der eine terminale Herzinsuffizienz resultieren kann. Aus diesem Grund stellt die DCM eine der häufigsten Ursachen für Herztransplantationen dar, obwohl die Prävalenz mit 36 pro 100 000 Einwohner niedrig ist. Etwa ein Drittel der Erkrankungen wird durch eine Myokarditis hervorgerufen, für weitere circa 25 % der Patienten wird eine genetische Beteiligung angenommen. In diesen Fällen wurden vor allem autosomal-dominante, seltener auch X-chromosomale bzw. mitochondriale Erbgänge beobachtet (Seidman und Seidman, 2001).

**Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)** Die HCM ist mit einer Prävalenz von 1:500 eine der häufigsten vererbaren Herzmuskelerkrankungen und die häufigste Ursache des plötzlichen Herztodes bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen (Maron *et al.*, 1995). Sie ist gekennzeich-

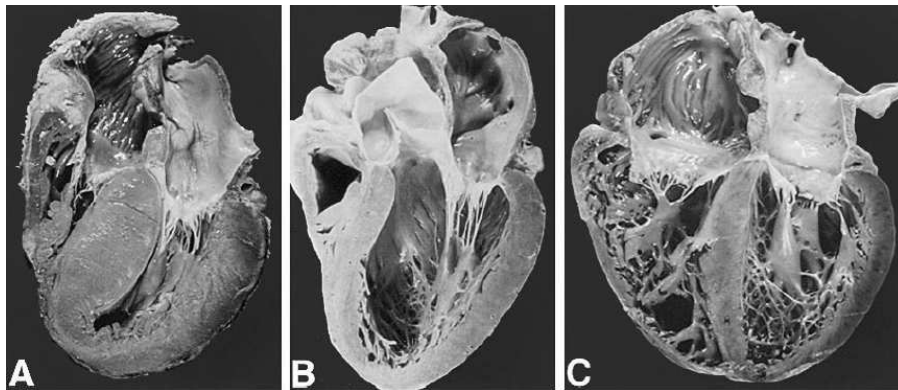


Abbildung 1.6: Morphologische Veränderungen des Herzens bei HCM und DCM. Dargestellt sind das Herz eines HCM-Patienten (A), ein gesundes Herz (B) sowie das Herz eines DCM-Patienten (C). Deutlich erkennbar ist die Verdickung der Kammerwände (insbesondere des Septums) bei der HCM (A) bzw. die Erweiterung der Ventrikel bei der DCM (C); aus Seidman und Seidman (2001).

net durch eine Zunahme der Kammerwanddicken (Abb. 1.6, A). Klinisch werden häufig eine diastolische Dysfunktion und Arrhythmien beobachtet, letztere erhöhen das Risiko eines plötzlichen Herztodes. Die Patienten sind oft lange Zeit asymptomatisch, in der Regel treten erst mit zunehmendem Alter Beeinträchtigungen der kardialen Leistungsfähigkeit auf (*late onset disease*). Auch muss ein genetischer Defekt nicht zwangsläufig zur Erkrankung führen (unvollständige Penetranz); einige Mutationsträger weisen selbst dann keine Krankheitsanzeichen auf, wenn echokardiographisch bereits Veränderungen des Herzens diagnostiziert wurden (Spirito *et al.*, 1997).

Histologisch ist die Erkrankung typischerweise durch eine Hypertrophie der Myozyten, pleomorphe Zellkerne, eine Disorganisation der myofibrillären Zytoarchitektur (*myocyte disarray*) und eine interstitielle Fibrose charakterisiert (Hughes, 2004).

Man geht davon aus, dass fast alle Erkrankungsfälle genetisch bedingt sind, wobei autosomal-dominante Mutationen, überwiegend in Sarkomerproteinen, dominieren (Elliott und McKenna, 2004).

Es wurde zunächst davon ausgegangen, dass die HCM durch Mutationen in Sarkomerproteinen (Thierfelder *et al.*, 1994) und eine dadurch bedingte gestörte Kontraktilität des Myokards hervorgerufen wird (Marian, 2000). Im Gegensatz dazu wurde die DCM als eine Erkrankung des kardialen Zytoskeletts diskutiert (Towbin, 1998). Mit der Identifizierung neuer Krankheitsgene (s. Tab. 1.2) zeichnete sich jedoch ab, dass diese Hypothesen einer Revision bedürfen: So wur-

den Sarkomerproteine auch als Krankheitsgene der DCM identifiziert. Beispielsweise können Mutationen im Gen der schweren Kette des  $\beta$ -Myosins sowohl HCM als auch DCM auslösen. Auch Untersuchungen im Tiermodell implizieren, dass DCM und HCM nicht als unabhängige Krankheiten aufgefasst werden sollten, sondern vielmehr als unterschiedliche Ausprägungen des pathologischen Spektrums zu verstehen sind (Freeman *et al.*, 2001).

Tabelle 1.2: Identifizierte Krankheitsgene der HCM und DCM (Auswahl; nach Seidman und Seidman, 2001; Sangiorgi, 2003; Elliott und McKenna, 2004).

	<b>Krankheitsgen</b>	<b>Genlocus</b>	<b>Häufigkeit</b>
<b>DCM</b>	$\beta$ -Myosin schwere Kette	14q1	
	kardiales Actin	15q14	
	Troponin T	1q32	
	Desmin	2q35	
	Dystrophin	Xp21	
	Lamin A/C	1q21	
	MLP	11p15	
<b>HCM</b>	$\beta$ -Myosin schwere Kette	14q1	35 %
	Myosin-Bindungsprotein C	11p11	15 %
	Troponin T	1q32	15 %
	Troponin I	19q13	5 %
	$\alpha$ -Tropomyosin	15q22	1,3 %
	essentielle leichte Kette des Myosins	3p21	1 %
	regulatorische leichte Kette des Myosins	12q24	1 %
	kardiales Actin	15q14	
	Titin	2q31	
	MLP	11p15	
	$\gamma$ 2-Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase	7q36	

## 1.4 Ausgangspunkt und Zielstellung der Arbeit

Umfassende Kenntnisse über den Aufbau der kraftübertragenden Strukturen in quergestreiften Muskelgeweben und die darin ablaufenden Signaltransduktionsprozesse sind Grundvoraussetzungen, um die veränderte molekulare Situation in erkranktem Gewebe verstehen zu können. Auf diesem Wissen könnten zukünftige therapeutische Ansätze beruhen, die nicht bei der Linderung von Symptomen ansetzen, sondern eine Rückkehr zur molekularen Ausgangssituation zum Ziel haben.

Um die Kenntnisse über die Strukturen der Kraftübertragung in quergestreiften Muskelzellen, insbesondere der Costamere, zu erweitern, wurde diese Thematik mit zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht: Zum einen sollte eine detaillierte Analyse der Zell-Matrix-Kontakte differenzierender Skelettmuskelzellen Erkenntnisse über die Genese der Costamere während der Differenzierung geben. Zum anderen wurden die Strukturen der Kraftübertragung im adulten Muskel analysiert.

Ausgehend von der Hypothese, dass die Zell-Matrix-Kontakte neben einer rein mechanischen Kraftübertragung eine wichtige Funktion bei der Detektion und Transduktion von Signalen haben, war das Ziel beider Ansätze nicht nur eine beschreibende Charakterisierung der Strukturen und ihrer Proteinzusammensetzung, vielmehr sollten Hinweise auf Signalübertragungen in den Strukturen gefunden werden.

Den Ausgangspunkt für die Untersuchung von Differenzierungsvorgängen stellten Immunfluoreszenz-Analysen von *in vitro* differenzierenden HSkM-Zellen dar. Es wurde versucht, die Entwicklung der Costamere in diesen Zellen durch Anfärbung von „klassischen“ Fokalkontakt-Proteinen zu beschreiben. Während dieser morphologischen Vorarbeiten zeichnete sich früh ab, dass die Signalwege, welche die Dynamik der Fokalkontakte in kultivierten Nichtmuskelzellen maßgeblich beeinflussen, keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle in Skelettmuskelzellen spielen (s. Kapitel 3.1).

Damit warf sich die Frage auf, welche – noch unidentifizierten – Signaltransduktionsprozesse die Entwicklung der Zell-Matrix-Kontakte während der Muskeldifferenzierung bestimmen. Um mehr über die Natur dieser Signalwege zu erfahren, sollten involvierte Signalmoleküle identifiziert und ihre Funktion in den Zell-Matrix-Verbindungen charakterisiert werden. Dabei



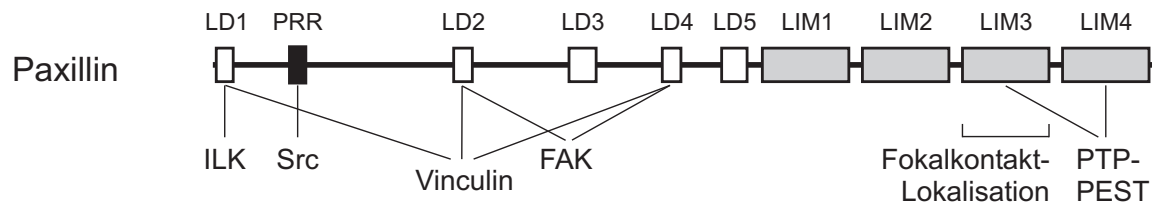


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Proteins Paxillin. Die Lage der LD-Motive (LD1–5, weiße Boxen), der Prolin-reichen Region (PRR, schwarze Box) und der LIM-Domänen (LIM1–4, graue Boxen) ist gekennzeichnet, ebenso die Bindungsregionen ausgewählter Interaktionspartner.

schien der Ansatz vielversprechend, Bindungspartner eines bekannten Adapterproteins zu suchen, das sowohl in Fokalkontakten kultivierter, adhärenter Nichtmuskelzellen als auch in Zell-Matrix-Kontakten differenzierender Skelettmuskelzellen exprimiert wird. Als Ausgangspunkt wurde daher das Protein Paxillin gewählt (Salgia *et al.*, 1995): Dieses Protein ist ein klassisches Adapterprotein in Fokalkontakten (Turner *et al.*, 1990) und vermittelt eine Vielzahl transientser Protein-Protein-Interaktionen (Abb. 1.7; Turner, 2000). Dazu zählen mehrere Signalmoleküle, z. B. FAK (Turner und Miller, 1994), ILK (Nikolopoulos und Turner, 2001) sowie die Phosphatase PTP-PEST (Shen *et al.*, 1998). Im sich entwickelnden Embryo wurde Paxillin primär in allen mesodermal-abgeleiteten Strukturen nachgewiesen (Hagel *et al.*, 2002). Eine kritische Bedeutung des Proteins für die Embryonalentwicklung wurde durch Studien von Paxillin *knock out* Mäusen belegt. Diese Tiere sterben bereits sehr früh (E 9.5) und zeigen Defekte in den Somiten (aus denen die Skelettmuskelzellen entstehen) und im Herzen (Hagel *et al.*, 2002). Experimente mit isolierten Kardiomyozyten dieser Embryonen zeigten jedoch, dass die Herzmuskelzellen prinzipiell in der Lage sind, zu spontan kontraktile Kardiomyozyten zu differenzieren. Dies legt nahe, dass Paxillin nicht primär zur Assemblierung der Myofibrillen benötigt wird, sondern eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung zwischen Zellen bzw. zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix spielt.

Mit Hilfe der Hefe-Doppel-Hybrid-Technik wurde das Signalmolekül Ponsin als Bindungspartner des Paxillins identifiziert. Die Interaktion beider Proteine sollte eingehend charakterisiert und ausgehend davon die Funktionen des Ponsins in Hinblick auf Signalvorgänge in differenzierenden Skelettmuskelzellen beleuchtet werden (s. Kapitel 3.2).

Mit einem zweiten Ansatz wurden die Strukturen der Kraftübertragung im adulten Gewebe in die Untersuchungen einbezogen. In Hinblick auf die Thematik, wie an diesen Orten Signale detektiert und verarbeitet werden, ist insbesondere die Frage interessant, wie diese Strukturen auf veränderte molekulare Situationen reagieren. So stellt sich beispielsweise im Fall der hypertrophen Kardiomyopathien die Frage, warum Veränderungen im Myokard erst nach Jahren oder sogar Jahrzehnten die Leistungsfähigkeit des Herzens beeinträchtigen, obwohl die genetische Ursache der Erkrankung bereits seit Geburt des Patienten besteht.

Konkret wurde dieser Themenkomplex am Beispiel des Proteins MLP untersucht. Die Untersuchung dieses Proteins erschien aus verschiedenen Gesichtspunkten interessant: MLP ist ein muskelspezifisches CRP-Protein, das in Kardiomyozyten und langsamen (Typ I) Skelettmuskelzellen exprimiert wird (Arber *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1999). In diesen Zellen sind verschiedene Lokalisationen beschrieben worden: MLP wurde einerseits als Kernprotein (Arber *et al.*, 1994; Kong *et al.*, 1997), andererseits auch als Zytoskelett-assoziiertes Protein (Louis *et al.*, 1997) identifiziert. Die genaue zytoplasmatische Lokalisation wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Obwohl das Protein nach Arber *et al.* (1994, 1997) in den Z-Scheiben lokalisiert ist, deuten Arbeiten von Flick und Konieczny (2000) und die identifizierten Bindungspartner N-RAP (Ehler *et al.*, 2001) und  $\beta$ -Spectrin (Flick und Konieczny, 2000) darauf hin, dass MLP als *dual compartment protein* auch eine funktionelle Rolle in den Strukturen der Kraftübertragung, z. B. in den Costameren und Glanzstreifen, einnimmt (Abb. 1.8) und dort als Komponente eines Mechanosensors fungiert (Knöll *et al.*, 2002).

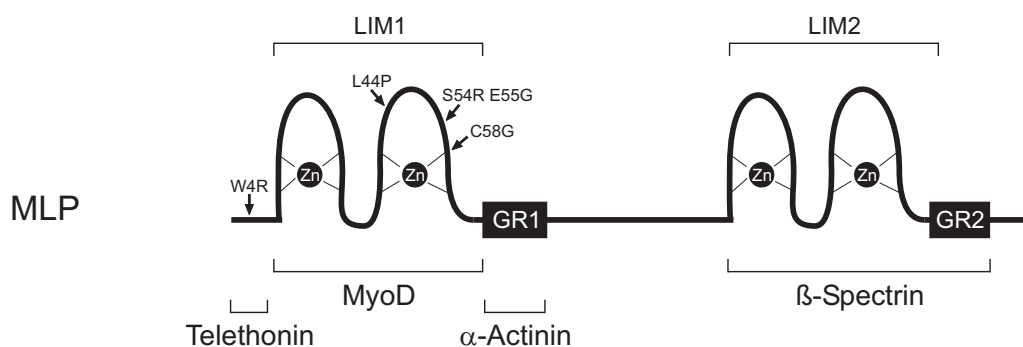


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des Proteins MLP. Die Lage der LIM-Domänen (LIM1 und LIM2) sowie der sich anschließenden Glycin-reichen Abschnitte (GR1 und GR2) ist gekennzeichnet. Die beiden Zinkfinger der LIM-Domänen, die jeweils durch vier Aminosäurereste ein zweiwertiges Zink-Ion koordinieren, sind angedeutet, ebenso sind die Bindungsregionen bekannter Interaktionspartner dargestellt. Man beachte, dass für die Bindungsregion des N-RAP auf dem MLP keine Daten vorliegen. Die Lage der DCM- und HCM-assoziierten Mutationen ist durch Pfeile angedeutet; nähere Erläuterungen im Text.

Aufgrund des kardialen Phänotyps der MLP *knock out* Mäuse war eine Beteiligung des Proteins auch an humanen Kardiomyopathien zu vermuten. Tatsächlich wurden in jüngster Zeit heterozygote Mutationen im MLP/CRP3-Gen von DCM-Patienten (Knöll *et al.*, 2002) und HCM-Patienten (Geier *et al.*, 2003) beschrieben. Diese Mutationen kodieren für einzelne Aminosäure-Austausche: Die DCM-assoziierte Mutation (W4R) liegt vor der ersten LIM-Domäne, während alle drei HCM-assoziierten Mutationen (L44P, S54R E55G, C58G) im zweiten Zink-Finger der ersten LIM-Domäne identifiziert wurden. Für die MLP W4R Mutation wurde die gestörte Bindung an den Liganden Telethonin als Auslöser für eine DCM verantwortlich gemacht (Knöll *et al.*, 2002), hingegen liegen über die Pathogenese bei HCM-assoziierten MLP-Mutationen keine Erkenntnisse vor.

Aus diesem Grunde sollten im Rahmen dieser Arbeit molekulare Unterschiede zwischen Wildtyp-Protein und mutierten MLP-Varianten, wie sie in von HCM betroffenen Patienten beschrieben wurden, herausgearbeitet und davon ausgehend Hinweise auf die Funktion von MLP in der gesunden quergestreiften Muskulatur gefunden werden (s. Kapitel 3.3).

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits

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

#### 2.1.2 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Name	Hersteller
PCR-Maschine	Trio-Thermoblock mit Deckelheizung	Biometra
Gel-Dokumentation	Gel Doc 2000 System mit QuantityOne Software	Biorad
Agarose-Elektrophorese	Sub-Cell GT	Biorad
Protein-Elektrophorese	Kapillargele, Mini-Protean II System	Biorad
Protein-Transfer	Trans-Blot Cell	Biorad
	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad
Zentrifugen	Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
	Tisch-Kühlzentrifuge Universal 32-R	Hettich
	Kühlzentrifuge RC-5B Plus	Sorvall

Tabelle 2.1: Fortsetzung

Gerät	Name	Hersteller
Elektroporation	Gene Pulser II	Biorad
Sonotrode	UP50H	Hielscher
ELISA-Reader	Milenia	Diagnostic Products
UV-VIS-Spektrometer	Cary 50	Varian
Vakuumtrocknung	Alpha 1-2/ Jota-RVC	Christ
ICP-AES	IRIS Advantage Duo ER/S	Thermo Jarrell Ash
Phospho-Imager	FujiFilm BAS-1800II	Fuji
HPLC	SMART System, $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10 Säule	Amersham
Massenspektrometer	Reflex II MALDI-TOF	Bruker-Daltonik
	API QSTAR pulsar I mit Nano-ESI-Quelle	MDS Sciex
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Ultima	Revco
Gefriermikrotom	HM 500 OM	MICROM
Mikroskop	Axioplan2-Mikroskop mit Plan-Neofluar-Objektiv 63x	Zeiss
	VISICAM-1300 CCD-Kamera und MetaMorph Software	Visitron
	LSM510 konfokales Mikroskop	Zeiss
	mit Argon-Laser (488 nm) und HeNe-Laser (543 nm)	
Bildbearbeitungssoftware	LSM Image Browser 2.3	Zeiss
	Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems
	CorelDraw 11.0	Corel

### 2.1.3 Bakterien- und Hefe-Stämme

Tabelle 2.2: Eigenschaften der Bakterien- und Hefe-Stämme

Stamm	Anwendungsgebiete	Herkunft
<i>E. coli</i> JM109	Klonierungsstamm	Stratagene
Genotyp:	F <sup>-</sup> <i>traD36 proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15/ $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>glnV44 e14 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	(Heidelberg)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	Expression rekombinanter Proteine	Novagen
Genotyp:	B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) [pLysS Cam <sup>r</sup> ]	(Heidelberg)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)Codon Plus	Expression rekombinanter Proteine	Stratagene
Genotyp:	B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) <i>endA</i> Hte [ <i>argU proL</i> Cam <sup>r</sup> ]	
<i>S. cerevisiae</i> L40	Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente	Invitrogen
Genotyp:	MAT $\alpha$ <i>his3<math>\delta</math>200 trp1-901 leu2-3112 ade2</i> LYS2::( <i>4lexAop-HIS3</i> ) URA3::( <i>8lexAop-lacZ</i> )GAL4	Vojtek <i>et al.</i> (1993)

## 2.1.4 Zelllinien und Primärkulturen

Tabelle 2.3: Zelllinien und Primärkulturen

Name	Eigenschaften	Donor	Herkunft
PtK2	Epitheliale Zelllinie	<i>Potorous tridactylus</i> (Niere)	ECACC #88031601
HSkM	humane Skelettmuskelzellen Primärkultur aus isolierten, adulten Satellitenzellen	<i>Homo sapiens</i> (Rückenmuskel)	Van der Ven <i>et al.</i> (1992) Van der Ven <i>et al.</i> (1993)
C2C12	Myoblasten-Zelllinie	<i>Mus musculus</i> (Beinmuskel)	ECACC #91031101
NRC	Neonatale Rattenkardiomyozyten Primärkultur aus isolierten, neonatalen Kardiomyozyten	<i>Rattus norvegicus</i> (Herz)	Lange <i>et al.</i> (2002)

## 2.1.5 Plasmide und cDNA-Bibliotheken

Alle Plasmide verfügen über eine Ampicillin-Resistenzkassette (Ausnahmen: pLexPd - Kanamycin, pTRG - Tetracyclin). Falls notwendig, wurde die vorhandene Klonierungskassette ersetzt, so dass geeignete Restriktionsschnittstellen (MluI bzw. BamHI und SalI bzw. XhoI) zur Verfügung standen. Vektorkarten ausgewählter Plasmide befinden sich im Anhang E.

Tabelle 2.4: 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-4T-1	prokaryotische Expression (GST-Tag)	Amersham (Freiburg)
pACT2	Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente ( <i>GAL4 activation domain</i> Hybridanteil, <i>LEU2</i> )	Clontech (BD Biosciences, Heidelberg)
pLexPd	Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente ( <i>LexA DNA binding domain</i> Hybridanteil, <i>TRP1</i> )	modifizierter pLexA (Clontech) Stenmark <i>et al.</i> (1995)
pMypT7	eukaryotische Expression (Myomesin-Promotor, T7-Tag)	modifizierter pCAT3-Enhancer (Promega) Pacholsky (2003)
pMypG	eukaryotische Expression (Myomesin-Promotor, EGFP-Tag)	modifizierter pCAT3-Enhancer (Promega) Pacholsky (2003)

Tabelle 2.5: cDNA-Bibliotheken

cDNA-Bibliothek	Plasmid	Herkunft
Human Heart MATCHMAKER cDNA Library	pACT2	Clontech
Human Skeletal Muscle MATCHMAKER cDNA Library	pACT2	Clontech
BacterioMatch Human Fetal Heart cDNA Library	pTRG	Stratagene

## 2.1.6 Kulturmedien

### 2.1.6.1 Molekularbiologie

Tabelle 2.6: Kulturmedien für die Molekularbiologie

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.

### 2.1.6.2 Zellkultur

Tabelle 2.7: Kulturmedien für die Zellkultur

Name	Zusammensetzung
PtK-Medium	10 % FCS, 4 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin, 1 µg/ml Streptomycin in DMEM
C2C12-Proliferations-Medium	15 % FCS, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 1 µg/ml Streptomycin, 1 % NEAA in DMEM
C2C12-Differenzierungs-Medium	0,4 % Ultrosor G, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 1 µg/ml Streptomycin, 1 % NEAA in DMEM
HSkM-Proliferations-Medium	20 % FCS, 2 % Ultrosor G, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 1 µg/ml Streptomycin, 1 % NEAA in DMEM
HSkM-Differenzierungs-Medium	SKMD-Fertigmedium (Promocell, Heidelberg)

Für C2C12- und HSkM-Zellen wurde DMEM ohne Phenolrot verwendet.

### 2.1.7 Antibiotika

Für die Molekularbiologie wurden folgende Antibiotikakonzentrationen eingesetzt:

Tabelle 2.8: Antibiotika

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

### 2.1.8 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper sind im Anhang (Tab. B.1) zusammengestellt. Geeignete Sekundärintikörper (Meerrettichperoxidase-Konjugate (HRPO) für Westernblots; Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate für Immunfluoreszenz) wurden von Dianova (Hamburg) bzw. Molecular Probes (MoBiTec, Göttingen) bezogen und sind in Tab. B.2 aufgelistet.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

### 2.2.1 Reverse Transkription

Gesamt-RNA wurde aus kultivierten undifferenzierten und differenzierten HSkM-Zellen (s. Abschnitt 2.5.1) mit Hilfe des *RNA Isolation Kit* (Stratagene) isoliert (Schröder *et al.*, 2000). Für Reverse-Transkriptase-Reaktionen wurde jeweils 1  $\mu\text{g}$  RNA von differenzierten HSkM (Tag 3) mit Hilfe des *Expand Reverse Transcriptase Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim) und eines spezifischen Primers bei 42 °C 1 h lang in cDNA umgeschrieben. Die Reaktionsprodukte wurden sofort in PCR-Reaktionen eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.



### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit PCR-Reaktionen wurden Teilstücke aus cDNA Sequenzen spezifisch amplifiziert. Für analytische PCRs wurde ein Taq-DNA-Polymerase-System (Puffersystem mit Ammoniumsulfat, Fermentas) nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein PCR-Ansatz (50  $\mu$ l) enthielt ca. 50 ng Matrizen-DNA, je 20 pmol der beiden Primer, je 200  $\mu$ M dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Roth) und 1 U Taq DNA-Polymerase. Die Reaktionsmischung wurde folgendem Temperaturprofil unterworfen:

Denaturierung	2,5 min bei 94 °C
35 Zyklen	1) Denaturierung 45 sec bei 94 °C
	2) Annealing 30 sec bei 60 °C (55-65 °C)
	3) Elongation 1 min pro kb bei 72 °C
Finale Elongation	10 min bei 72 °C
Kühlung	4 °C

Für präparative PCR-Reaktionen wurden ein Pfu-DNA-Polymerase-System (Fermentas) oder das *Expand Long Template PCR System* (Roche Diagnostics) nach Angaben der Hersteller verwendet. Über die Primer wurden ggf. geeignete Restriktionsschnittstellen eingeführt. Eine Tabelle mit den Sequenzen der verwendeten Primer befindet sich im Anhang (Tab. D.1).

### 2.2.3 Zielgerichtete Mutagenese und andere, PCR-basierte Klonierungsstrategien

cDNAs, die für die mutierten MLP-Proteine W4R, L44P und S54R E55G kodierten, wurden von C. Geier (Humboldt-Universität Berlin) zur Verfügung gestellt. Zielgerichtete Mutagenese wurde verwendet, um eine cDNA für MLP C58G herzustellen (Geier *et al.*, 2003). Die cDNA wurde zunächst in zwei Teilstücken mittels PCR amplifiziert und dabei über geeignete Primer ein Basenaustausch eingeführt. In einer zweiten PCR wurden die beiden Teilstücke als Template eingesetzt, um eine kontinuierliche, mutierte cDNA zu erhalten.

Eine ähnliche Strategie (ohne Einführung von Fehlbasen) wurde verwendet, um aus partiellen cDNAs eine kontinuierliche cDNA zu erhalten, falls keine passenden Restriktionsschnittstellen vorhanden waren. Dazu wurde die cDNA in zwei Teilstücken amplifiziert, die in einem kurzen Sequenzbereich überlappten. Die beiden Teilstücke wurden in einer zweiten PCR als Template eingesetzt und so eine kontinuierliche cDNA erhalten.

## 2.2.4 Restriktionsverdau

Um isolierte Plasmide hinsichtlich des klonierten Inserts zu überprüfen, wurden analytische Restriktionsverdau durchgeföhrt. Dazu wurden ca. 100 ng DNA mit 1–2 U Restriktionsendonuklease in 10  $\mu$ l geeignetem Puffer (Fermentas) bei 37 °C 1 h lang inkubiert. Für präparative Ansätze wurde die 10-fache Menge an DNA und Restriktionsendonukleasen eingesetzt und die Inkubationszeit auf 5–16 h erhöht.

## 2.2.5 Gelelektrophorese

Es wurden Gele mit 1–2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,3), versetzt mit Ethidiumbromid (1  $\mu$ g/ml), verwendet. Die Proben wurden mit 0,2 Volumina Gelladepuffer (Fermentas) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard dienten Marker-DNAs bekannter Größe (z. B. *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas). Analytische Minigele wurden bei 100 V, größere Gele bei 150 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele dokumentiert (GelDoc, Biorad), interessierende Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

## 2.2.6 Ligation

Vektoren und Inserts mit passenden kohäsiven Enden (z. B. MluI und Sall) wurden durch Restriktionsverdau erhalten. 200 ng Plasmid-DNA wurden mit einem 3-fachen molaren Überschuss Insert-DNA und 0,5 U T4-DNA-Ligase in Ligase-Puffer (Gesamtvolumen 10  $\mu$ l, Fermentas) bei 16 °C über Nacht inkubiert und anschließend für Transformationen eingesetzt.

Alternativ konnten ungeschnittene Taq-PCR-Produkte mit pGEMT bei 4 °C ligiert werden („T/A-Klonierung“, *pGEMT Vector System*, Promega). Die transformierten Bakterien wurden in diesem Fall einer Blau-Weiß-Selektion (Test auf  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität) unterzogen (s. u.).

## 2.2.7 Transformation in *E. coli*

100  $\mu$ l transformationskompetente Bakterien (JM109 bzw. BL21; Herstellung beschrieben in Obermann *et al.*, 1996) wurden mit 10  $\mu$ l Ligationsansatz (s. Abschnitt 2.2.6) oder 50 ng zirkulärer Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von

80 sec bei 42 °C (Wasserbad) wurde der Ansatz 5 min auf Eis gekühlt, mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach Sedimentation (Tischzentrifuge) wurde das Pellet in 100 µl SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für Blau-Weiß-Selektionen wurde den Platten 0,5 mM IPTG und 80 µg/ml X-Gal zugesetzt.

Alternativ konnten Bakterien auch durch Elektroporation transformiert werden (beschrieben in Kempa, 2001). Verwendete Parameter waren hierbei: Spannung 2,5 kV, Kapazität 25 mF und Widerstand 300 MΩ.

### 2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Für Plasmid-Isolierungen im Mini-Maßstab wurden 3–10 ml LB-Medium (versehen mit entsprechenden Antibiotika) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert (Übernachtkultur, ÜNK).

Für die meisten Anwendungen erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen durch TELT-Puffer-Lyse und anschließende Fällung (Pacholsky, 2003). DNA für Sequenzierungen wurde mit dem *Wizard Plus SV Miniprep Kit* (Promega) aufgereinigt. Quantifizierungen von DNA-Mengen wurden relativ zu Standards (*MassRuler DNA Ladder*, Fermentas) mit Hilfe der QuantityOne-Software (Biorad) vorgenommen.

Die Präparation größerer DNA-Mengen erfolgte ausgehend von 25–50 ml ÜNK mit Hilfe des *Plasmid Midi Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Reinheit und Konzentration der DNA wurden spektroskopisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) bestimmt.

Um die Integrität der Klonierungsendprodukte zu überprüfen, wurden die Plasmide durch kommerzielle Anbieter (AGOWA, Berlin; SeqLAB, Göttingen) sequenziert.

## 2.3 Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente

### 2.3.1 Transformation in L40

#### 2.3.1.1 Prätransformation

Plasmidfreie L40-Hefen wurden über Nacht bei 30 °C in YPD 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 1 h bei 30 °C geschüttelt. Die Hefen wurden erneut mit Wasser gewaschen, in 80  $\mu$ l TE aufgenommen und auf entsprechende Selektionsmedien (DOB-L für pACT2, DOB-W für pLexPd) ausplattiert. 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

#### 2.3.1.2 Kotransformation

Die Ansatzgröße wurde je nach Art des Experiments variiert. Für die Kotransformation mit einer cDNA-Bibliothek 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, mit Wasser gewaschen und in 6 ml 100 mM LiAcetat aufgenommen. Nach 15 min Inkubation bei 30 °C wurde erneut pelletiert, in 21,6 ml Transformationsmischung (s. u.) resuspendiert und 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 Volumina DMSO erfolgte ein Hitzeschock von 15 min bei 42 °C (unter Schwenken, Wasserbad). Die Hefen wurden mit Wasser gewaschen, in 80 ml YPD bei 30 °C 1 h lang geschüttelt, erneut gewaschen und auf ca. 30 Selektionsplatten (14 cm, DOB-LWH) ausplattiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden definierte Verdünnungen auf DOB-LW ausplattiert. Nach 5–7 Tagen bei 30 °C wurden kotransformierte Kolonien sichtbar.

Für gezielte Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente wurde das Protokoll wie folgt modifiziert: Die

pelletierten Hefen wurde in 1,5 ml 100 mM LiAcetat aufgenommen. Je 100  $\mu$ l davon wurden mit 700  $\mu$ l Transformationsmischung, die jedoch 1  $\mu$ g Plasmid-DNA enthielt, resuspendiert. Die Ansätze wurden nach dem Hitzschock (12 min) wie prätransformierte Hefen behandelt (s. o.) und auf Selektionsplatten (DOB-LW) ausplattiert.

Transformationsmischung: 33,3 % (w/v) PEG-4000, 0,1 M LiAcetat, 250  $\mu$ g/ml ssDNA, 25  $\mu$ g/ml cDNA-Bibliothek in TE-Puffer

### 2.3.2 Selektion auf Aminosäuremangelmedien

Das Prinzip des verwendeten Hefe-Doppel-Hybrid-Systems ist mehrfach beschrieben worden (Fields und Song, 1989; Vojtek *et al.*, 1993; Clontech, 2000).

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

Prätransformierte Hefen wurden mit Histidin-Mangelmedium (DOB-H) auf Autoaktivierung überprüft. Wiesen die Hefen autoaktivierendes Potential auf, wurde allen weiteren Medien 1–5 mM 3-Aminotriazol (3-AT) zugesetzt.

Eine Aktivierung des *HIS3*-Reportergenes (d. h. Test auf Interaktion) wurde auf DOB-LWH Platten überprüft. Durch zugesetztes 3-AT (0,5–5 mM) konnte die Stärke der Aktivierung semi-quantitativ abgeschätzt werden.

### 2.3.3 $\beta$ -Galactosidase-Assays

Neben dem *HIS3*-Reportergen verfügen L40-Hefen über ein *lacZ*-Reportergen, dessen Aktivierung durch Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität qualitativ und quantitativ analysiert werden kann.

#### 2.3.3.1 Festphasen-Assay

Hefen wurden auf Nitrozellulose (Schleicher und Schüll, Dassel) angeimpft und auf entsprechenden Mangelmedien bei 30 °C 2–3 Tage kultiviert. Die Hefen wurden durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen lysiert, die Nitrozellulose auf ein Filterpapier,

getränkt mit X-Gal-Färbelösung (s. u.), gelegt und bei 37 °C inkubiert. Die Blaufärbung wurde nach 30 min bis 4 h dokumentiert.

X-Gal-Färbelösung: 30  $\mu$ l  $\beta$ -ME, 170  $\mu$ 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

### 2.3.3.2 Flüssigphasen-Assay

Die Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Flüssigphase ermöglicht quantitative Aussagen über die Aktivierung des *lacZ*-Reporter genes (Clontech, 2000).

4 ml YPD-Medium wurden mit 1 ml einer Hefen-ÜNK angeimpft und bei 30 °C im Schüttler 3 h lang inkubiert. Bei der Ernte wurde die OD bei 600 nm bestimmt und ein Aliquot (1,5 ml) pelletiert, mit Z-Puffer gewaschen und in 100  $\mu$ l Z-Puffer resuspendiert. Nach Lyse durch 5 Einfrier-Auftau-Zyklen (s. 2.3.3.1) wurden 700  $\mu$ l  $\beta$ -ME/Z-Puffer zugegeben und die Reaktion durch 160  $\mu$ l ONPG-Substratlösung gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bis Gelbfärbung beobachtbar war (2-16 h). Nach Abstoppen der Reaktion mit 400  $\mu$ l 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (13000 rpm, 15 min) und die OD des Überstandes bei 420 nm bestimmt. Als Leerwert diente eine gleichartig behandelte Probe ohne Hefen. Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität A ergibt sich wie folgt (Miller, 1972):

$$A = \frac{1000 \cdot OD_{420}}{t \cdot V \cdot OD_{600}}$$

t Inkubationszeit, V Verdünnungsfaktor (hier 15),  $OD_{420}$  und  $OD_{600}$  Optische Dichten bei 420 nm und 600 nm

$\beta$ -ME/Z-Puffer: 0,27 ml  $\beta$ -ME auf 100 ml Z-Puffer  
ONPG-Substratlösung: 4 mg/ml ONPG in Z-Puffer

### 2.3.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefen

Um mögliche Interaktionspartner aus einem cDNA-Bibliotheks-Screen zu identifizieren, wurden Beuteplasmide (pACT2) aus kotransformierten Hefen isoliert, die eine deutliche Aktivierung beider Reporter gene zeigten. Dazu wurden 5 ml Selektionsmedium (DOB-L) angeimpft und bei 30 °C über Nacht geschüttelt. Die Hefen wurden pelletiert, mit 0,3 ml Hefe-Lysispuffer (s. u.), 0,3 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 ml

Glasperlen ( $d = 0,2$  mm, Roth) gemischt und 2 min gevortext. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) wurde die wässrige Phase mit 0,2 Volumina 3 M NaCl und 0,75 Volumina Isopropanol gefällt, zentrifugiert (13000 rpm, 5 min), das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20  $\mu$ l Wasser gelöst. Für die nachfolgende Elektrotransformation in *E. coli* wurde 1  $\mu$ l isolierte DNA verwendet.

Hefe-Lysispuffer: 0,2 % (w/v) Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Expressionskulturen

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden *E. coli* BL21 Stämme verwendet, die mit cDNA-Fragmenten – kloniert in prokaryotische Expressionsplasmide – transformiert wurden. 200 ml LB- bzw. SOC-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) wurden 1:100 mit einer ÜNK angeimpft, bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8–1,0 kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Zur Expression von LIM-Domänen wurde dem Medium 0,2 mM  $ZnCl_2$  zugesetzt. Die Kulturen wurden weitere 3-4 h lang bei 30 °C geschüttelt, anschließend pelletiert (5000 *g*, 10 min) und bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

### 2.4.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine

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

#### 2.4.2.1 Aufreinigung unter Verwendung des His6-Tags

Die Reinigung erfolgte mit Hilfe des *QiaExpressionist-Kit* unter nativen Bedingungen (Qiagen). Das Bakterienpellet wurde aufgetaut (15 min), in 5 ml Lysispuffer (s. u.) resuspendiert und 30 min lysiert. Nach Ultraschallbehandlung (3x 10 sec bei 50 W) wurden unlösliche Bestandteile sedimentiert (18000 *g*, 20 min) und der Überstand mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) unter Schwenken inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde auf eine Leersäule (Qiagen) überführt, dreifach mit 5 ml Waschpuffer (s. u.) gewaschen und gebundenes Protein mit

5x 250  $\mu$ l Elutionspuffer (s. u.) eluiert. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Ni-NTA-Lysispuffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mg/ml Lysozym, Proteaseinhibitoren, 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, Proteaseinhibitoren, pH 8,0
Proteaseinhibitoren:	5 $\mu$ M E64, 1 $\mu$ g/ml Leupeptin, 10 $\mu$ g/ml Trypsin-Inhibitor, 0,25 $\mu$ g/ml Pepstatin A

### 2.4.2.2 Aufreinigung unter Verwendung des GST-Tags

Zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgt die Lyse und Ultraschallbehandlung von Bakterienpellets wie unter 2.4.2.1 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 5x 250  $\mu$ l Elutionspuffer (s. u.) eluiert. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden gegen PBS dialysiert und zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

GST-Lysispuffer:	1 mg/ml Lysozym, Proteaseinhibitoren 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

## 2.4.3 Proteinbestimmungsmethoden

### 2.4.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde das *Protein Assay Kit* (Biorad) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteine wurden in PBS verdünnt, mit Reagenz versetzt und nach 5 min die OD bei 650 nm im ELISA-Reader bestimmt. Als Kalibrierstandards dienten Verdünnungen von  $\gamma$ -Globulin in PBS (0–200  $\mu$ g/ml). Es wurden routinemäßig Dreifachbestimmungen durchgeführt.



### 2.4.3.2 Proteinbestimmung mit Hilfe von Extinktionskoeffizienten

Eine Alternative zu relativen Proteinbestimmungsmethoden stellt die Messung der Extinktion bei bekannter Aminosäuresequenz dar.

Die Extinktion (bei 280 nm) von Proteinlösungen wurde in 6 M Guanidin-Hydrochlorid (GuHCl) an einem UV-VIS Spektrometer bestimmt. Mit Hilfe eines Inkrementsystems, das die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein berücksichtigt (Pace *et al.*, 1995), wurden Extinktionskoeffizienten (s. u.) berechnet und die Proteinkonzentration ermittelt.

Verwendete molare Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  (in l/mol/cm):

NRAP LI: 17 510, NRAP LIr02: 35 430, MLP WT: 23 650, MLP C58G: 23 525,  $\alpha$ -Actinin 2: 125 620

### 2.4.4 Zinkbindungsexperimente

Definierte Mengen gereinigter, rekombinanter Proteine (0,1–2 mg) wurden lyophilisiert und mit 0,25 ml Salpetersäure (65 % (w/v), Suprapur, Merck) bei RT über Nacht oxidiert. Die Proben wurden mit 10 ml Wasser aufgefüllt und der Zinkgehalt durch Messungen bei 213,8 nm (Zinklinie 122. Ordnung) an einem Induktiv-gekoppelten-Plasma-Atom-Emissions-Spektrometer (ICP-AES) bestimmt. Als Leerwert diente eine gleichartig behandelte Probe ohne Protein. Mit Hilfe der bekannten eingesetzten Proteinmenge (Proteinbestimmung eines Aliquots nach 2.4.3.2) wurde das Verhältnis gebundene Zink-Ionen pro Molekül berechnet.

### 2.4.5 Thermolysin-Verdau

Proteinlösungen (ca. 1 mg/ml in PBS) wurden mit Thermolysin (E.C.3.4.24.27, Sigma; 3000-facher molarer Unterschuss) bei 37 °C inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurde der Verdau durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Nach Denaturierung (2 min bei 95 °C) wurden die Proben durch SDS-PAGE nach Schägger und Von Jagow analysiert.

### 2.4.6 Gelelektrophorese

#### 2.4.6.1 SDS-PAGE nach Laemmli

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte routinemäßig mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-System (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970).

Dazu wurden diskontinuierliche Gele (Trenngele 8 bis 14 % PAA (Roth), Sammelgel 3 % PAA) verwendet. Die Protein-Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,25 Volumina Probenpuffer (s. u.) versetzt und 2 min bei 95 °C denaturiert. Nach stromkonstanten Lauf (15 mA pro Gel) wurden die Gele mit Coomassie G250 (Serva, Heidelberg) gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert.

SDS-Probenpuffer (5-fach):	5 mM EDTA, 30 % Glycerol, 60 mM Tris/HCl, 15 % SDS, 7,5 % $\beta$ -ME, 0,1 % Bromphenolblau, pH 6,8
Acrylamid-Lösung:	30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)
Trenngel-Puffer:	375 mM Tris/HCl, 0,2 % SDS, pH 8,8
Sammelgel-Puffer:	125 mM Tris/HCl, 0,2 % SDS, pH 6,8
SDS-Laufpuffer:	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

#### 2.4.6.2 SDS-PAGE nach Schägger und Von Jagow

Für die Auftrennung von kleinen Proteinfragmenten und Peptiden wurde ein SDS-PAGE-System nach Schägger und Von Jagow (1987) verwendet. Es verfügt über eine bessere Trennleistung und unterscheidet sich vom Laemmli-System darin, dass Stufengradientengele (16,5 % PAA, 10 % PAA, 4 % PAA) und getrennte Anoden/Kathoden-Puffer (s. u.) verwendet werden.

Gellösungen:	16,5 % PAA, 12 % Glycerol in Gelpuffer 10 % PAA, 12 % Glycerol in Gelpuffer 4 % PAA in Gelpuffer
Gelpuffer (3-fach):	3 M Tris/HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45
Anodenpuffer:	0,2 M Tris/HCl, pH 8,9
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS, pH 8,25

#### 2.4.6.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

##### *(non equilibrium pH gradient electrophoresis, NEPHGE)*

Für die Auftrennung nach Ladungseigenschaften wurden NEPHGE-Kapillargele (s. u.) gegossen (O'Farrell *et al.*, 1977). Die Proben wurden mit 5 Volumina 1 %  $\beta$ -ME in Ethanol gefällt (30 min, -80 °C) und zentrifugiert (22000 *g*, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 1 %  $\beta$ -ME in Ethanol gewaschen, getrocknet, in 5  $\mu$ l NEPHGE-Probenpuffer (s. u.) aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden auf die Kapillargele aufgetragen und mit

10  $\mu$ l Overlaypuffer (s. u.) überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 400 V über 4 h, wobei Zytochrom c als Markerprotein diente. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele aus den Kapillaren herausgedrückt, 5 min mit Äquilibrierungspuffer (s. u.) inkubiert und bei -80 °C gelagert.

Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli.

NEPHGE-Kapillargele:	9 M Harnstoff, 4 % Acrylamid, 2 % NP-40, 1,5 % Ampholyte 7-9, 0,5 % Ampholyte 8-10
NEPHGE-Probenpuffer:	9,5 M Harnstoff, 2 % NP-40, 2 % Ampholyte 7-9, 1 % $\beta$ -ME
Overlaypuffer:	8 M Harnstoff, 5 % NP-40, 1 % Ampholyte 7-9, 5 % $\beta$ -ME
Kathodenlösung:	10 mM $H_3PO_4$
Anodenlösung:	20 mM NaOH
Äquilibrierungspuffer:	60 mM Tris/HCl, 2 % SDS, 100 mM DTT, 10 % Glycerol, 0,05 % Bromphenolblau, pH 6,8

## 2.4.7 Proteintransfer

### 2.4.7.1 Semidry-Methode

Der Proteintransfer auf Nitrozellulose (Roth) im Semidry-Verfahren erfolgte zwischen mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren (Whatman, Roth; 20 % (v/v) Methanol in SDS-Laufpuffer) 90 min lang bei 54 mA pro Gel. Die Effizienz des Transfers wurde durch Färbung mit Ponceau-Rot (s. Abschnitt 2.4.7.2) überprüft.

### 2.4.7.2 Tankblot-Methode

Für einen besonders effizienten Transfer und große Proteine (> 100 kD) wurde ein Tankblotpuffer-System (s. u.) bei 4 °C verwendet. Die Stromstärke und Transferdauer wurden an die Proteingröße angepasst (1–3 Ah; z. B. 3 h bei 330 mA für 50 kD sowie 15 h bei 200 mA für 200 kD).

Ponceau-Rot-Färbelösung:	0,1 % (w/v) Ponceau-Rot, 3 % (w/v) Trichloressigsäure
Tankblotpuffer:	25 mM Tris, 18 % (v/v) Methanol, 192 mM Glycin, 0,01 % SDS

### 2.4.8 Immundetektion

Die Nitrozellulose-Membranen wurden mit Magermilchpulver blockiert (Humana, 4 % (w/v) in TBST). Nach Inkubation mit primärem Antikörper (verdünnt in Blockierlösung; RT 1,5 h oder 4 °C über Nacht) wurde mehrfach mit TBST gewaschen und anschließend mit Sekundärantikörper inkubiert (HRPO-Konjugate verdünnt in TBST; 1 h bei RT). Nach weiterem Waschen wurden die gebundenen konjugierten Enzyme durch Chemilumineszenz (ECL) detektiert.

Eine quantitative, densitometrische Auswertung digitalisierter Blots erfolgte mit Hilfe der QuantityOne-Software (Biorad).

TBST: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,9  
ECL-Kit: SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Perbio, Bonn)  
ECL-Filme: Hyperfilm ECL (Amersham)

### 2.4.9 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationsexperimente wurden rekombinante Proteine (je 0,2 nmol) und Antikörper (ca. 1 µg) in IP-Puffer (s. u.) gemischt und bei 4 °C 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 40 µl Protein-G-Beads (Dynabeads, Dynal Biotech, Hamburg) wurde weitere 30 min bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Die Beads wurden anschließend dreifach mit IP-Puffer ohne BSA gewaschen und die gebundenen Proteine mit 20 µl SDS-Probenpuffer (2-fach) eluiert.

Kompetitionsexperimente (s. Abschnitt 3.3.2.2) wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt, die Proteinmengen jedoch variiert (40 pmol bis 1 nmol MLP WT).

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

### 2.4.10 Antigen-Antikörper-Blockierungsassay

Um die Spezifität eines polyklonalen Antikörpers zu überprüfen bzw. durch selektive Absättigung regionsspezifische Seren zu erhalten, wurden Verdünnungen des Antikörpers (10-fache Konzentration der üblichen Verdünnung) mit rekombinanten Proteinfragmenten (100 µg/ml) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit einem

nicht-relevanten Kontrollprotein. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 3 min) wurden die Ansätze für Westernblot- und Immunfluoreszenz-Analysen eingesetzt.

### 2.4.11 Westernblot- und Dotblot-Overlay-Experimente

Für Dotblot-Overlay-Experimente wurden Verdünnungen rekombinanter Proteine (je 1  $\mu\text{l}$ ) auf Nitrozellulose-Membranen (BA-85, Schleicher und Schüll) aufgebracht. Als Kontrolle diente BSA (1 mg/ml). Die Streifen wurden luftgetrocknet.

Für Westernblot-Overlay-Experimente dienten auf Nitrozellulose transferierte Proteine (je 5  $\mu\text{g}$ ), die zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

Nach Blockierung mit Magermilchpulver bei 4 °C über Nacht (s. Abschnitt 2.4.8) wurden die Membranen mit Protein, verdünnt in Blockierlösung, 1,5 h bei RT inkubiert. Die Membranstreifen wurden dreifach mit TBST gewaschen und gebundenes Protein über seinen Immunotag nachgewiesen (s. Abschnitt 2.4.8).

### 2.4.12 *In vitro* Phosphorylierung

Für *in vitro* Phosphorylierungen wurden je 5  $\mu\text{g}$  rekombinante Proteinfragmente mit 20 U aktivierter, rekombinanter p42-mitogen activated protein kinase (p42-MAPK; New England BioLabs, Frankfurt/M.) und 100  $\mu\text{M}$  ATP (1  $\mu\text{Ci}$   $\gamma$ -[ $^{33}\text{P}$ ]-ATP, Hartmann Analytic, Braunschweig) in 20  $\mu\text{l}$  Kinase-Puffer (s. u.) 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und anschließende Denaturierung (95 °C, 2 min) gestoppt. Nach Auftrennung der Proben durch SDS-PAGE wurden die getrockneten Gele über Nacht autoradiographiert.

Für Westernblot-Overlay-Experimente und zweidimensionale Elektrophorese erfolgte die Phosphorylierung nur mit nicht-markiertem ATP (2 mM). Für die zweidimensionale Elektrophorese wurden auch Phosphorylierungen mit Triton-Extrakten von HSkM-Zellen (10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein, s. Abschnitt 2.5.3) durchgeführt.

Kinase-Puffer: 50 mM Tris/HCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 0,01 % Brij 35, 0,5 mM SoV, Proteaseinhibitoren, pH 7,5

### 2.4.13 HPLC

Für die Identifizierung von Phosphopeptiden wurden rekombinante Proteinfragmente mit und ohne p42-MAPK in 10-facher Ansatzgröße inkubiert (s. Abschnitt 2.4.12), mit 0,5  $\mu\text{g}$  Trypsin (*sequencing grade*, Roche Diagnostics) in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 7,8) bei 37 °C über Nacht verdaut und anschließend lyophilisiert. Die erhaltenen Peptide wurden in 100  $\mu\text{l}$  0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure gelöst und über Umkehrphasen HPLC auf einer C18 Säule aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0–80 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure.

### 2.4.14 Massenspektrometrie

Ein Aliquot (1  $\mu\text{l}$ ) der Elutionsfraktionen (s. Abschnitt 2.4.13) wurde auf dem Probenhalter mit 1,5  $\mu\text{l}$  Matrixlösung (15 mg/ml DHB in 30 % Ethanol) gemischt und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Massenspektren an einem MALDI-TOF-Spektrometer im Reflektormodus aufgenommen.

Für Fragmentierungsspektren wurde ein Fragmentation im Quadrupol-Massenspektrometer selektiert und durch Kollision mit Argon die Fragmentierung angeregt. Da das Gerät mit einer Nano-ESI-Quelle ausgestattet war, konnten die Elutionsfraktionen hierbei ohne Vorbehandlung eingesetzt werden.

## 2.5 Zellbiologische Methoden, Indirekte Immunfluoreszenz und Mikroskopie

### 2.5.1 Zellkultur

Standard-Zellkulturtechniken (Auftauen, Passagieren und Einfrieren) wurden nach Freshney (2000) und den Empfehlungen der *European Collection of Animal Cell Cultures* (ECACC) durchgeführt. Alle verwendeten Zellen wurden bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 100 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Die verwendeten Kulturmedien sind in Tab. 2.7 angegeben.

### 2.5.1.1 PtK2-Zellen

PtK2-Zellen wurden als leicht transfizierbares Modellsystem für Nicht-Muskel-Zellen verwendet. Die Kultivierung erfolgte in PtK-Medium. Die Zellen wurden für Transfektionen bei einer Konfluenz von 80 % eingesetzt.

### 2.5.1.2 HSkM-Zellen

HSkM-Zellen wurden als Modellsystem für die myogene Differenzierung verwendet (Van der Ven *et al.*, 1992, 1993). Unter proliferierenden Bedingungen (HSkM-Proliferations-Medium) wurden die Zellen bis zur fast vollständigen Konfluenz vermehrt. Die myogene Differenzierung wurde durch den Wechsel einer konfluenten Kultur auf HSkM-Differenzierungs-Medium induziert, welches nach 2 Tagen zu 50 % erneuert wurde.

In der Regel fusionierten die Zellen innerhalb von 2 Tagen zu multinukleären Myotuben und bildeten innerhalb von 4 Tagen kontraktile Myofibrillen aus.

### 2.5.1.3 C2C12-Zellen

C2C12-Zellen dienen als transfizierbares Modellsystem für die Muskeldifferenzierung. Die Zellen wurden entweder unter proliferierenden Bedingungen kultiviert (C2C12-Proliferations-Medium) oder bei 100 % Konfluenz die myogene Differenzierung induziert (C2C12-Differenzierungs-Medium). Auch bei diesen Zellen erfolgte 2 Tage nach Induktion der Differenzierung ein 50 %-iger Mediumwechsel.

### 2.5.1.4 NRC

Die Isolation, Kultur und Transfektion neonataler Rattenkardiomyocyten wurde von E. Ehler (King's College London, GB) durchgeführt (Lange *et al.*, 2002).

## 2.5.2 Transiente Transfektionen

Für Transfektionen<sup>1</sup> wurde das Transfektionsreagenz FuGene6 (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden PtK2- und C2C12-Zellen (80 % Konfluenz) in 35 mm Kulturschalen transfiziert. Dazu wurde ein Gemisch aus 2  $\mu\text{g}$  der zu übertragenden DNA mit 6  $\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz in 100  $\mu\text{l}$  DMEM in das Kulturmedium gegeben. Nach 12–24 h erfolgte ein Mediumwechsel, C2C12-Zellen wurden dabei zur Differenzierung induziert. Die Expressionsanalyse der rekombinanten Proteine erfolgte 36–48 h nach Transfektion für PtK2 und 2–4 Tage nach Induktion der Differenzierung für C2C12-Zellen.

## 2.5.3 Herstellung von Zell- und Gewebeextrakten

### 2.5.3.1 SDS-Totalextrakte

Gefrorene Gewebeproben (Biopsiematerial) wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff 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 15 min bei 65 °C inkubiert, sonifiziert (10 sec, 20 W) und unlösliche Anteile durch Zentrifugation abgetrennt (13000 rpm, 15 min). Die Extrakte wurden bei -80 °C gelagert.

### 2.5.3.2 Triton-Extrakte

Kultivierte Zellen (100 mm Schalen) wurden zweifach mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst, in 1,5 ml PBS (mit Proteaseinhibitoren und 0,5 mM SoV) aufgenommen und durch Zentrifugation pelletiert (900  $g$ , 5 min, 4 °C).

Das Zellpellet wurde in Extraktionspuffer (s. u.) resuspendiert und 1 h auf Eis lysiert. Durch anschließende Zentrifugation (22000  $g$ , 15 min, 4 °C) wurden unlösliche Anteile abgetrennt. Der Proteingehalt der Extrakte wurde nach Bradford bestimmt, die Extrakte mit Glycerol (10 % (v/v) Endkonzentration) versetzt und bei -80 °C gelagert.

---

<sup>1</sup>Da keine stabilen Transfektionen durchgeführt wurden, wird der Begriff „Transfektion“ synonym für „transiente Transfektion“ verwendet.



Extraktionspuffer: 1 % Triton X-100, 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 138 mM NaCl, 5 mM DTT, 100 mM KCl, 0,5 mM SoV, Proteaseinhibitoren, pH 7,6

## 2.5.4 Gefrierschnitte von Geweben

Eine Ratte (*Rattus norvegicus*) wurde durch Genickbruch getötet und die Organe (z. B. Herz, *M. soleus*) präpariert. Die entnommenen Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Desweiteren stand bei -80 °C gelagertes humanes Biopsiematerial zur Verfügung.

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

## 2.5.5 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen und Gefrierschnitten

### 2.5.5.1 Methanol-Aceton-Methode

Gewebe-Gefrierschnitte und auf Deckgläsern kultivierte HSkM-Zellen wurden routinemäßig mit dieser Methode fixiert; HSkM-Zellen wurden zuvor zweifach mit PBS gewaschen (RT).

Für die Fixierung und Permeabilisierung wurde mit Methanol (5 min, -20 °C) und anschließend mit Aceton (1 min, -20 °C) behandelt. Die fixierten Proben wurden luftgetrocknet und bei -80 °C gelagert.

### 2.5.5.2 Formaldehyd-Triton-Methode

Auf Deckgläsern kultivierte PtK2-Zellen wurden routinemäßig mit dieser Methode fixiert, da dies die Anfärbung von F-Actin mit Phalloidin-Derivaten ermöglichte. Die Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen und mit 3,7 (v/v) % Formaldehyd in PBS 10 min bei RT fixiert. Nach Waschen mit PBS schloss sich eine Permeabilisierung mit 0,5 (v/v) % Triton X-100 in PBS (10 min bei RT) an. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und kurzfristig bei 4 °C gelagert.

### 2.5.6 Indirekte Immunfluoreszenz

In der Regel wurden Doppelmarkierungen („rot/grün“) bzw. Dreifachmarkierungen („rot/grün/blau“) durchgeführt. Die dazu verwendeten primären Antikörper sind in Tab. B.1 zusammengefasst. Als Sekundäntikörperkonjugate wurden gegen Immunglobuline (Ig) gerichtete Antikörper der Ziege verwendet (Spezies- und z. T. Ig-Subklassen-spezifisch; Tab. B.2), die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren. F-Actin wurde in der Regel mit CPITC-Phalloidin angefärbt (Small *et al.*, 1988; Sigma).

Fixierte Zellen auf Deckgläsern und Gewebsschnitte wurden mit PBS gewaschen, mit 10 % NGS in PBS blockiert (30 min, RT) und mit Verdünnungen der primären Antikörper in PBST inkubiert (1 h). Nach zweifachem Waschen mit PBST (5 min) wurden die Proben mit geeigneten Sekundäntikörper-Konjugaten (und ggf. Phalloidin-Konjugat), verdünnt in PBST, 1 h lang inkubiert, erneut gewaschen und mit Mowiol (Calbiochem, Heidelberg) eingebettet. Nach Trocknung über Nacht konnten die Präparate mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes analysiert werden.

PBST: 0,05 % Tween-20 in PBS

Mowiol: 10 % Mowiol 4-88, 25 % Glycerol, 0,1 M Tris/HCl, 0,4 % N-propyl-gallat, pH 8,5

### 2.5.7 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Für mikroskopische Aufnahmen wurde ein Axioplan2-Mikroskop (Zeiss, Jena) mit einem Neofluar-Objektiv (63x/1,25, Öl, Zeiss) und einer CCD-Kamera (Visitron, Puchheim) verwendet. Dabei standen verschiedene Filtersätze zur Verfügung (Zeiss, Tab. B.3). Ausgewählte Präparate wurden mit einem konfokalen Mikroskop analysiert (Baumann, 2004).

Die Aufnahme der einzelnen Emissionskanäle erfolgte mit der MetaMorph-Software, die digitale Nachbearbeitung mit Bildbearbeitungsprogrammen (Adobe Photoshop, CorelDraw).

## 2.6 Sonstige Methoden

### 2.6.1 Bioinformatische Analysen und Werkzeuge

Für die Suche nach Datenbankeinträgen und BLAST-Analysen (Altschul *et al.*, 1997), insbesondere von Nukleinsäure-Sequenzen, wurden die online verfügbaren Angebote des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) genutzt.

Aminosäuresequenzen wurden mit den Werkzeugen ‘Predict Protein’ (*European Molecular Biology Laboratory*, EMBL) und ‘ProSite’ (*Expert Protein Analysis System*, ExPaSy) analysiert. Cluster-Analysen wurden mit Hilfe des Programmes ‘Clustal W’ (Thompson *et al.*, 1994; EMBL) durchgeführt und die Ergebnisse mit ‘TreeView’ dargestellt.

Für sonstige Analysen und Darstellungen wurde das Programm ‘BioEdit’ verwendet.

Datenbankeinträge, BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Predict Protein	<a href="http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html">http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html</a>
ProSite	<a href="http://us.expasy.org/prosite">http://us.expasy.org/prosite</a>
Clusl W	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw">http://www.ebi.ac.uk/clustalw</a>
TreeView	<a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>
BioEdit	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>

### 2.6.2 Statistische Auswertung von Daten

In der Regel wurden Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt, somit lagen zu einem Experiment mehrere Messwerte vor. Aus diesen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Auffällig abweichende Messwerte wurden mit Hilfe des Ausreißer-Tests nach Grubbs (1969) überprüft (Signifikanzniveau 5 %) und identifizierte Ausreißer von der Mittelwertberechnung ausgeschlossen.

Verschiedene Messreihen wurden mit Hilfe des *Student's* t-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft, eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 5 \%$  wurde als signifikant angenommen (Sachs, 1984).

In Abbildungen sind in der Regel die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen (als Fehlerbalken) dargestellt, in einigen Fällen sind die Daten auf 100 normiert (Mittelwert der Kontrollgruppe).

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Integrine und assoziierte Proteinen in den Zell-Matrix-Verbindungen differenzierender Skelettmuskelzellen

Die wichtige Rolle des Dystrophin-Sarkoglycan-Komplexes bei der Verankerung der Sarkomere an der Zellmembran und bei der Kraftübertragung ist weitgehend akzeptiert (Ervasti, 2003), nicht zuletzt aufgrund der Erkenntnisse über Erkrankungen im Zusammenhang mit Proteinen dieses Komplexes (s. Abschnitt 1.3.1). Deutlich weniger ist über die Rolle eines zweiten Systems von Protein-Komplexen in den Zell-Matrix-Kontakten bekannt, die Integrine und assoziierte Proteine. Eine Aufgabe dieser Arbeit war es, dieses System von Proteinen in den sich entwickelnden Costameren zu charakterisieren.

Es wurde zunächst davon ausgegangen, dass die Integrin-assozierten Strukturen in quergestreiften Muskelzellen weitgehend analog zu denen der Fokalkontakte sind (s. Abschnitt 1.2.2) und die Dynamik dieser Strukturen hauptsächlich durch die Aktivität von Tyrosin-Kinasen – insbesondere von FAK und Src – moduliert wird.

Zunächst standen morphologische Vorarbeiten im Vordergrund, die den Umbau von Fokalkontakten über PLAS zu Costameren in kultivierten, differenzierenden HSkM-Zellen beschreiben sollten. Dazu wurden die Expression und Lokalisation von Fokalkontakt-Proteinen in kultivierten HSkM-Zellen verschiedener Stadien durch Immunfluoreszenz-Analysen untersucht: Neben Antikörpern gegen Vinculin, den ersten beschriebenen Costamer-Marker, Paxillin

und FAK wurden Antikörper gegen die muskelspezifische  $\beta 1D$ -Integrin-Isoform und gegen phosphorylierte Tyrosin-Reste verwendet. Ob die Zell-Matrix-Kontakte differenzierender HSkM-Zellen eine ähnliche Heterogenität in der Proteinzusammensetzung wie Fokalkontakte kultivierter Nichtmuskelzellen aufweisen (Zamir und Geiger, 2001), sollte durch Färbungen mit einem gegen Tensin-gerichteten Antikörper analysiert werden.

Diese Untersuchungen ergaben, dass Vinculin in allen Differenzierungsstadien gleichmäßig exprimiert wurde und folglich einen differenzierungsunabhängigen Marker für Zell-Matrix-Kontakte darstellt. Das muskelspezifische  $\beta 1D$ -Integrin-Epitop kolokalisierte mit Vinculin nach Beginn der myogenen Differenzierung (Abb. 3.1).

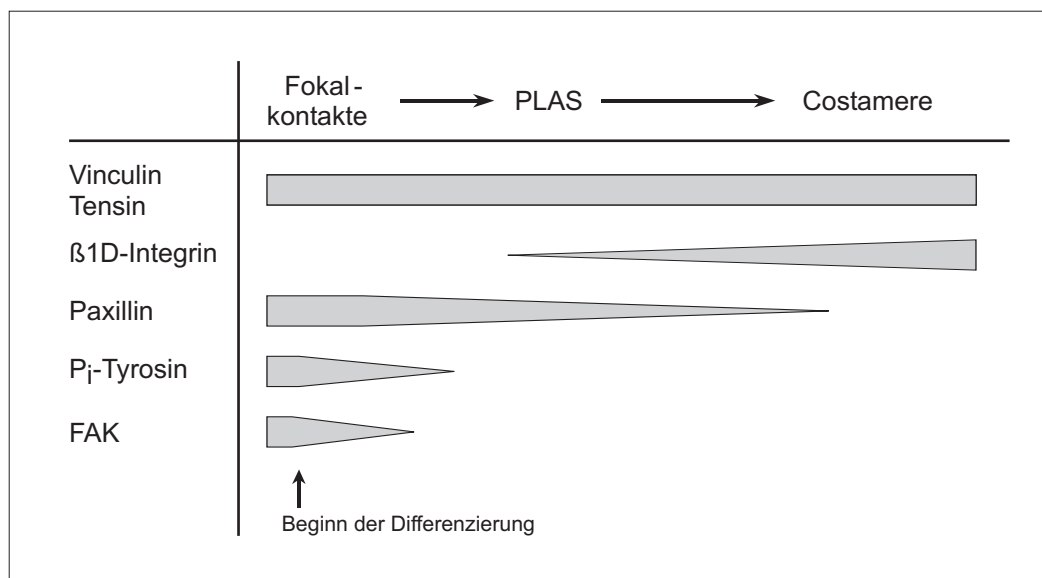


Abbildung 3.1: Zeitliche Expressionsmuster ausgewählter Fokalkontakt-Komponenten im Verlauf der Differenzierung kultivierter HSkM-Zellen. Die linke Spalte zeigt die Liste der Proteine, gegen die Antikörper in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt wurden. Die Abszisse gibt den Verlauf der Differenzierung von den Fokalkontakten zu den Costameren an. Die grauen Balken stellen den für das jeweilige Protein typischen Verlauf der Expression dar.

Die Vinculin-Färbung belegte, dass die Zell-Matrix-Kontakte differenzierender Muskelzellen – im Gegensatz zu den recht einheitlichen Fokalkontakten in proliferierenden Myoblasten – eine erstaunliche Heterogenität aufwiesen: Zum einen befanden sich an den Enden der elongierten Myotuben relativ große, flächige Fokalkontakte, während zahlreiche kleine Kontakte in zentralen, dem Substrat zugewandten Regionen auftraten. Die Vorläuferstrukturen der Costamere, die PLAS, waren ebenfalls hauptsächlich in zentral gelegenen Regionen zu

beobachten, bildeten sich aber an der Substrat-abgewandten Oberseite. Da das Protein Tensin in all diesen Strukturen gleich prominent vertreten war, gibt es keine Hinweise darauf, dass die morphologisch verschiedenen Zell-Matrix-Kontakte (Tensin-reichen) *fibrillar adhesions* oder (Tensin-armen) *focal adhesions* (vgl. Tab. 1.1) zugeordnet werden könnten.

Die Anfärbung der beschriebenen Strukturen mit anderen „klassischen“ Fokalkontakt-Markern lieferte überraschende Ergebnisse: Obwohl FAK in den Fokalkontakten proliferierender Myoblasten prominent angefärbt wurde, nahm die Expression des Proteins kurz nach Beginn der Differenzierung dramatisch ab und war in adulten Costameren nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.2). Ebenso waren nach Beginn der Differenzierung in den Zell-Matrix-Kontakten keine an Tyrosin-Resten phosphorylierten Proteine mehr detektierbar. Die Expression des Proteins Paxillin nahm ebenfalls mit zunehmendem Fortschreiten der Differenzierung ab, war jedoch länger als FAK und Phospho-Tyrosin in den Strukturen nachweisbar (Abb. 3.1).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Tyrosin-Phosphorylierungen durch die Kinasen FAK und Src, wenn überhaupt, nur in proliferierenden Myoblasten und frühen Differenzierungsstadien die Dynamik der Zell-Matrix-Kontakte beeinflussen können. Für spätere Differenzierungsstadien und adulte Costamere haben diese Signalwege keine Bedeutung.

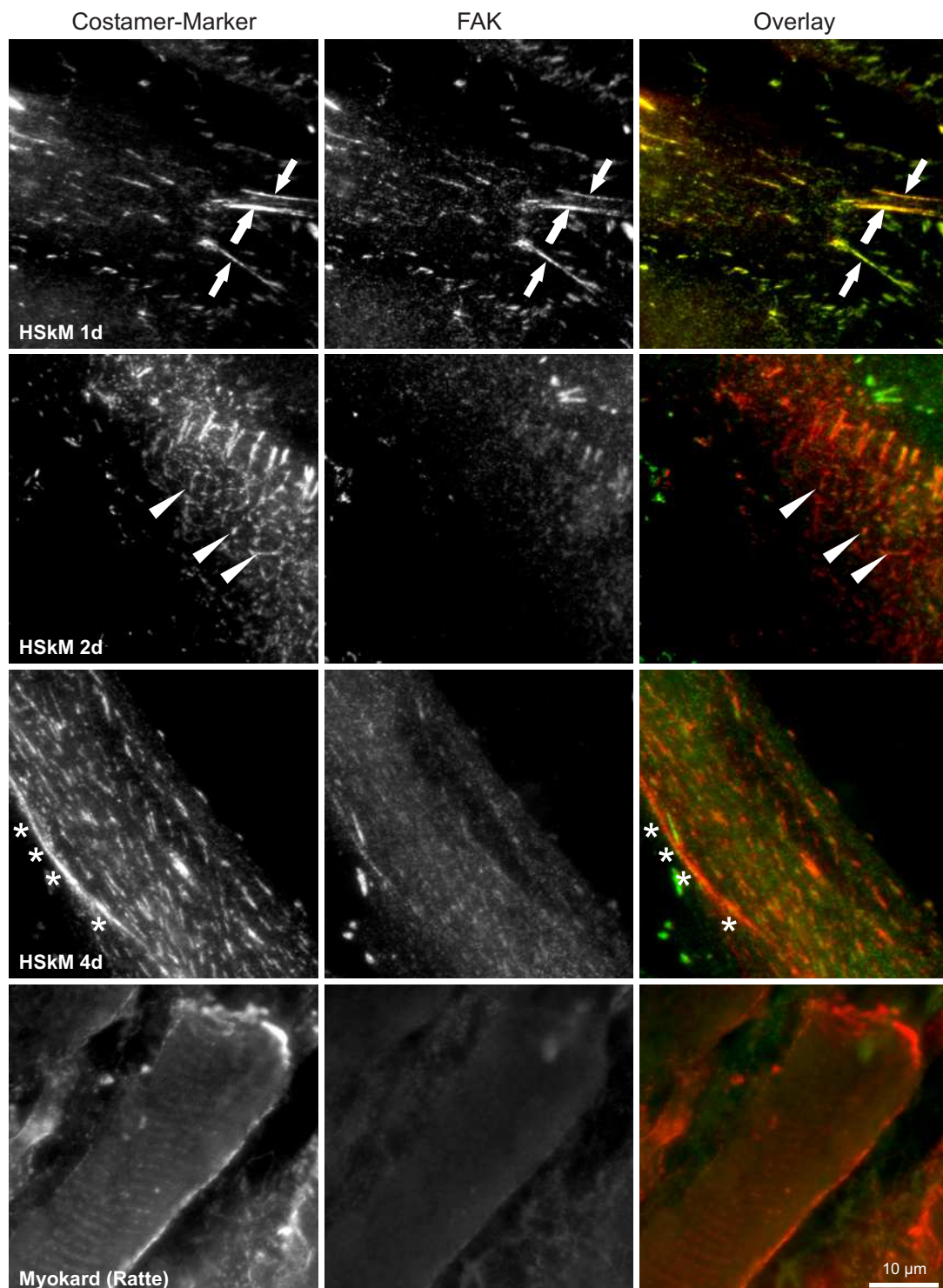


Abbildung 3.2: Lokalisation von Costamer-Markern und FAK in differenzierenden HSkM-Zellen und adultem Gewebe (Myokard der Ratte). Es ist angegeben, für wieviele Tage die HSkM-Zellen *in vitro* differenziert wurden (Reihen 1–3). Erste Spalte: Costamer-Marker (Ponsin), zweite Spalte: FAK, dritte Spalte: Zwei-Kanal-Bild (Costamer-Marker rot, FAK grün). Die Expression von FAK nimmt nach Beginn der myogenen Differenzierung ab, in adulten Costameren ist FAK nicht mehr nachweisbar (Reihe 4). Angefärbte Zell-Matrix-Strukturen in differenzierenden HSkM-Zellen: *Pfeile* - elongierte Fokalkontakte, *Pfeilspitzen* - kleine Zell-Matrix-Kontakte, \* - PLAS. Anmerkung: Die parallele Anfärbung des Costamer-Markers Vinculin und der FAK ist aufgrund der gleichen Ig-Subklasse der Antikörper nicht möglich. Die Ponsin-Färbung ist identisch mit der Anfärbung von Vinculin in Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten.

In der Literatur werden *lipid rafts* als spezialisierte Orte der Signaltransduktion diskutiert (zusammengefasst in Bickel, 2002; Zajchowski und Robbins, 2002). Dabei handelt es sich um Mikrodomänen in der Zellmembran, die durch eine spezielle Lipidzusammensetzung und eingeschränkte Diffusion (*liquid-ordered state*) charakterisiert sind. In diesen Strukturen wurde eine erhöhte Konzentration an Signalmolekülen beobachtet, die teilweise durch posttranslationale Modifikationen in der Membran verankert werden (z. B. Glycophosphatidylinositol-Anker). Die *Caveolae* stellen eine Untergruppe der *lipid rafts* dar und sind durch die Anwesenheit von Caveolinen, integralen Membranproteinen, gekennzeichnet. Da Mutationen im muskelspezifischen Caveolin 3 eine Gliedergürteldystrophie verursachen können (Minetti *et al.*, 1998), wurde vermutet, dass *lipid raft* vermittelte Signalwege bei der Differenzierung der Costamere relevant sein könnten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen Proteine der *lipid rafts* durchgeführt. Da die untersuchten *lipid raft* Proteine (Caveolin 1, Caveolin 2, Caveolin 3, Flotillin 1 und Flotillin 2) zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung in den Zell-Matrix-Kontakten detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass auch *lipid raft*-vermittelte Signalprozesse nur eine untergeordnete Rolle während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen spielen.

Folglich müssen andere, noch unidentifizierte Signalkaskaden den Umbau der Zell-Matrix-Kontakte während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen kontrollieren. Die Natur dieser Signalwege und der involvierten Proteine ist noch unbekannt und soll im nachfolgenden Kapitel identifiziert werden.



## 3.2 Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Paxillin-Liganden: Ponsin

### 3.2.1 Identifizierung von Paxillin-Liganden mit Hilfe der Hefe-Doppel-Hybrid-Technik

#### 3.2.1.1 Ermittlung potentieller Paxillin-Liganden in einer Skelettmuskel-cDNA-Bibliothek

Ausgehend vom Adapterprotein Paxillin sollten neue Signalmoleküle identifiziert werden, die Aufschlüsse über noch unbekannte Signalkaskaden während der Muskeldifferenzierung liefern können. Zur Identifizierung neuer Liganden wurde das Hefe-Doppel-Hybrid-System, eine effiziente, molekularbiologische Methode zur Identifizierung neuer Protein-Protein-Interaktionen, verwendet (Fields und Song, 1989). Das Paxillin-Subkonstrukt 'Pxn PRR', das die Prolin-reiche Region enthielt, wurde in den pLexPd Vektor kloniert (Köderkonstrukt, Abb. 3.3). Die Prolin-reiche Region wurde aus zwei Gründen gewählt: Zum einen war für diesen Sequenzabschnitt des Paxillins nur ein Bindungspartner, Src-Kinase (Weng *et al.*, 1993), bekannt. Zum anderen wiesen Subkonstrukte mit anderen Teilen des Paxillins, d. h. mit den fünf aminoterminalen LD-Motiven und den vier carboxyterminalen LIM-Domänen, zu starke Autoaktivierung im verwendeten System auf.

Rund 500 000 Hefen, die das Beutekonstrukt und ein Köderkonstrukt (Skelettmuskel-cDNA-Bank in pACT2) koexprimierten, wurden auf Aktivierung des *HIS3*-Reportergenes getestet. Die 300 positiven Klone wurden anschließend auf die Aktivierung des *lacZ*-Reportergenes überprüft. Aus 23 Klonen, die die höchste  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität aufwiesen, wurde das Köderplasmid isoliert und durch Sequenzierung identifiziert (Tab. B.4).

Zwei der sequenzierten Klone kodierten für carboxyterminale Bereiche des Proteins Ponsin<sup>1</sup> (Ribon *et al.*, 1998a; Mandai *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2001a), ein weiterer für das verwandte Vinexin-beta (auch SCAM-1; Kioka *et al.*, 1999, 2002). Während der Vinexin-Klon den vollständigen kodierenden Bereich enthielt, begannen die beiden Ponsin-Klone unmittelbar vor der zweiten der drei SH3-Domänen (bei Aminosäure 798 der klonierten Ponsin-cDNA, vgl.

<sup>1</sup>weitere Namen: *c-Cbl associated protein* (CAP), SH3P12; Name des Gens: SORBS1

Abb. C.7). Auffällig war, dass beide Klone eine 278 Aminosäuren lange Insertion zwischen der zweiten und dritten SH3-Domäne enthielten.

Die übrigen 20 Klone wurden als „Falsch-Positive“ bewertet, die vermutlich autoaktivierendes Potential aufweisen (gezeigt für Klone 1 und 9; vgl. Bartel *et al.*, 1993; Hengen, 1997).

### 3.2.1.2 Eingrenzung der Paxillin-Bindungsregion im Ponsin

Mit Hilfe von gezielten Hefe-Doppel-Hybrid-Experimenten wurde die Paxillin-Bindungsregion im Ponsin-Molekül eingegrenzt. Dazu wurden verschiedene Subkonstrukte des Ponsins in pACT2 kloniert (Köderkonstrukte), und Hefen, die das ursprüngliche Beutekonstrukt sowie eines der Köderkonstrukte koexprimierten, wurden auf Aktivierung beider Reporter-Gene überprüft.

In diesen Versuchen zeigten alle Ponsin-Fragmente, die die zweite SH3-Domäne enthielten, Bindung an Paxillin. Diese zweite SH3-Domäne ist folglich notwendig und ausreichend für eine Bindung von Ponsin an Paxillin. Die Interaktion wurde nicht davon beeinflusst, ob sich an die Bindungsregion des Ponsins die Insertion oder direkt die dritte SH3-Domäne anschließt (Abb. 3.3).

Die Spezifität der Interaktion belegten weiterhin Experimente, in denen Hefen, die das Köderkonstrukt 'Ps SH3.2-C' enthielten, mit dem „leeren“ pLexPd Vektor kotransformiert wurden: Wurde statt des Paxillin-Beutekonstruktes nur der DNA-Bindungs-Hybrid-Anteil als Beutekonstrukt verwendet, war keine Aktivierung der Reportergene mehr nachweisbar.

In der Regel stellen PXXP-Motive Liganden für SH3-Domänen dar (Kay *et al.*, 2000; Musacchio, 2002). Im Paxillin-Beutekonstrukt ist nur eine Region mit diesem Konsensus-Motiv enthalten, die Prolin-reiche Region (PPPVPPPP, Aminosäuren 45–52, Abb. C.6). Daher kann man davon ausgehen, dass dieser Abschnitt die Bindung an die zweite SH3-Domäne des Ponsins vermittelt.

Da Vinexin-beta und Ponsin im Bereich der SH3-Domänen stark konserviert sind (67–74 % Identität auf Aminosäureebene), ist zu vermuten, dass auch hier die zweite SH3-Domäne eine Bindung an Paxillin im Hefe-Doppel-Hybrid-System vermitteln kann. Diese potentielle Interaktion soll im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

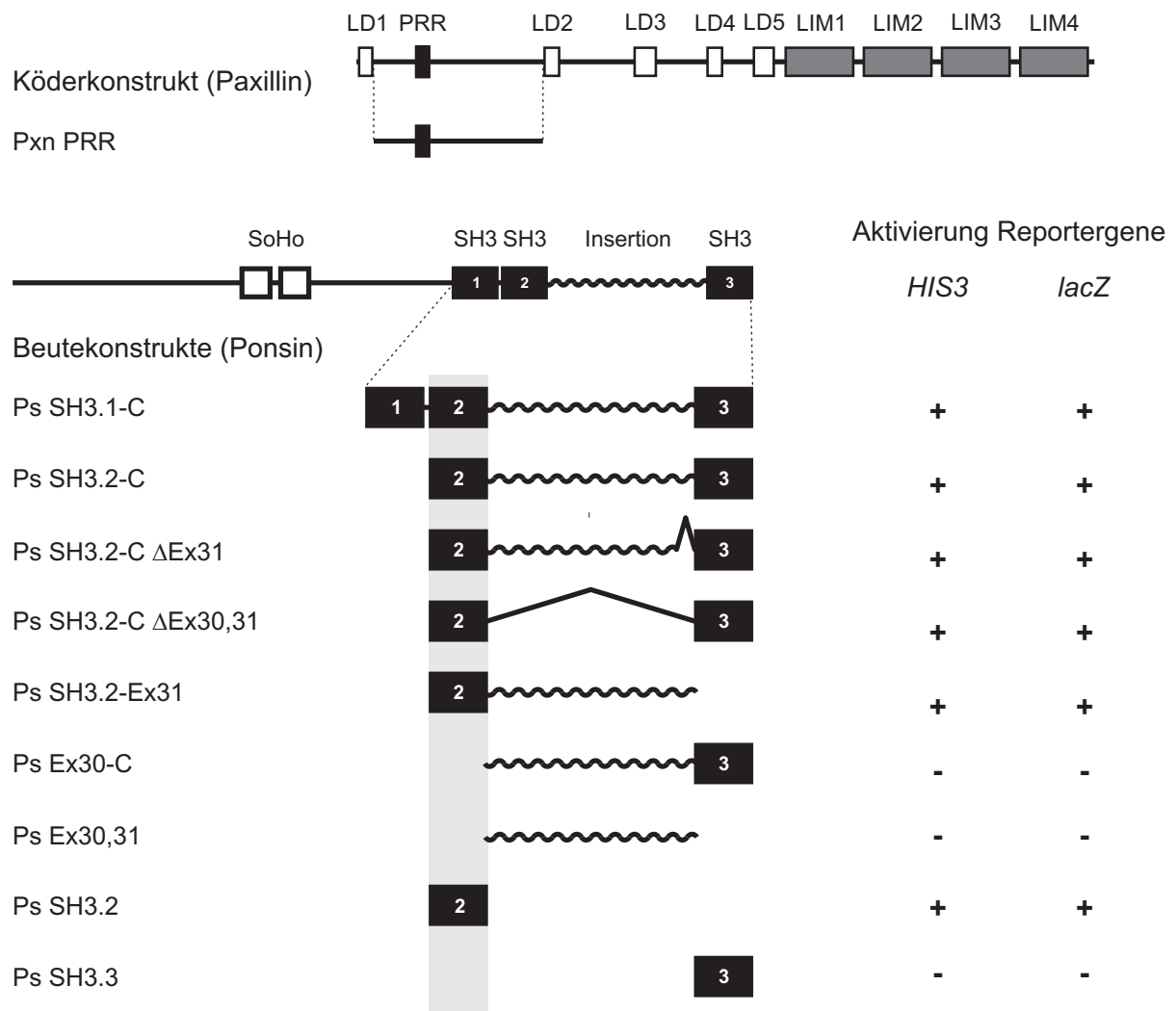


Abbildung 3.3: Eingrenzung der Paxillin-Bindungsstelle im Carboxyterminus des Ponsins durch Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente. Hefezellen, die das ursprüngliche Paxillin-Beutekonstrukt 'Pxn PRR' und eines der Ponsin-Köderkonstrukte koexprimierten, wurden auf Aktivierung der Reportergene getestet (+ messbare Aktivierung). Zum Vergleich sind die vollständigen Proteine schematisch dargestellt. Alle Ponsinkonstrukte, die die zweite SH3-Domäne enthielten, zeigten Bindung an Paxillin (Region grau hervorgehoben).

### 3.2.2 Biochemische Bestätigung der Paxillin-Ponsin-Interaktion

Die Bindung von Ponsin an Paxillin wurde mit biochemischen Methoden bestätigt. Dazu wurden verschiedene Paxillin- und Ponsin-Subkonstrukte in prokaryotische Expressionsvektoren kloniert, mit Hilfe dieser Plasmide in *E. coli* BL21 Stämmen rekombinantes Protein exprimiert und anschließend aufgereinigt. Die drei zur Verfügung stehenden Expressionsvektoren pGEX-4T-1, pET23aEEF und pET23aT7 statteten die rekombinanten Proteine mit unterschiedlichen Immunotags aus (GST-, EEF- bzw. T7-Tag) und erlaubten so ihre immunologische Unterscheidung mit Hilfe Tag-spezifischer Antikörper (s. Kapitel 2).

Eine schematische Darstellung aller verwendeten FAK-, Paxillin- und Ponsin-Konstrukte befindet sich im Anhang (Abb. B.1, ausklappbar).

#### 3.2.2.1 Bestätigung der Bindungsregion und Spezifität der Bindung

**Dotblot-Overlay-Experimente** Für Dotblot-Overlay-Experimente wurde das ursprüngliche Paxillin-Beutekonstrukt als EEF-markiertes Protein auf Nitrozellulose immobilisiert ('Pxn PRR') und die Bindung verschiedener, T7-markierter Ponsin-Konstrukte überprüft (Abb. 3.4).

In Übereinstimmung mit den Hefe-Doppel-Hybrid-Experimenten zeigten das Konstrukt, das dem ursprünglich identifizierten Ponsin-Klon entspricht ('Ps SH3.2-C'), und die zweite SH3-Domäne Bindung an Paxillin. Diese Bindung ist spezifisch (keine Reaktion mit Kontrollprotein), mengenabhängig und sättigbar (Abb. 3.4).

**Westernblot-Overlay-Experimente** Die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Paxillin und Ponsin wurde weiterhin in Westernblot-Overlay-Experimenten charakterisiert. Dazu wurden die Prolin-reiche Region des Paxillins ('Pxn PRR') und ein längeres, aminotermiales Konstrukt ('Pxn N-LD3'), das neben der Prolin-reichen Region auch die LD-Motive 1–3 enthielt, als GST-Fusionsproteine verwendet. Diese beiden Proteinfragmente und GST wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Ponsinkonstrukten, die jeweils eine der drei SH3-Domänen des Ponsins repräsentierten, inkubiert. Gebundenes Ponsinfragment wurde über seinen T7-Immunotag nachgewiesen (Abb. 3.5).

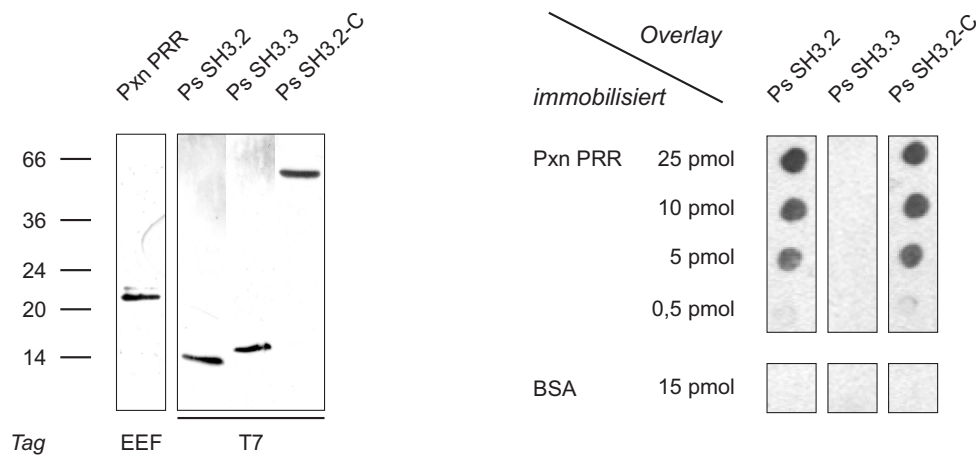


Abbildung 3.4: Bestätigung der Paxillin-Ponsin-Interaktion in Dotblot-Overlay-Experimenten. *Links*: Westernblot der aufgereinigten, rekombinanten Proteinfragmente, nachgewiesen über Tag-spezifische Antikörper. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kD angegeben. *Rechts*: Dotblot-Overlay-Experimente. Verschiedene Mengen eines Paxillin-Fragments wurden immobilisiert und mit den angegebenen Ponsin-Fragmenten inkubiert (je 500 pmol). Gebundenes Protein wurde über seinen T7-Immunotag nachgewiesen. Immobilisiertes BSA diente als Kontrollprotein. Sowohl das Hefe-Doppel-Hybrid-Konstrukt ('Ps SH3.2-C') als auch die zweite SH3-Domäne ('Ps SH3.2'), nicht aber die dritte SH3-Domäne ('Ps SH3.3') zeigten Bindung an Paxillin.

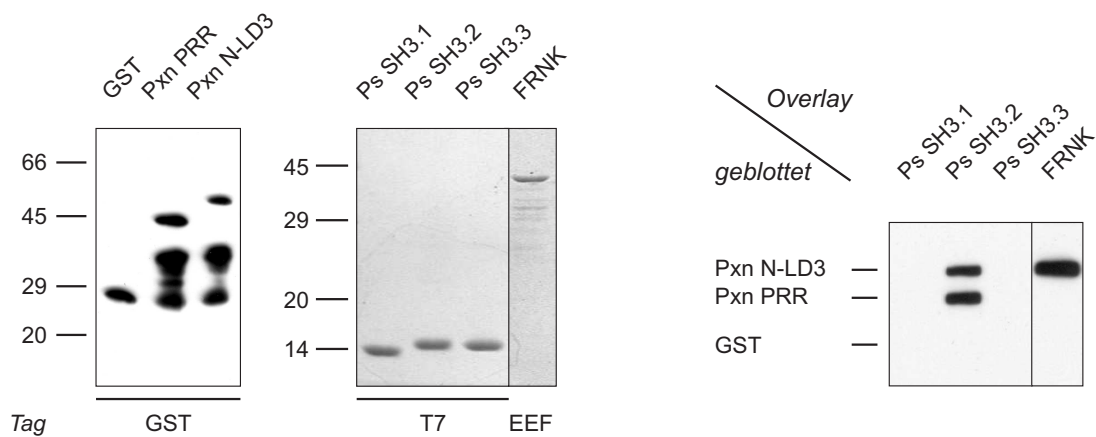


Abbildung 3.5: Überprüfung der Spezifität der Paxillin-Ponsin-Interaktion in Westernblot-Overlay-Experimenten. *Links*: Westernblot der aufgereinigten, rekombinanten GST-Fusionsproteine (Paxillin), nachgewiesen über einen GST-Antikörper. *Mitte*: Aufgereinigte, rekombinante Ponsin-Fragmente (markiert mit T7-Tag) und aufgereinigtes, rekombinantes FRNK (markiert mit EEF-Tag). Gezeigt sind Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gele. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kD angegeben. *Rechts*: Westernblot-Overlay-Experimente. GST und die beiden Paxillin-Fragmente (je 50 pmol) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert, mit den angegebenen Ponsin-Fragmenten bzw. FRNK inkubiert (je 500 pmol) und gebundene Proteine über ihre Immunotags nachgewiesen. Nur die zweite SH3-Domäne des Ponsins bindet an beide Paxillin-Konstrukte; FRNK bindet ausschließlich an das längere Paxillin-Fragment.

Die Bindung an Paxillin ist eine spezifische Eigenschaft der zweiten SH3-Domäne des Ponsins, keine Bindung wurde für die erste oder dritte SH3-Domäne beobachtet. Wie zu erwarten, wies die zweite SH3-Domäne des Ponsin eine Bindung sowohl an die Prolin-reiche Region als auch an ein längeres, aminotermiales Paxillin-Konstrukt, das die Bindungsregion enthält, auf, während eine unspezifische Bindung an GST nicht beobachtet wurde.

### 3.2.2.2 Einfluss weiterer Bindungspartner auf die Paxillin-Ponsin-Interaktion

Sowohl Vinculin als auch FAK wurden als Bindungspartner der zweiten SH3-Domäne des Ponsins beschrieben. Im Falle des Vinculins wurde von Mandai *et al.* (1999) durch Westernblot-Overlay-Experimente mit rekombinantem, radioaktiv markiertem Protein gezeigt, dass die zweite SH3-Domäne des Ponsins an die Prolin-reiche Region im Carboxyterminus des Vinculins bindet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Interaktion nicht reproduziert werden: Obwohl das verwendete Vinculin-Konstrukt dem von Mandai *et al.* entsprach, konnte eine Bindung dieses Fragments (EEF-markiertes Protein) an Ponsin nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Es ist zu vermuten, dass der hier verwendete experimentelle Ansatz, der auf Immundetektionen basierte, nicht sensitiv genug war, um diese Interaktion mit geringer Affinität nachzuweisen.

Ribon *et al.* (1998b) zeigten durch *GST pull down* Experimente mit Extrakten von NIH-3T3-Zellen, die stabil mit Ponsin transfiziert wurden, indirekt die Interaktion von FAK mit Ponsin: FAK wurde in der Protein-Fraktion nachgewiesen, die mit der zweiten SH3-Domäne des Ponsins (als GST-Fusionsprotein) interagierte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die direkte Interaktion von FAK und Ponsin mit rekombinanten Proteinen untersucht: In Westernblot-Overlay-Experimenten konnte keine Bindung von Ponsin an immobilisierte, EEF-markierte FAK nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da FAK ein Bindungspartner des Paxillins ist (Hildebrand *et al.*, 1995; Zachary, 1997) und in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass Paxillin an Ponsin bindet (s. o.), bestand die Möglichkeit, dass keine direkte Interaktion zwischen FAK und Ponsin besteht, sondern dass diese Interaktion durch Paxillin vermittelt wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der carboxyterminale Teil der FAK, der sowohl zwei Prolin-reiche Regionen als auch die Paxillin-Bindungsstelle enthält (vgl. Abb. B.1), als EEF-markiertes Protein in Westernblot-Overlay-Experimenten eingesetzt.

Dieser carboxyterminale Teil der FAK besitzt keine katalytische Aktivität und wird als *FAK-related non kinase* (FRNK) bezeichnet (Schaller *et al.*, 1993).

Zunächst ließ sich zeigen, dass FRNK an den Aminotermminus des Paxillins ('Pxn N-LD3') bindet (Abb. 3.5), nicht aber an die Prolin-reiche Region. Diese Ergebnisse bestätigen, dass das zweite LD-Motiv des Paxillins eine Bindungsstelle für die FAK darstellt (Tumbarello *et al.*, 2002).

Um zu überprüfen, ob die Interaktion des FRNK mit Paxillin die Bindung von Ponsin an Paxillin behindert, wurde geblottetes Paxillin-Protein mit einer konstanten Menge Ponsin in Gegenwart steigender Mengen FRNK als Kompetitor inkubiert (Abb. 3.6). Auch zehnfacher molarer Überschuss von FRNK hatte keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Paxillin und Ponsin. Dies impliziert, dass FRNK und die Prolin-reiche Region des Paxillin nicht um die zweite SH3-Domäne des Ponsin konkurrieren. Da die gleichzeitige Bindung von Ponsin und FRNK an Paxillin nachgewiesen wurde (Abb. 3.6 *rechts außen*), ist anzunehmen, dass die drei Proteine einen ternären Komplex bilden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die in der Literatur beschriebene Bindung von FAK an Ponsin (Ribon *et al.*, 1998b) indirekter Natur ist und über Paxillin vermittelt wird.

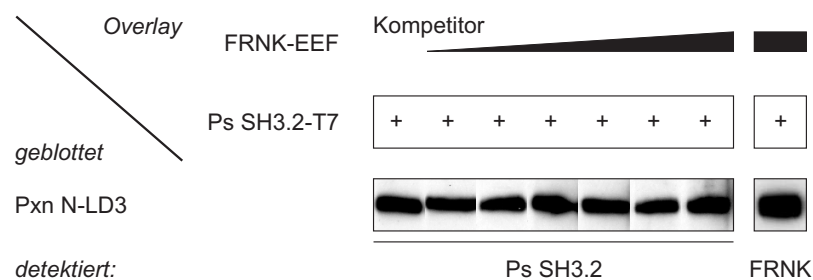


Abbildung 3.6: Konkurrenz von FRNK und Ponsin um Paxillin in Westernblot-Overlay-Experimenten. Das geblottete Paxillin-Fragment 'Pxn N-LD3' (50 pmol) wurde mit T7-markiertem Ponsin ('Ps SH3.2'; 250 pmol) inkubiert und gebundenes Ponsin über T7-Antikörper nachgewiesen. Steigende Mengen EEF-markierten FRNK-Proteins (0 pmol; 25 pmol; 125 pmol; 250 pmol; 500 pmol; 1,25 μmol und 2,5 μmol) hatten keinen Einfluss auf die Wechselwirkung. Zum Vergleich wurde für den letzten Ansatz zusätzlich gebundenes FRNK über seinen EEF-Tag nachgewiesen.

### 3.2.3 Klonierung einer Ponsin-cDNA

#### 3.2.3.1 Klonierungsstrategie

Die vollständige Sequenzierung eines der Hefe-Doppel-Hybrid-Klone ergab, dass dieser den carboxyterminalen kodierenden Bereich (1,4 kb) sowie die 3,3 kb lange 3'-untranslatierte Region (UTR) enthielt. Um eine vollständige Ponsin-cDNA zu erhalten, die die Insertion zwischen der zweiten und dritten SH3-Domäne enthielt, waren mehrere Klonierungsschritte notwendig (Abb. 3.7).

Zunächst wurde mit Hilfe eines pACT2-spezifischen Vorwärts-Primers und eines Insertions-spezifischen Rückwärts-Primers (Übergang Exon 30→31) Ponsin-DNA, die die Insertion enthielt, aus einer cDNA-Bibliothek amplifiziert (2). Dieses PCR-Produkt wurde als Matrize genutzt, um die Exone 16–29 zu amplifizieren (3). Über eine BamHI-Schnittstelle wurde dieses Stück mit dem ursprünglichen Hefe-Doppel-Hybrid-Klon, kloniert in pMypG (1), zusammengefügt (4, 5).

Der Aminoterminus des Ponsins wurde durch RT-PCR auf isolierter RNA von *in vitro* differenzierten HSkM-Zellen erhalten, in pGEMT kloniert und fünf Klone vollständig sequenziert (7). Für weitere Schritte wurde der Klon ausgewählt, dessen Sequenz am besten mit den Datenbankvorhersagen übereinstimmte (geringste Anzahl an Aminosäureaustauschen; s. u.).

Da keine geeigneten Schnittstellen zur Verfügung standen, wurde die vollständige cDNA durch PCR erhalten, indem auf beiden Teilstücken PCRs durchgeführt (6, 8) und die überlappenden Produkte als Matrize eingesetzt wurden, um die vollständige Ponsin-cDNA zu amplifizieren (9). Dieses PCR-Produkt wurde in pGEMT kloniert (10) und vier Klone vollständig sequenziert.

Im Vergleich zur genomisch vorhergesagten Aminosäuresequenz wiesen die cDNA-Klone 5 bis 9 Aminosäureaustausche<sup>2</sup> auf (Abb. C.7, vgl. Tab. B.6). Es ist anzunehmen, dass es sich dabei sowohl um PCR-Fehler als auch um Sequenzfehler im genomischen Datenbankeintrag sowie um *single nucleotide* Polymorphismen handeln könnte (Brookes, 1999). Für weitere Experimente wurde der Klon mit der geringsten Anzahl an Austauschen verwendet und als 'Ps FL' bezeichnet. Seine Sequenz ist im Anhang dargestellt (Abb. C.7).

---

<sup>2</sup>beobachtete Aminosäureaustausche (Häufigkeit): S9P (4), K68R (2), F530L (2), D625G (2), Q648R (4), H722R (1), I726T (2), K764E (1), E808G (2), S1011P (1), G1110V (4), E1148G (1), R1151G (2)



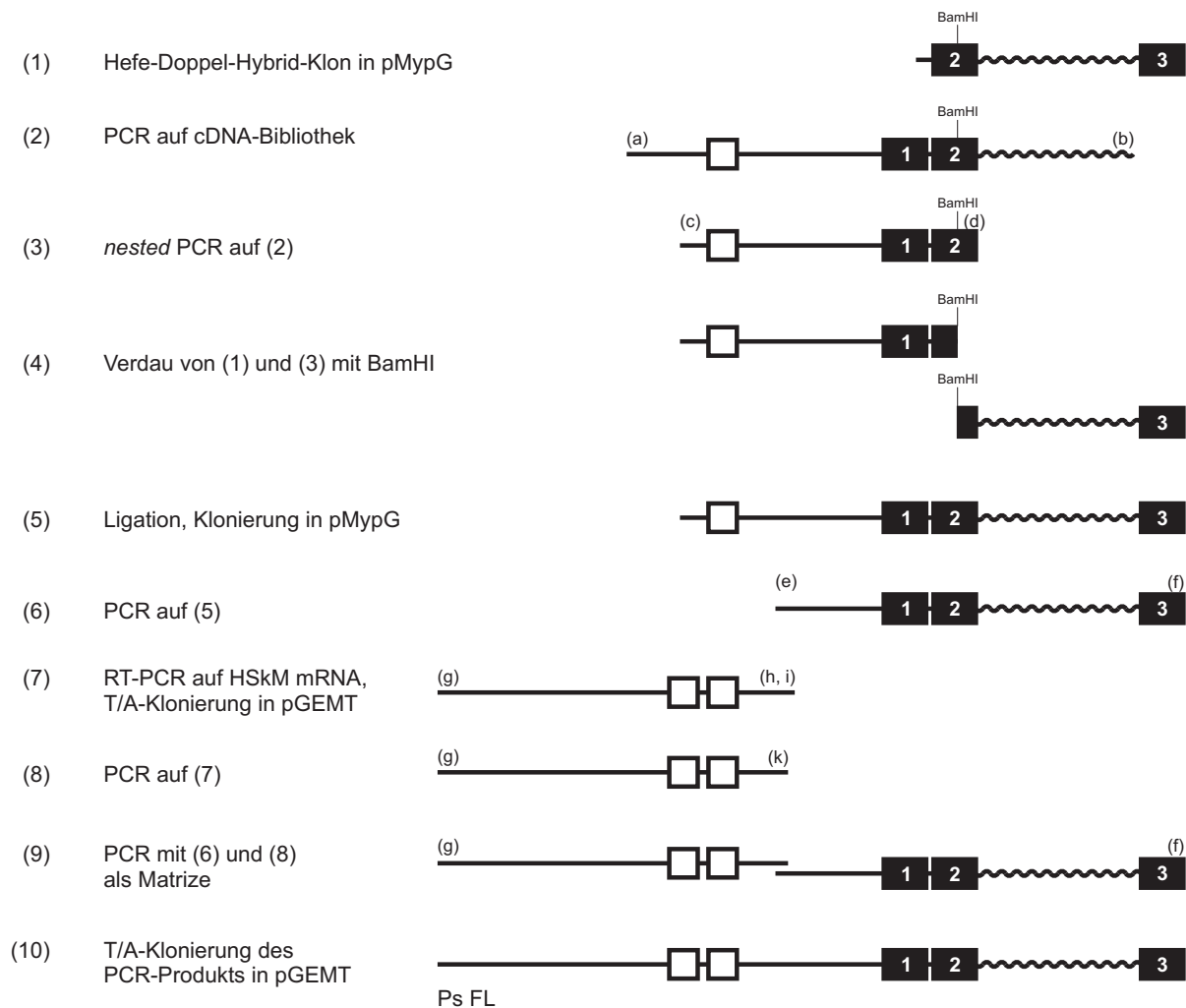


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Klonierung einer vollständigen Ponsin-cDNA ('Ps FL'). Im Ponsin sind die Lage der Sorbin-Homologie-Region (SoHo, weiße Boxen), der drei SH3-Domänen (schwarze Boxen) und der Insertion (Wellenlinie) angegeben. In Klammern angegebene Buchstaben bezeichnen die verwendeten Primer (s. Tab. D.1), die verwendete BamHI-Schnittstelle ist gekennzeichnet. Weitere Erläuterungen zu den Teilschritten (1–10) im Text (Abschnitt 3.2.3.1).

### 3.2.3.2 Expression alternativ gespleißter Exone

Die Exone 3, 5, 7, 12, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 25, 30 und 31 im Ponsin-Gen wurden als alternativ gespleißte Exone identifiziert (Lin *et al.*, 2001b; Abb. 3.8). Daraus resultiert auch eine Vielzahl von beschriebenen Ponsin-Isoformen (Mandai *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2003; Alcazar *et al.*, 2004).

Durch die Klonierung von 5'- und 3'-gelegenen partiellen cDNAs (Schritt 5 und 7 in Abb. 3.7) konnten Aussagen über die Expression dieser alternativ gespleißten Exone im Skelettmuskel getroffen werden. Zum Vergleich wurden 3'-gelegene Ponsinfragmente auch aus einer Herzmuskel-cDNA-Bibliothek amplifiziert, kloniert und ebenfalls sequenziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Die Exone 3, 5 und 7 waren, mit einer Ausnahme, in allen sequenzierten Klonen anzutreffen, während keiner der Klone Exon 14 oder 15 enthielt. Weiterhin kamen die Exone 12 und 13 in einem Teil der Klone vor. Auffällig war, dass beide Exone als Block enthalten oder abwesend waren. Im 3'-Bereich waren die Exone 19, 20, 21, 25, 30 und 31 im Skelettmuskel exprimiert. Ein Vergleich mit einer Herzmuskelbank ergab, dass die Exone 20, 21, 30 und 31 Skelettmuskel-spezifisch exprimiert sein könnten, da sie in Herzmuskel-Klonen nicht angetroffen wurden.

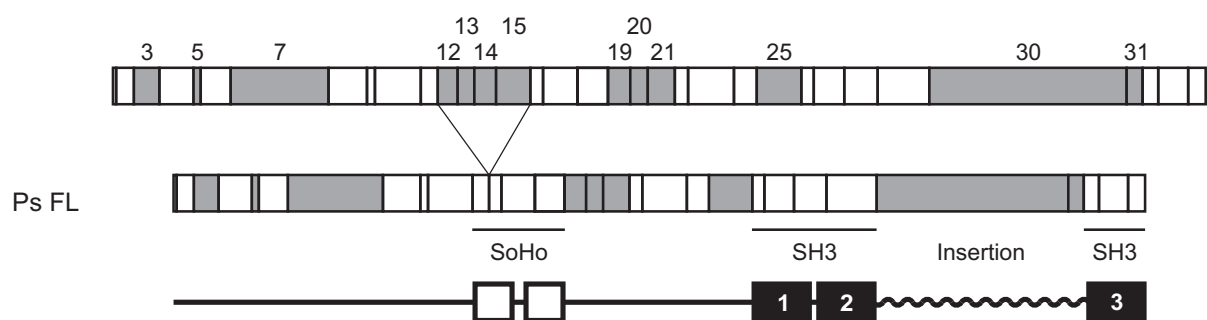


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Organisation des humanen Ponsin-Gens. Die Länge der Exone wird durch die Länge der Boxen reflektiert, alternativ gespleißte Exone sind grau hervorgehoben und nummeriert (*oben*). *Mitte*: Die Darstellung zeigt, welche alternativ gespleißten Exone in der klonierten Ponsin-cDNA ('Ps FL') enthalten sind. Zum Vergleich ist das kodierte Ponsin-Protein mit der Sorbin-Homologie-Region (SoHo, weiße Boxen), den drei SH3-Domänen (schwarze Boxen) und der Insertion (Wellenlinie) dargestellt (*unten*).

Tabelle 3.1: Alternativ gespleißte Exone in klonierten, partiellen Ponsin-cDNAs. Angegeben sind das Vorhandensein (+) oder die Abwesenheit (–) der Exone in sequenzierten Klonen, die aus Skelettmuskel-cDNA amplifiziert wurden. Für den carboxyterminalen Bereich (Exone 19–31) ist auch des Expressionsmuster im Herzen angegeben. Falls das Exon nicht in allen Klonen anwesend/abwesend war, geben hochgestellte Ziffern an, in wievielen der sequenzierten Klone dieses Exon gefunden wurde.

Exon	3	5	7	12	13	14	15	19	20	21	25	30	31
Skelettmuskel	(+) <sup>4/5</sup>	+	+	+/- <sup>2/5</sup>	+/- <sup>2/5</sup>	–	–	+	+	+	+	+	+
Herz								+	–	–	+	–	–

### 3.2.3.3 Expressionsmuster der Exone 30 und 31 in verschiedenen Muskelgeweben

Bis jetzt wurde in der Literatur keine vollständige Ponsin-cDNA beschrieben, die beide Exone 30 und 31 enthielt, welche für eine Insertion zwischen der zweiten und dritten SH3-Domäne kodieren. Mehrere Datenbankeinträge (insbesondere ESTs, Tab. B.6) belegen jedoch, dass diese Kombination tatsächlich exprimiert wird. Da die sequenzierten Klone, die aus einer Skelettmuskel-cDNA-Bank amplifiziert wurden, diese Kombination enthielten, sie aber nicht in Klonen einer Herzmuskelbank gefunden wurde, sollte überprüft werden, ob diese Insertion tatsächlich Skelettmuskel-spezifisch ist. Dazu wurden PCRs auf verschiedenen cDNA-Bibliotheken durchgeführt (Abb. 3.9).

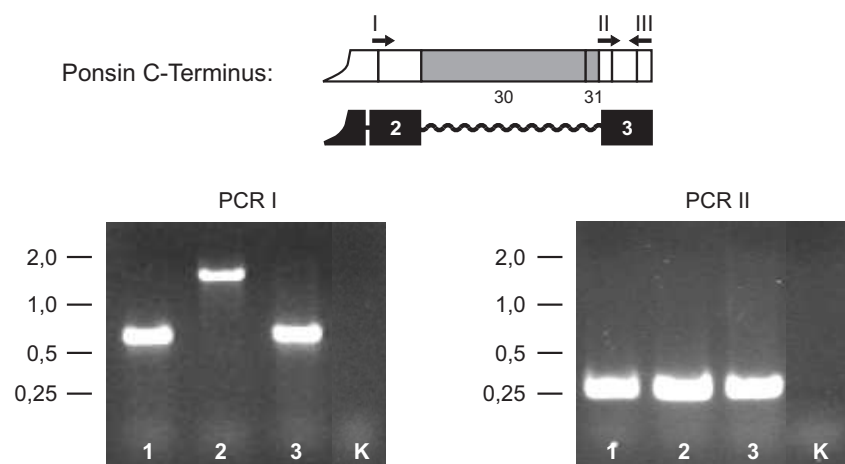


Abbildung 3.9: Expression der Exone 30 und 31 in verschiedenen Muskel-Geweben. *Oben*: Schematische Darstellung des Ponsin-Carboxyterminus. Die Pfeile markieren die Positionen der verwendeten Primer (Sequenz s. Tab. D.1). *Unten*: Gele mit PCR-Produkten, *links* Primer-Kombination I+III, *rechts* Primer-Kombination II+III; verwendete cDNA-Bibliotheken: 1 - humanes adultes Herz, 2 - humaner adulter Skelettmuskel, 3 - humanes fötales Herz, K - Kontrolle ohne Matrize. Die Molekulargewichte der Marker-DNAs sind in kb angegeben.

Ein Primer-Paar wurde so gewählt, dass das PCR-Produkt die Insertion einschließt, das zweite Paar amplifizierte nur die dritte SH3-Domäne. Da für die Primer-Sequenzen Bereiche in nicht alternativ gespleißten Exonen gewählt wurden, konnte aus der Größe des ersten Amplifikates auf die Anwesenheit der Insertion (1419 bp mit Insertion, 585 bp ohne Insertion) geschlossen werden. Die zweite PCR diente als Kontrolle für die Spezifität der Reaktion (261 bp).

Alle Ponsin-PCR-Produkte, die aus Skelettmuskel-cDNAs amplifiziert wurden, enthielten die Insertion. Hingegen war die Insertion nicht in PCR-Produkten aus Herzgeweben nachweisbar. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Insertion im Carboxyterminus eine Skelettmuskel-spezifische Eigenschaft von Ponsin-Proteinen ist.

### **3.2.4 Expression und Lokalisation des endogenen Ponsins in quergestreiften Muskelzellen**

Die Expression von Ponsin in Muskelgeweben wurde in Westernblot- und Immunfluoreszenz-Anwendungen mit Hilfe eines kommerziellen Antikörpers analysiert (s. Tab. B.1). Da das Epitop des Antikörpers in einem nicht alternativ gespleißten Exon liegt, erkennt der Antikörper alle exprimierten Isoformen.

#### **3.2.4.1 Westernblot-Analyse**

Die Expression von Ponsin wurde auf Westernblot-Ebene in Totalextrakten *in vitro* differenzierter HSkM-Zellen sowie adulter Muskelgewebe untersucht (Abb. 3.10).

Im adulten Skelettmuskel ist Ponsin als prominente Bande um 160 kD nachweisbar. Die Unterschiede zum berechneten Molekulargewicht (139,3 kD) sind durch einen überdurchschnittlich hohen Anteil von Prolin (10 %) erklärbar. Unproteolysiertes rekombinantes Ponsin ('Ps FL' in pET23aT7) zeigte eine vergleichbare elektrophoretische Mobilität. Da keine schneller migrierenden Banden in der Skelettmuskel-Probe beobachtet wurden, ist davon auszugehen, dass alle nachgewiesenen Ponsin-Varianten die carboxyterminale Insertion (Größe 29,7 kD) enthalten. Eine Aussage zur Expression der Exone 12 und 13 (s. Abschnitt 3.2.3.2) im nachgewiesenen Ponsin-Protein war nicht möglich, da der Größen-Unterschied von Isoformen mit und ohne Exon 12 und 13 gering ist (5,2 kD).

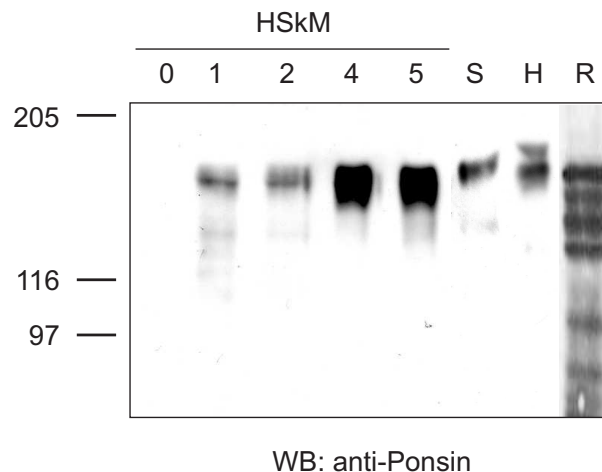


Abbildung 3.10: Expression endogenen Ponsins in humanen Muskelextrakten. Auftragung von links: Totalextrakte von HSkM-Zellen (0–5, die Ziffern geben an, wieviele Tage die Zellen *in vitro* differenziert wurden), von adultem Skelettmuskel (S) und adultem Myokard (H). Zum Vergleich ist rekombinantes Ponsin ('Ps FL', R) aufgetragen; in dieser Probe ist die am langsamsten migrierende Bande das unproteolysierte Protein, schneller migrierende Banden stellen Abbauprodukte dar. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kD angegeben. Anmerkung: Kürzere Expositionszeiten belegen, dass auch in den Proben 4 und 5 genau eine Bande detektiert wird; die elektrophoretische Mobilität dieser Bande stimmt der in den Proben 1, 2 und S überein.

In proliferierenden HSkM-Zellen war Ponsin nicht nachweisbar, es wurde jedoch bereits einen Tag nach Induktion des myogenen Programmes exprimiert. Mit fortschreitender Differenzierung nahm die Ponsin-Menge in den Myotuben stark zu. In allen Differenzierungsstadien war nur eine prominente Ponsin-Bande zu beobachten, die dem Ponsin im adulten Skelettmuskel entspricht.

Schwieriger zu interpretieren sind die Befunde im Herzmuskel. Im adulten Myokard des Menschen (Abb. 3.10) und der Ratte (Daten nicht gezeigt) war Ponsin als Doppel-Bande (ca. 160 und 175 kD) nachweisbar. Während die schneller migrierende Bande der Größe nach der Skelettmuskel-Variante entsprach, war die langsamer migrierende Band sogar so groß, dass sie nicht durch ein Ponsin-Protein, das alle alternativ gespleißten Exone enthält, erklärt werden könnte (149,0 kD). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Expressionsdaten auf mRNA-Ebene, nach denen Herz-Varianten des Ponsins (ohne Exons 19, 20, 30 und 31; vgl. Abschnitt 3.2.3.2) eine maximale Größe von 122,7 kD aufweisen dürften. Ob die beobachtete elektrophoretische Mobilität der Ponsin-Varianten im Herzen das Resultat umfangreicher posttranslationaler Modifikationen ist, oder diese Varianten noch unidentifizierte alternativ gespleißte Exone enthalten, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

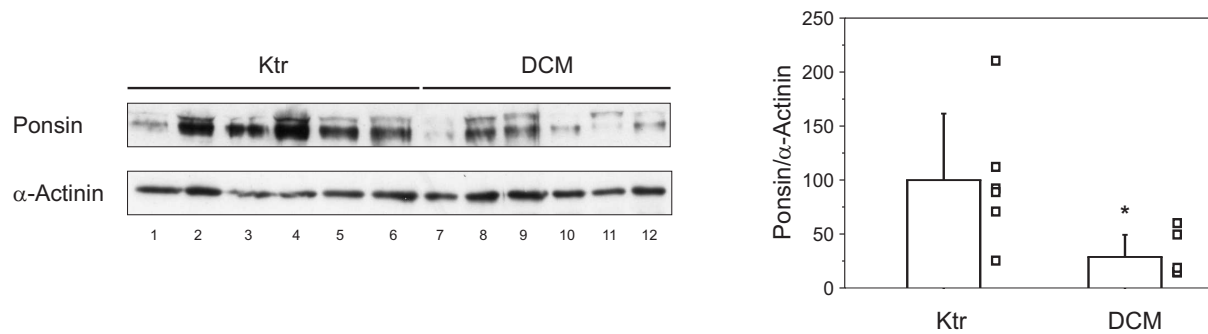


Abbildung 3.11: Expression von Ponsin und  $\alpha$ -Actinin im Myokard von DCM-Patienten. *Links*: In Westernblots detektiertes Ponsin und sarkomeres  $\alpha$ -Actinin in Kontrollgeweben (Ktr) und Extrakten von DCM-Patienten (DCM). Ponsin wurde mit einem polyklonalen Serum,  $\alpha$ -Actinin mit dem monoklonalen Antikörper (mAB) EA53 nachgewiesen. *Rechts*: Densitometrische Auswertung der Blots. Der Ponsin-Gehalt wurde auf den  $\alpha$ -Actinin-Gehalt der gleichen Probe normiert und der Mittelwert des Kontrollkollektives auf den Wert 100 gesetzt. Relativ zum Kontrollkollektiv sind der Mittelwert und Standardabweichung des DCM-Kollektives aufgetragen. Rechts der Mittelwerte sind die mit gleichem Skalierungsfaktor multiplizierten Werte der einzelnen Proben des Kollektives aufgetragen. \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,04$ ).

Durch Kooperation mit verschiedenen medizinischen Einrichtungen standen unserer Arbeitsgruppe Myokardproben von DCM-Patienten zur Verfügung. Damit bot sich die Möglichkeit zu überprüfen, ob Ponsin im erkrankten Myokard verändert exprimiert wird. Die explantierten Herzen dieser DCM-Patienten und abgelehnte Spenderherzen als Kontrollgewebe wurden vom Deutschen Herzzentrum Berlin und dem Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen (Bad Oeynhausen) zur Verfügung gestellt (s. Tab. B.5 im Anhang). Von allen Gewebeproben (6 Kontroll- und 6 DCM-Proben) wurden Totalextrakte hergestellt und der Proteingehalt auf Coomassie-gefärbten Gelen abgeschätzt. Nach Angleichung der Proteinmenge wurden die Proben erneut durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und Ponsin sowie sarkomeres  $\alpha$ -Actinin im Westernblot nachgewiesen (Abb. 3.11). Bei der anschließenden densitometrischen Auswertung der Gele wurden die detektierten Ponsin-Banden auf den Gehalt an  $\alpha$ -Actinin in der gleichen Probe normiert. Die normierten Werte der einzelnen Proben sind in Tab. B.5 zusammengefasst.

Sarkomeres  $\alpha$ -Actinin wurde aus verschiedenen Gründen als Referenzprotein ausgewählt: Das häufig verwendete Grundstoffwechsel-Enzym GAPDH erwies sich in Vorversuchen als Referenzprotein ungeeignet, da seine Detektion und Quantifizierung in den untersuchten Proben nicht zufriedenstellend reproduzierbar war. Aktuelle Untersuchungen von Aquila *et al.* (2004) haben gezeigt, dass  $\alpha$ -Actinin – im Gegensatz zu Desmin bzw.  $\beta$ -Tubulin – weder in hypertrophierten noch in terminal-insuffizienten Herzen signifikant veränderte

Expression aufweist. Neben praktischen Gesichtspunkten (z. B. Verfügbarkeit geeigneter Antikörper) hat die Verwendung eines sarkomeren Markers schließlich den Vorteil, dass zelluläre Hypertrophie-Effekte oder Fibrose des Gewebes berücksichtigt werden.

Ponsin war in den untersuchten Herzproben ebenfalls als Doppelbande detektierbar, schneller migrierende Banden wurden nicht beobachtet. In Kontrollherzen zeigte sich eine erhebliche Schwankungsbreite der normierten Ponsin-Gehalte. Dieses Bild ergab sich auch für weitere Proteine (z. B. MLP, vgl. Abb. 3.42).

Im an DCM erkrankten, terminal-insuffizienten Myokard waren die Ponsin-Gehalte dramatisch reduziert. Auffällig war eine Probe (Bahn 11 in Abb. 3.11; Probe '1706'), in welcher der Anteil der langsamer migrierenden Bande erhöht war. Ob es sich hier um die vermehrte Expression einer Isoform oder um posttranslationale Modifikationen handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Ponsin im terminal-insuffizienten Herz signifikant vermindert exprimiert ist.

#### **3.2.4.2 Immunfluoreszenz-Untersuchungen**

Um die subzelluläre Lokalisation des Ponsins in quergestreiften Muskelgeweben zu analysieren, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von Skelett- und Herzmuskel der Ratte durchgeführt. Dabei sollten Doppelmarkierungen mit Paxillin Aufschluss darüber geben, ob die Interaktion der beiden Proteine *in vivo* Relevanz für Strukturen der Zell-Matrix-Kontakte hat.

In beiden Gewebetypen wies Ponsin eine costamerische Lokalisation auf (Abb. 3.12), was sich durch konfokale Mikroskopie und Gegenfärbung mit einem Z-Scheiben-Marker belegen ließ: Die periodische Anfärbung Zellmembran-assoziiierter Strukturen auf Höhe der Z-Scheiben entsprach dem Erwartungsbild eines costamerischen Proteins im Längsschnitt (Pardo *et al.*, 1983). In Kardiomyozyten befand sich Ponsin zusätzlich in den Glanzstreifen. In Übereinstimmung mit Daten von Mandai *et al.* (1999) kolokalisierte Ponsin mit Vinculin in diesem Zelltyp (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte Paxillin nicht in adulten Skelett- oder Herzmuskelzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Technische Probleme bei den Immunfluoreszenz-Färbungen konnten ausgeschlossen werden, weil das Protein deutlich in den Blutgefäßen nach-

weisbar war (Daten nicht gezeigt).

Da Paxillin und Ponsin keine Kolo-kalisation in adulten Geweben aufwiesen, sollte geprüft werde, ob die Interaktion der beiden Proteine eine Rolle in sich entwickelnden Muskeln spielen könnte. Dazu wurden Immunfluoreszenz-Analysen *in vitro* kultivierter HSkM-Zellen durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Westernblot-Befunden war Ponsin in proliferierenden HSkM-Zellen nicht nachweisbar, während Paxillin in den Fokalkontakten lokalisiert war (Abb. 3.13, erste Reihe). Einen Tag nach Beginn der myogenen Differenzierung war Ponsin deutlich exprimiert und zeigte Kolo-kalisation mit Paxillin in den Zell-Matrix-Kontakten (Abb. 3.13, Reihe 2). Doppelmarkierungen mit mAB T12 (gerichtet gegen ein Titin Z-Scheiben-Epitop) in differenzierenden HSkM-Zellen belegten, dass der Beginn der Ponsin-Expression etwa zeitgleich mit der des Titins nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Da Titin früh nach Beginn der Differenzierung exprimiert wird (Van der Loop *et al.*, 1996), ist Ponsin als eines der ersten muskelspezifisch exprimierten Proteine der Zell-Matrix-Kontakte zu bewerten.

In weiter differenzierten Zellen verstärkte sich die Expression des Ponsins, welches weiterhin mit Paxillin in verschiedenen Zell-Matrix-Strukturen kolo-kalisierte. Gleichzeitig zeigte Paxillin eine abnehmende Signalintensität in diesen Strukturen (Abb. 3.13, Reihen 3–4).

Aus diesen Untersuchungen kann geschlussfolgert werden, dass die Interaktion zwischen Paxillin und Ponsin ein transientes Ereignis während der Differenzierung der Skelettmuskelzellen ist und nur in Vorläuferstrukturen der Costamere stattfindet; für „reife“ Zell-Matrix-Strukturen adulter Gewebe hingegen keine Bedeutung hat.



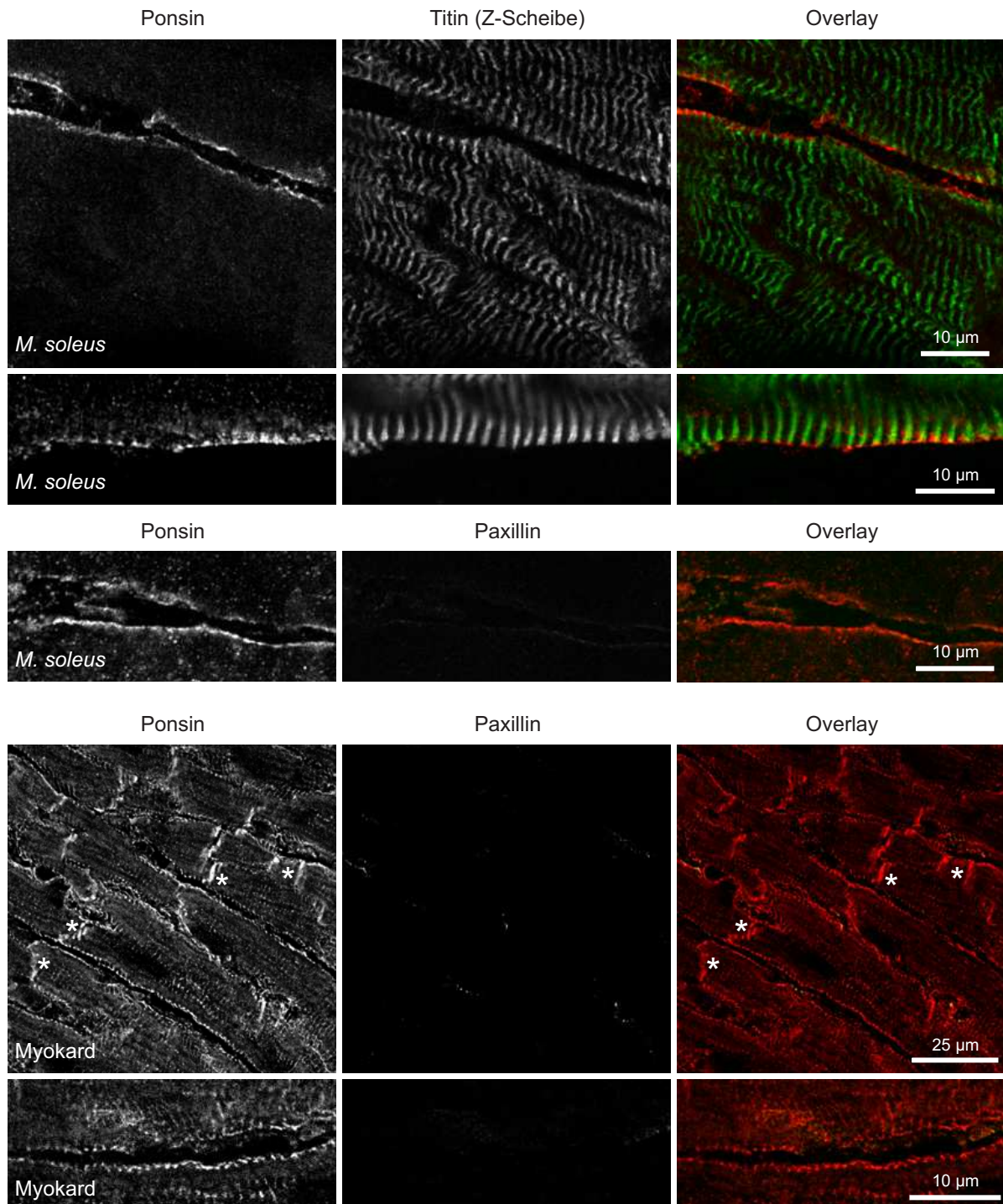


Abbildung 3.12: Lokalisation von Ponsin in adulten quergestreiften Muskelgeweben der Ratte. Dargestellt sind konfokale Bilder des Skelettmuskels (*M. soleus*, Reihen 1–3) sowie des Herzens (Reihen 4–5). Erste Spalte: Ponsin, zweite Spalte: Titin Z-Scheibe (Reihen 1–2) bzw. Paxillin (Reihen 3–5), dritte Spalte: Zwei-Kanal-Bild (Ponsin rot, Titin bzw. Paxillin grün). Ponsin wies in diesen Geweben costamerische Lokalisation auf, im Myokard befand es sich zusätzlich in den Glanzstreifen (\*). Der mAB gegen Titin (T12) färbte spezifisch Z-Scheiben an, während Paxillin in adulten Muskelzellen nicht nachweisbar war.

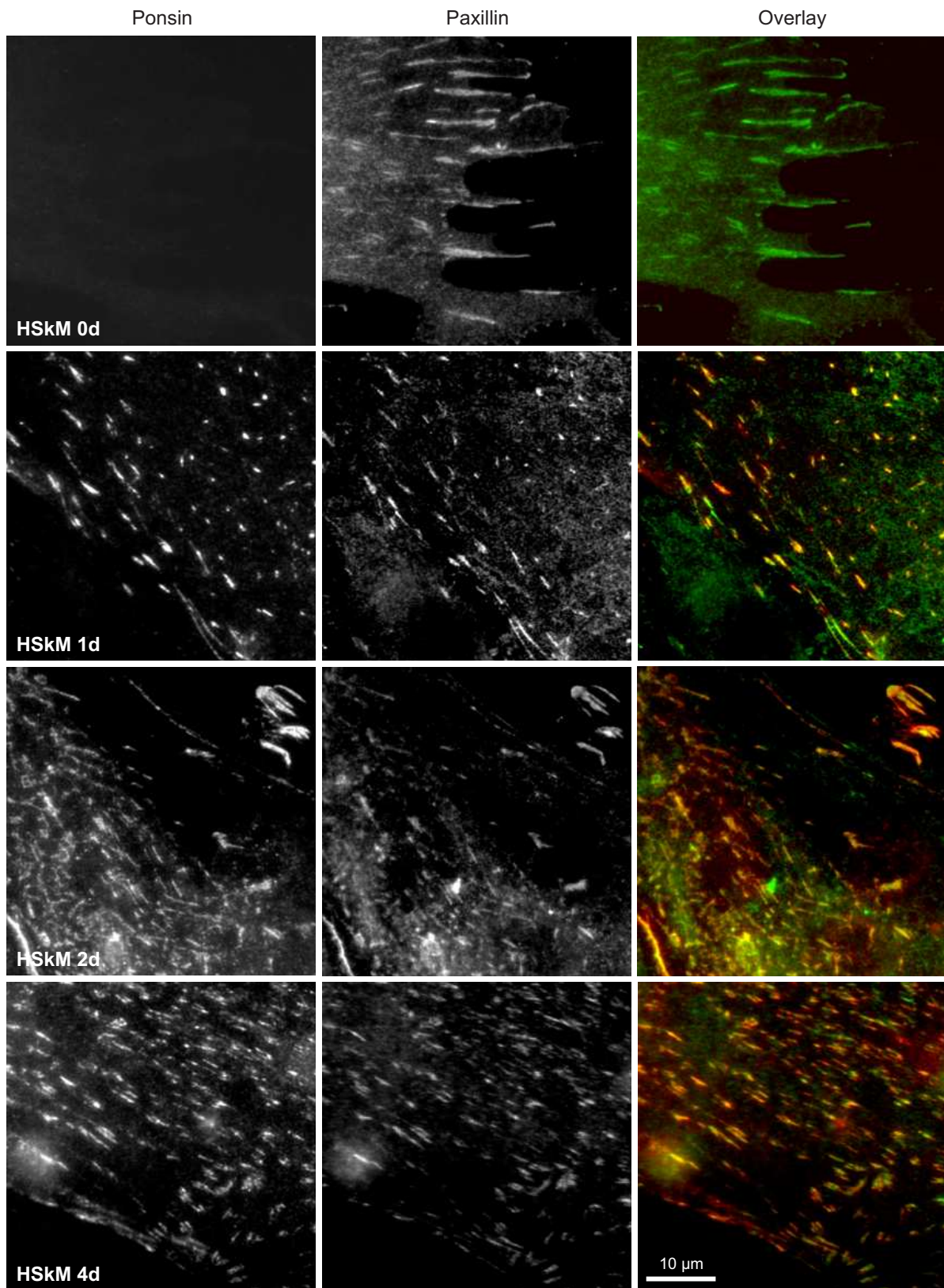


Abbildung 3.13: Lokalisation von Ponsin und Paxillin in proliferierenden und differenzierenden HSkM-Zellen. Es ist angegeben, für wieviele Tage die Zellen *in vitro* differenziert wurden (Reihen 2–4), 0 d - proliferierende Zellen (erste Reihe). Erste Spalte: Ponsin, zweite Spalte: Paxillin, dritte Spalte: Zwei-Kanal-Bild (Ponsin rot, Paxillin grün). Nach Beginn der myogenen Differenzierung kolokalisierten Ponsin und Paxillin in Zell-Matrix-Kontakten.

### 3.2.4.3 Expression der Skelettmuskel-spezifischen Insertion in differenzierenden Skelettmuskelzellen

Die Daten zur Expression der Exone 30 und 31 auf Nukleinsäureebene implizieren, dass alle Ponsin-Varianten im Skelettmuskel die Insertion exprimieren (s. Abschnitt 3.2.3.3). Um diese Aussage auch auf der Ebene der Protein-Expression zu bestätigen, wurde in Kooperation mit der AG Prof. Micheel (Universität Potsdam) ein polykonalen Serum gegen den Carboxyterminus des Ponsins generiert. Dazu wurde eine Maus mit dem Konstrukt 'Ps SH3.2-C' immunisiert. Mit Hilfe dieses Serums konnten endogenes Ponsin kultivierter HSkM-Zellen sowie rekombinante Ponsin-Fragmente, die Epitope des Immunisierungskonstruktes enthielten, detektiert werden (Abb. 3.14, Ansatz C). Nach Absättigung des Serums mit dem zur Immunisierung benutzten Antigen ('Ps SH3.2-C') waren diese Signale nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.14, Ansatz A). Dies beweist die Spezifität der beobachteten Signale.

Durch eine selektive Blockierung des Serums mit dem rekombinanten Ponsin-Fragment 'Ps SH3.2-C  $\Delta$ Ex30,31' wurde eine Insertions-spezifische Serumfraktion erhalten (Abb. 3.14, Ansatz B). Mit Hilfe dieser Serumfraktion wurden rekombinante Ponsin-Fragmente, welche die Insertion enthielten ('Ps SH3.1-C', 'Ps SH3.2-C' sowie 'Ps Ex30,31') in Westernblot- und Immunfluoreszenz-Anwendungen detektiert, nicht aber Fragmente ohne die Insertion ('Ps SH3.1-C  $\Delta$ Ex30,31' und 'Ps SH3.2-C  $\Delta$ Ex30,31'). In differenzierenden HSkM-Zellen konnte mit der Insertions-spezifischen Serumfraktion endogenes Ponsin in den Zell-Matrix-Kontakten nachgewiesen werden (Abb. 3.14, III rechts). Diese Strukturen entsprachen exakt den Strukturen, die auch mit dem kommerziellen Ponsin-Antikörper angefärbt wurden, der mit allen Ponsin-Varianten reagiert. Somit belegen diese Experimente, dass die untersuchten Skelettmuskelzellen in allen angefärbten Strukturen Ponsin-Varianten mit der Skelettmuskel-spezifischen Insertion exprimieren.

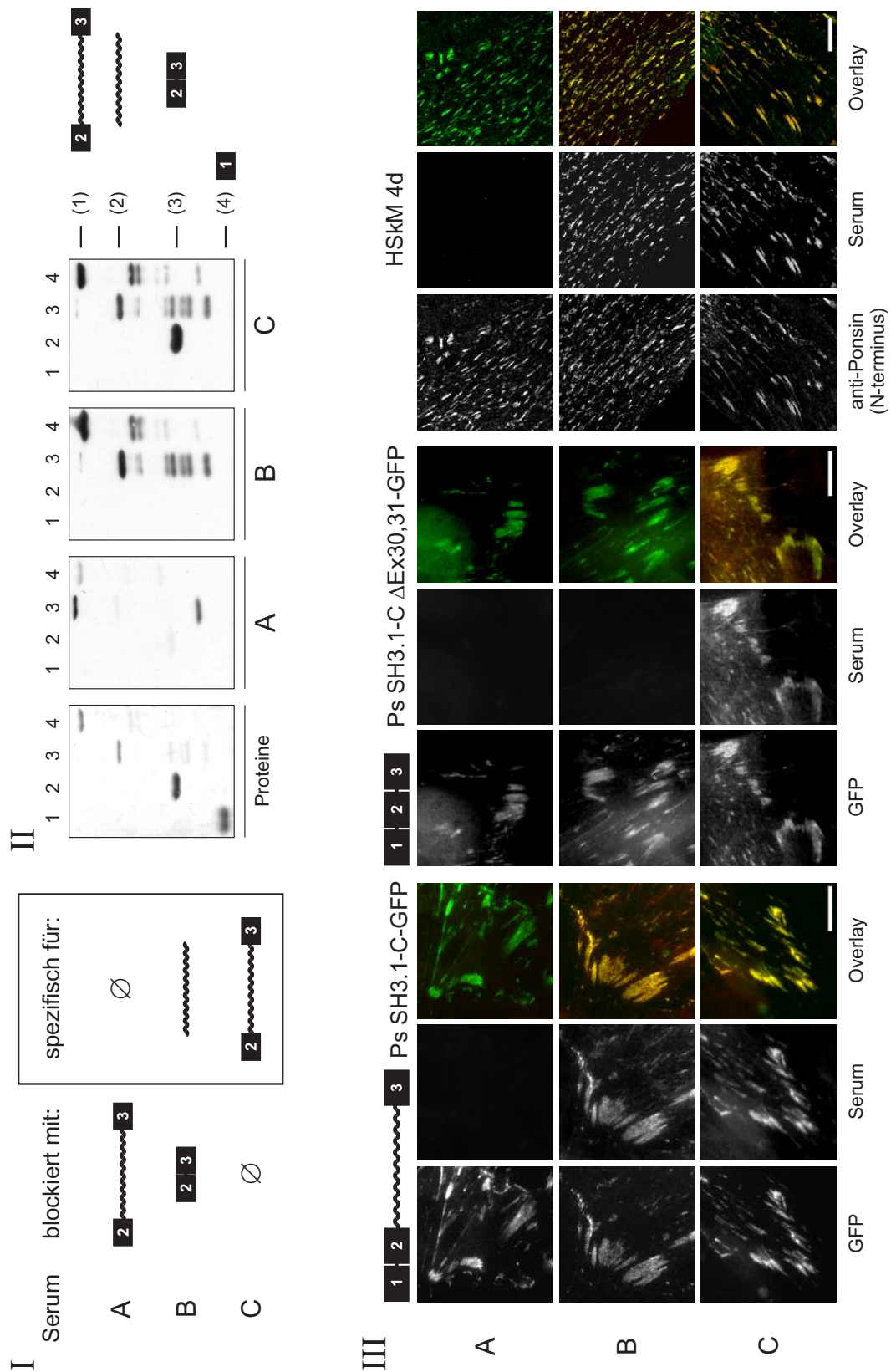


Abbildung 3.14: Expression der Skelettmuskel-spezifischen Insertion in HSkM-Zellen; Erläuterungen auf S. 67.

Abbildung 3.14 (Seite 66):

Nachweis der Expression der Skelettmuskel-spezifischen Insertion in HSkM-Zellen mit Hilfe einer Insertions-spezifischen Serumfraktion.

*I* - Durch selektive Blockierung eines polyklonalen Serums mit dem rekombinanten Ponsin-Fragment 'Ps SH3.2-C ΔEx30,31' wurde eine Serumfraktion erhalten, die spezifisch mit der Insertion reagierte (Ansatz B). Zum Vergleich wurden das ursprüngliche Serum (C) und ein Ansatz, der vollständig blockiert wurde (A), verwendet (nähere Erläuterungen im Text).

*II* - Detektion rekombinanter Proteine mit den in *I* beschriebenen Ansätzen (A–C) im Westernblot. Rekombinante, T7-markierte Ponsin-Konstrukte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit den verschiedenen Ansätzen inkubiert. Proben-Auftragung von links: 1 - 'Ps SH3.1' (Kontrollprotein), 2 - 'Ps SH3.2-C ΔEx30,31', 3 - 'Ps Ex30,31', 4 - 'Ps SH3.2-C'. Zum Vergleich ist eine Ponceau-Rot-Färbung der vier Proteine dargestellt ('Proteine').

*III* - Anwendung der Ansätze in Immunfluoreszenz-Analysen. *Links und Mitte*: PtK2-Zellen wurden mit Ponsin-GFP-Fusionsproteinen transfiziert (*links* - 'Ps SH3.1-C', *Mitte* - 'Ps SH3.1-C ΔEx30,31') und die rekombinanten Proteine mit den verschiedenen Ansätzen angefärbt. Die Insertions-spezifische Serumfraktion B reagierte ausschließlich mit dem Konstrukt, das die Insertion enthielt (*links*). Spalte 1 - GFP-Fusionsprotein, Spalte 2 - Serum, Spalte 3 - Zwei-Kanal-Bild (GFP grün, Serum rot). *Rechts*: In *in vitro* differenzierten HSkM-Zellen (Differenzierungstag 4) wurde endogenes Ponsin mit Hilfe der Ansätze nachgewiesen (Spalte 2). Zum Vergleich wurde Ponsin mit einem unabhängigen Antikörper angefärbt (Spalte 1, kommerzieller Ponsin-Antikörper mit aminoterminalem Epitop). Spalte 3 - Zwei-Kanal-Bild (aminoterminales Epitop grün, Serum rot). Die Anfärbung von Zell-Matrix-Kontakten mit Hilfe der Insertions-spezifischen Serumfraktion B belegt, dass HSkM-Zellen die Skelettmuskel-spezifische Insertion exprimieren (Maßstabsbalken - 10 µm).

---

## 3.2.5 Transfektionsstudien

### 3.2.5.1 Transfektionsstudien in Nichtmuskelzellen

Ziel der nachfolgenden Transfektionsstudien war zu untersuchen, welche Bereiche des Ponsin-Proteins für die Lokalisation in den oben beschriebenen Strukturen verantwortlich sind. Dazu wurden 13 verschiedene Konstrukte als GFP-Fusionsproteine<sup>3</sup> in PtK2-Zellen transfiziert, welche ein leicht transfizierbares Nichtmuskel-Modellsystem darstellen (Abb. 3.15, 3.16 und 3.17). Die verwendeten Konstrukte sind im Anhang schematisch dargestellt (Abb. B.1, ausklappbar).

**Die Paxillin-Bindungsregion im Ponsin** Die Paxillin-Bindungsregion 'Ps SH3.2' zeigte in diesen Zellen eine schwache Lokalisation an Stressfasern und Fokalkontakten, also an Strukturen, die mit dem Actin-Zytoskelett assoziiert sind (Abb. 3.15). Die schwache, kontinuierliche

---

<sup>3</sup>eigentlich *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), nachfolgend als GFP bezeichnet

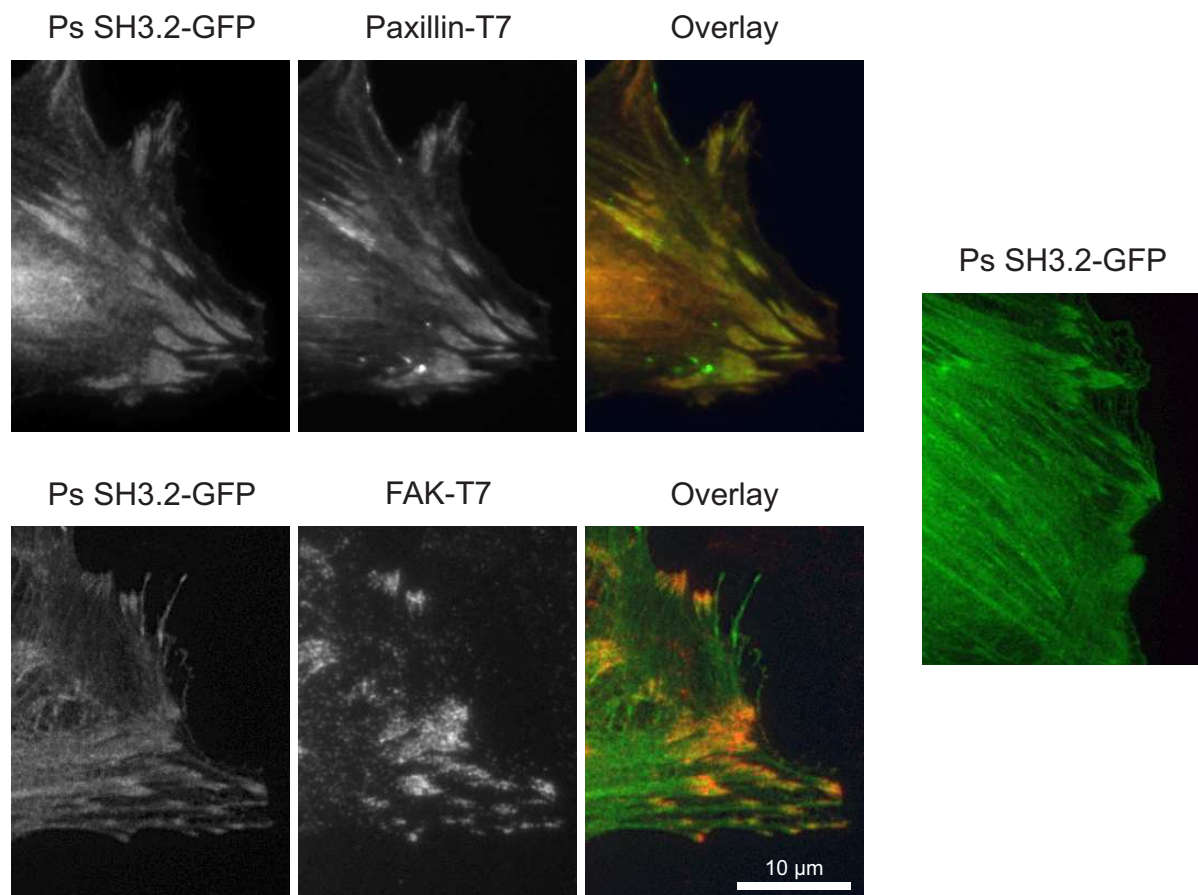


Abbildung 3.15: Transfektion von Ponsin, Paxillin und FAK in PtK2-Zellen. Die Paxillin-Bindungsregion im Ponsin 'Ps SH3.2' wurde als GFP-Fusionsprotein, allein oder zusammen mit potentiellen Bindungspartnern, in PtK2-Zellen exprimiert. *Links*: Immunfluoreszenz-Färbungen fixierter, doppelt-transfizierter Zellen, die 'Ps SH3.2' und rekombinantes, T7-markiertes Paxillin (erste Reihe) bzw. FAK (Reihe 2) koexprimierten; Spalte 1 - 'Ps SH3.2', Spalte 2 - Paxillin bzw. FAK, Spalte 3 - Zwei-Kanal-Bild (Ponsin grün, Paxillin bzw. FAK rot). Zum Vergleich ist eine Transfektion von 'Ps SH3.2' allein dargestellt (*rechts*).

Dekoration der Stressfasern ist kritisch zu bewerten und als nicht spezifisch einzuordnen, da auch transfiziertes GFP allein diese in fixierten Zellen aufwies (Daten nicht gezeigt). In doppelt-transfizierten Zellen, die dieses Ponsin-Konstrukt und rekombinantes Paxillin koexprimierten, kolokalisierten beide Proteine prominent in den Fokalkontakten, während eine Dekoration der Stressfasern kaum beobachtet wurde (Abb. 3.15). Im Gegensatz dazu war die transfizierte FAK, die ebenfalls in den Fokalkontakten lokalisierte, nicht in der Lage, diese SH3-Domäne des Ponsins zu den Fokalkontakten zu rekrutieren. Dies bestätigt die Paxillin-Ponsin-Interaktion und ist ein weiterer Hinweis darauf, dass FAK keine direkte Bindung an dieses Ponsin-Konstrukt aufweist.

**Carboxyterminale Trunktions- und Deletions-Konstrukte** Da die Paxillin-Bindungsregion allein nur eine schwache Lokalisation zeigte, stellte sich die Frage, welche Region bzw. Regionen des Ponsins für seine Lokalisation verantwortlich sind. Dazu wurden verschiedene Trunktions- und Deletions-Konstrukte als GFP-Fusionsproteine in PtK2-Zellen exprimiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Eine vollständige, umfassende bildliche Darstellung aller Transfektionsergebnisse würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, daher sind nachfolgend nur ausgewählte Konstrukte dargestellt.

Die einzelnen SH3-Domänen ('Ps SH3.1', 'Ps SH3.2' und 'Ps SH3.3') zeigten ein recht einheitliches Bild: Die Konstrukte dekorierten die Stressfasern kontinuierlich und zeigten eine wenig prominente Anfärbung der Fokalkontakte (Abb. 3.15 rechts und Abb. 3.16 Reihe 5). Dabei ist zu vermuten, dass diese subzelluläre Lokalisation vom GFP-Fusionsanteil verursacht wurde (s. o.). Die dritte SH3-Domäne wies zusätzlich eine Kernlokalisation auf und war auch an den Zell-Zell-Verbindungen detektierbar.

Das Konstrukt 'Ps Ex30,31', das die Skelettmuskel-spezifische Insertion kodiert, wies vor allem eine diffuse Lokalisation im Zytoplasma auf. Gelegentlich wurde das Protein auch im Kern detektiert oder zeigte unspezifische Bindung an Stressfasern und Fokalkontakte (Abb. 3.16 Reihen 3–4.)

Die Kombination der zweiten und dritten SH3-Domäne ('Ps SH3.2-C ΔEx30,31') entsprach im Wesentlichen den Transfektionsergebnissen der einzelnen Konstrukte, wurde aber nicht in Zell-Zell-Verbindungen detektiert.

Das Konstrukt 'Ps SH3.2-C', das dem Ponsin-Bereich entsprach, der im Hefe-Doppel-Hybrid-Screen als Paxillin-Bindungspartner identifiziert wurde, unterschied sich in der subzellulären Lokalisation stark von den bisher untersuchten Konstrukten: Es wies keine Stressfaser-Lokalisation auf und war stattdessen prominent in den Fokalkontakten detektierbar. Weiterhin lokalisierte es in Zell-Zell-Verbindungen (Abb. 3.16 Reihen 1–2). Bei den auffälligen punktförmigen Aggregaten wurde zunächst vermutet, dass diese vesikuläre Strukturen anfärbten, sie wiesen jedoch keine Kolo-kalisation mit Vesikelmarkern auf (z. B. Clathrin, Daten nicht gezeigt). Da statt dieser Strukturen in neonatalen Rattenkardiomyozyten große Protein-Aggregate beobachtet wurden (vgl. Abb. 3.19), ist davon auszugehen, dass es sich um unspezifische Aggregate handelt, die aus einer Überexpression resultieren. Das Konstrukt

‘Ps SH3.2-C ΔEx31’ zeigte prinzipiell ähnliches Verhalten wie ‘Ps SH3.2-C’, die Lokalisation in den Fokalkontakten war jedoch schwächer ausgeprägt.

Aus diesen Befunden kann geschlussfolgert werden, dass erst die Kombination verschiedener Domänen im Carboxyterminus des Ponsins, d. h. der zweiten und dritten SH3-Domäne und der Insertion, die Rekrutierung des Proteins zu den Fokalkontakten bewirkt. Dabei scheint der kurze Abschnitt, der von Exon 31 kodiert wird, nicht notwendig zu sein.

Tabelle 3.2: Transfektion carboxyterminaler Ponsin-Konstrukte in PtK2-Zellen. Zusammengefasst sind die subzellulären Lokalisationen der transfizierten GFP-Fusionsproteine. ++ starkes Signal in allen Zellen, + in allen Zellen beobachtet, (+) schwaches Signal bzw. nur gelegentlich beobachtet, - nicht beobachtet. Eine schematische Darstellung der Konstrukte befindet sich im Anhang (Abb. B.1). Die Konstrukte ‘Ps SH3.2-C’ und ‘Ps SH3.2-C ΔEx31’ unterscheiden sich in ihren subzellulären Signalen deutlich von den anderen Konstrukten, die aus weniger Modulen bestehen.

<b>Konstrukt</b>	<b>Fokal- kontakte</b>	<b>Stress- fasern</b>	<b>Zell-Zell- Verbindungen</b>	<b>Kern</b>	<b>diffus-zyto- plasmatisch</b>	<b>punktförmige Aggregate</b>
P <sub>s</sub> SH3.2-C	++	-	+	-	-	+
P <sub>s</sub> SH3.2-C ΔEx31	+	-	+	-	-	+
P <sub>s</sub> SH3.2-C ΔEx30,31	(+)	+	-	+	-	-
P <sub>s</sub> Ex30,31	(+)	(+)	-	+	+	-
P <sub>s</sub> SH3.1	(+)	+	-	-	-	-
P <sub>s</sub> SH3.2	(+)	+	-	-	-	-
P <sub>s</sub> SH3.3	(+)	+	+	+	-	-



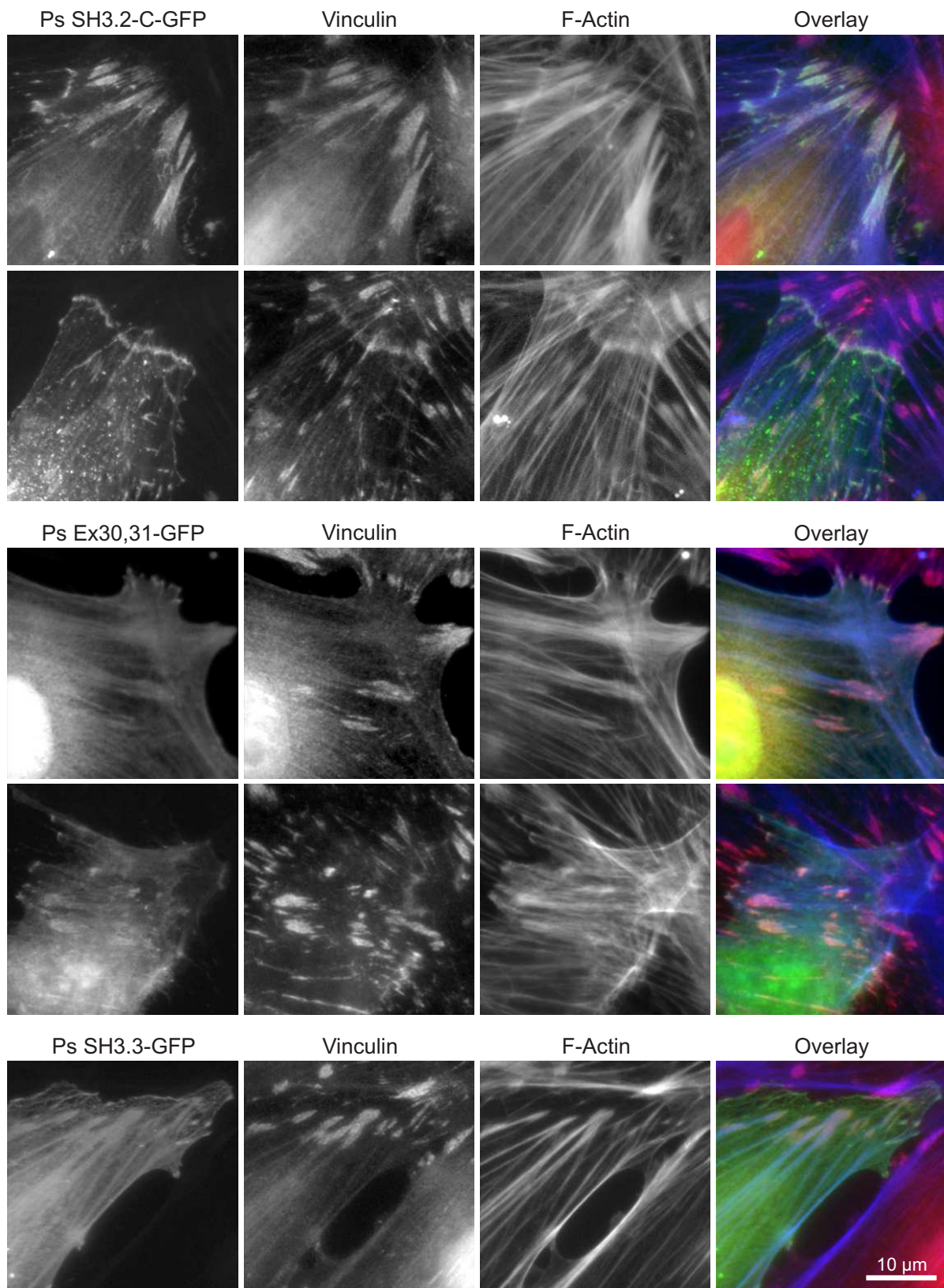


Abbildung 3.16: Transfektion carboxyterminaler Ponsin-Konstrukte als GFP-Fusionsproteine in PtK2-Zellen. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Färbungen fixierter Zellen, die 'Ps SH3.2-C' (Reihen 1–2), 'Ps Ex30,31' (Reihen 3–4) bzw. 'Ps SH3.3' (Reihe 5) exprimierten (Spalte 1). Die Gegenfärbung mit Vinculin visualisiert Fokalkontakte und Zell-Zell-Verbindungen (Spalte 2). F-Actin wurde mit CPITC-Phalloidin angefärbt (Spalte 3). Spalte 4 - Drei-Kanal-Bild (GFP grün, Vinculin rot, F-Actin blau). Die Kernfärbung im Vinculin-Kanal ist eine unspezifische Reaktion des Sekundäntikörpers.

**Längere amino- und carboxyterminale Konstrukte sowie vollständiges Ponsin** Strukturell lässt sich das Ponsin-Molekül in zwei Abschnitte teilen: Der aminoternale Teil (Exone 1–25) enthält eine Region, die Homologie zum Peptidhormon Sorbin aufweist. Diese Sorbin-Homologie-Region (SoHo) soll durch Interaktion mit dem Protein Flotillin in der Lage sein, Ponsin zu *lipid rafts* zu rekrutieren (Kimura *et al.*, 2001). Weitere Domänen oder andere Struktureinheiten lassen sich für den aminoternalen Teil aus der Primärsequenz nicht vorhersagen. Der carboxyterminale Teil des Ponsins (Exone 26–34) kodiert für drei SH3-Domänen, zwischen die im Skelettmuskel eine Insertion eingefügt ist (vgl. Abb. 3.8).

Die Transfektion längerer Konstrukte sollte Aufschluss darüber geben, welche Abschnitte für die Lokalisation des Proteins verantwortlich sind und welche Effekte die Überexpression der Abschnitte auf die transfizierten Zellen hat. Diese Untersuchungen wurden in Nichtmuskelzellen (PtK2) durchgeführt, die kein endogenes Ponsin enthielten und – im Gegensatz zu den meisten Muskelzellsystemen – leicht transfizierbar waren. PtK2-Zellen erwiesen sich als besonders geeignet für diese Fragestellung, da diese Zellen wenig motil sind und somit über ausgeprägte Stressfaser- und Fokalkontaktstrukturen verfügen.

Die Ergebnisse der Transfektionsstudien sind in Tab. 3.3 zusammengefasst. Ausgewählte Konstrukte sind in Abb. 3.17 dargestellt, für eine schematische Darstellung der Konstrukte sei auf den Anhang verwiesen (Abb. B.1).

Alle Konstrukte, die die drei SH3-Domänen enthielten, zeigten eine deutliche Lokalisation in den Fokalkontakten (Abb. 3.17 Reihen 2–4). Ein Konstrukt, das den vollständigen aminoternalen Abschnitt, nicht aber die SH3-Domänen enthielt ('Ps N-Ex25'), wurde nicht zu den Fokalkontakten rekrutiert. Stattdessen zeigte es nukleäre und Stressfaser-Lokalisation (Abb. 3.17 Reihe 5).

Sowohl das Konstrukt 'Ps SH3.1-C  $\Delta$ Ex30,31', das lediglich aus den drei SH3-Domänen bestand, als auch ein analoges Konstrukt mit der Skelettmuskel-spezifischen Insertion ('Ps SH3.1-C') zeigten prominente Fokalkontakt-Lokalisationen (Abb. 3.17 Reihe 4). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Zusammenspiel der SH3-Domänen für die Lokalisation von Ponsin in Zell-Matrix-Kontakten verantwortlich ist, die Skelettmuskel-spezifische Insertion ist hierfür nicht erforderlich. Interessanter Weise zeigte das Konstrukt ohne die Insertion eine deutlichere Lokalisation in Zell-Zell-Verbindungen.

Das vollständige Ponsin-Protein ‘Ps FL’ wurde in transfizierten Zellen ebenfalls in den Fokalkontakten detektiert (Abb. 3.17 Reihen 2–3). Mit zunehmender Expressionsstärke dieses GFP-Fusionsproteines unterschieden sich die Zellen erheblich von den nicht-transfizierten Nachbarzellen: Auffällig war eine veränderte Morphologie der Fokalkontakte, diese waren z. T. vergrößert bzw. unregelmäßig geformt und nicht wie üblich in der Peripherie der Zellen anzutreffen. Bei noch stärkerer Überexpression des Proteins wurden Actin-assoziierte Zytoskelett-Strukturen, insbesondere die Stressfasern und Fokalkontakte, zerstört. Als Folge wurden Ponsin und andere Proteine der Fokalkontakte (z. B. Paxillin und Vinculin) in unregelmäßigen Strukturen („Aggregaten“) detektiert (Abb. 3.17 Reihen 2–3).

Ähnliche Beobachtungen wurden mit Konstrukten gemacht, die die Sorbin-Homologie-Region, die drei SH3-Domänen und die Skelettmuskel-spezifische Insertion enthielten. Da das Konstrukt ‘Ps Ex16-C’ nur mit geringer Effizienz transfizierbar war, wurde ein analoges Konstrukt ‘Ps Ex16-C ΔEx20,21’ ohne die alternativ gespleißten Exone 20 und 21 verwendet. Dieses zeigte ebenfalls – je nach Grad der Überexpression – Fokalkontakt-Lokalisation und die Tendenz, die Integrität der Stressfasern zu beeinflussen. Im Gegensatz zu ‘Ps FL’ wurde dieses Konstrukt gelegentlich auch in Zell-Zell-Verbindungen nachgewiesen. Die Eigenschaft, Aggregate zu bilden, schien mit der Anwesenheit der Skelettmuskel-spezifischen Insertion (Exone 30 und 31) zu korrelieren.

Tabelle 3.3: Transfektion amino- und carboxyterminaler Konstrukte sowie vollständigen Ponsins in PtK2-Zellen. Zusammengefasst sind die subzellulären Lokalisationen der transfizierten GFP-Fusionsproteine. ++ starkes Signal in allen Zellen, + in (fast) allen Zellen beobachtet, (+) schwaches Signal bzw. nur gelegentlich beobachtet, - nicht beobachtet. Ein schematische Darstellung der Konstrukte befindet sich im Anhang (Abb. B.1). (\*) - Effekt abhängig vom Expressionslevel, (\*\*) - nur wenige Zellen analysierbar (geringe Transfektionseffizienz).

Konstrukt	Fokal-kontakte	Stress-fasern	Zell-Zell-Verbindungen	Kern	Aggregate (*)	Effekt auf Actin-Zytoskelett (*)
Ps FL	++	-	-	-	+	++
Ps N-Ex25	-	(+)	-	+	-	-
Ps Ex16-C (**)	++	-	-	-	-	++
Ps Ex16-C ΔEx20,21	++	-	(+)	-	+	++
Ps SH3.1-C	++	-	(+)	-	(+)	-
Ps SH3.1-C ΔEx30,31	++	-	+	(+)	-	-

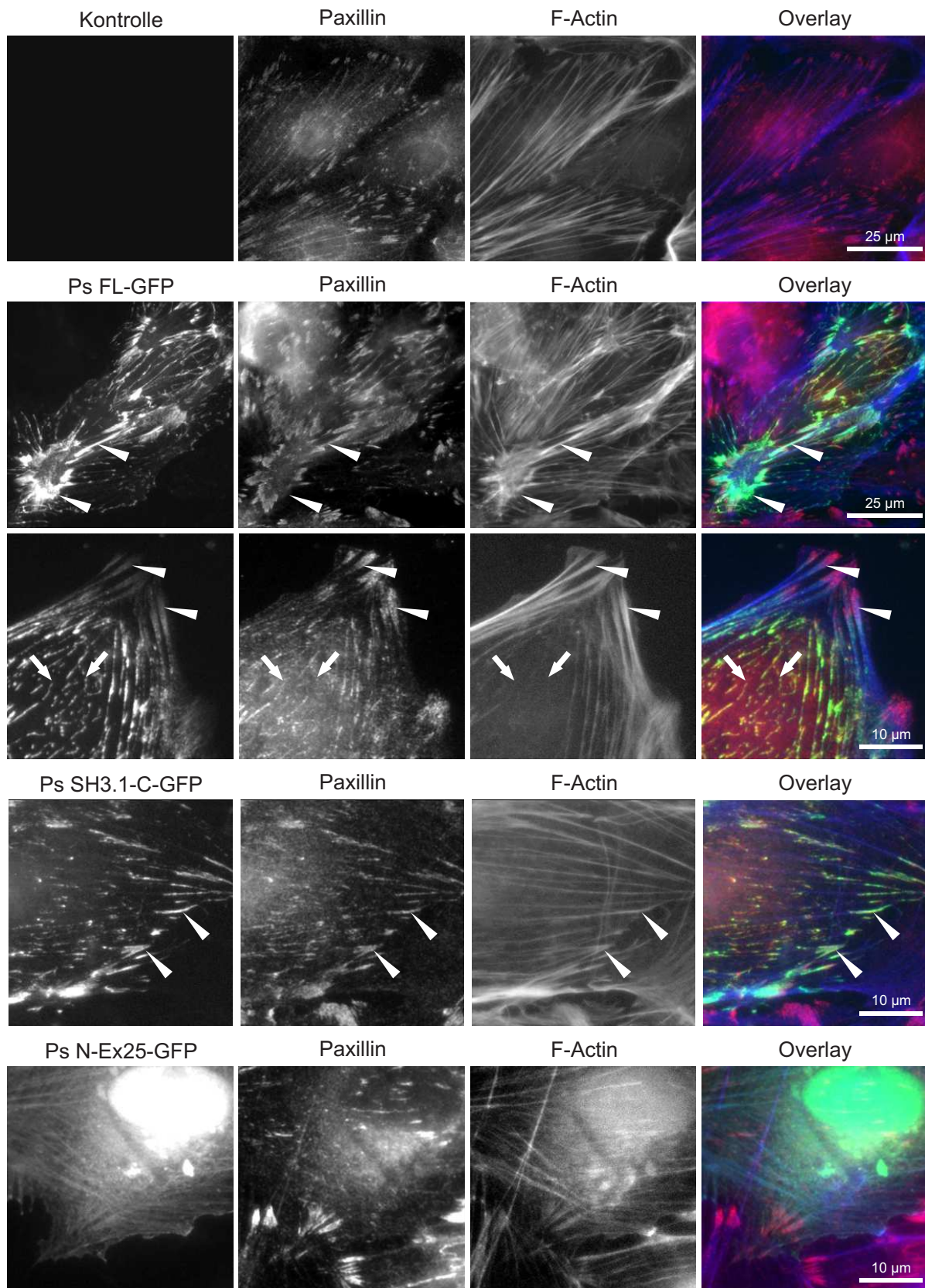


Abbildung 3.17: Transfektion amino- und carboxyterminaler Konstrukte sowie des vollständigen Ponsins in PtK2-Zellen; Erläuterungen auf S. 75.

Abbildung 3.17 (Seite 74):

Transfektion amino- und carboxyterminaler Konstrukte sowie des vollständigen Ponsins in PtK2-Zellen. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Färbungen fixierter Zellen, die 'Ps FL' (Reihen 2–3), 'Ps SH3.1-C' (Reihe 4) bzw. 'Ps N-Ex25' (Reihe 5) als GFP-Fusionsprotein exprimierten (Spalte 1). Die Gegenfärbung mit Paxillin (Spalte 2) visualisiert Fokalkontakte (Pfeilspitzen). F-Actin wurde mit CPITC-Phalloidin angefärbt (Spalte 3). Spalte 4 - Drei-Kanal-Bild (GFP grün, Paxillin rot, F-Actin blau). Die Region, die durch Überexpression des Ponsin-Konstruktes eine anormale Actin-Zytoskelett-Morphologie aufweist, ist durch Pfeile gekennzeichnet. Man beachte, dass im Falle von 'Ps FL' eine Zelle mit hoher Expressionsstärke (Reihe 2) sowie eine Zelle mit geringer Expressionsstärke (Reihe 3) ausgewählt wurden. Zum Vergleich sind gleichartig gefärbte, untransfizierte Zellen abgebildet (Reihe 1).

---

### 3.2.5.2 Transfektionsstudien in Muskelzellen

Nachdem Transfektionsstudien in Nichtmuskelzellen gezeigt hatten, dass die drei SH3-Domänen zusammen für die Lokalisation des Proteins in Zell-Matrix-Kontakten ausreichend sind und die Überexpression von Ponsin die Morphologie Actin-assoziiierter Zytoskelett-Strukturen verändert, wurde das Verhalten transfizierter Ponsin-Proteine in zwei verschiedenen Muskelzell-Systemen untersucht.

**Transfektion von Ponsin in C2C12-Myotuben** Proliferierende C2C12-Zellen wurden mit Ponsin-Konstrukten als GFP-Fusionsproteine transfiziert und anschließend bis zu 4 Tage *in vitro* differenziert. Nach Induktion des myogenen Programmes fusionierten diese Zellen. Die mehrkernigen Myotuben begannen, sarkomere Proteine zu exprimieren und in Prämyofibrillen einzubauen, die später zu quergestreiften Myofibrillen reiften. Da die rekombinanten Proteine unter Kontrolle eines trunkierten Myomesin-Promotors standen, wurden auch sie erst nach Beginn der Differenzierung exprimiert.

In C2C12-Zellen wurde eine partielle Kolokalisation des rekombinanten Ponsins ('Ps FL') mit Prämyofibrillen beobachtet (Abb. 3.18, Reihe 1), während reife Myofibrillen keine Assoziation mit Ponsin zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Gegenfärbung mit Vinculin und Paxillin belegte, dass die Überexpression von Ponsin auch in diesem Zelltyp einen Einfluss auf die Morphologie der Zell-Matrix-Kontakte ausübte. Beide Proteine kolokalisierten in transfizierten Zellen mit

Ponsin in elongierten, PLAS-artigen Zell-Matrix-Kontakten, die in dieser Ausprägung nicht in untransfizierten Zellen detektiert wurden (Abb. 3.18, Vergleich der Reihen 2 und 3).

Wie bereits in PtK2-Zellen beobachtet, zeigten Transfektionen der Konstrukte 'Ps Ex16-C' und 'Ps Ex16-C  $\Delta$ Ex20,21' ähnliche Resultate wie 'Ps FL' (Daten nicht gezeigt). Die Transfektionen kürzerer, carboxyterminaler Konstrukte waren weniger aussagekräftig, da nur eine sehr geringe Anzahl differenzierter Zellen detektiert werden konnte, die gleichzeitig GFP-Fusionsproteine exprimierten.

**Transfektion von Ponsin-Konstrukten in Kardiomyozyten** Neonatale Rattenkardiomyozyten stellen ein transfizierbares *in vitro* Modellsystem für Herzmuskelzellen dar (Lange *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu C2C12-Zellen erfolgt die Transfektion der rekombinanten Proteine in differenzierte Zellen mit ausgeprägten sarkomeren Strukturen. Die Präparation der Zellen aus neonatalen Rattenherzen, ihre Kultur und transiente Transfektionen der beschriebenen Ponsin-GFP-Fusionsproteine wurden von E. Ehler durchgeführt.

In diesem Zelltyp zeigten vollständiges Ponsin ('Ps FL'), zwei aminoterminal trunkierte Konstrukte 'Ps Ex16-C' und 'Ps Ex16-C  $\Delta$ Ex20,21' sowie das Konstrukt 'Ps SH3.1-C', das die drei SH3-Domänen sowie die Skelettmuskel-spezifische Insertion enthielt, ein einheitliches Bild: Alle Konstrukte wurden in den Fokalkontakten detektiert (Abb.3.19), in denen die GFP-Fusionsproteine mit Vinculin und Paxillin kolokalisierten. Weiterhin gab es auch Hinweise auf eine costamerische Lokalisation, und einige transfizierte Zellen zeigten eine Lokalisation des rekombinanten Proteins in Zell-Zell-Verbindungen. Alle Konstrukte hatten die Tendenz, unspezifische Aggregate zu bilden.

Die Tatsache, dass in diesem Zellsystem kein (negativer) Effekt der Konstrukte auf die Morphologie des Actin-Zytoskeletts beobachtet wurde, könnte darin begründet sein, dass diese Zellen einen sehr geringen *turn over* der sarkomeren Proteine aufweisen (E. Ehler, persönliche Mitteilung).

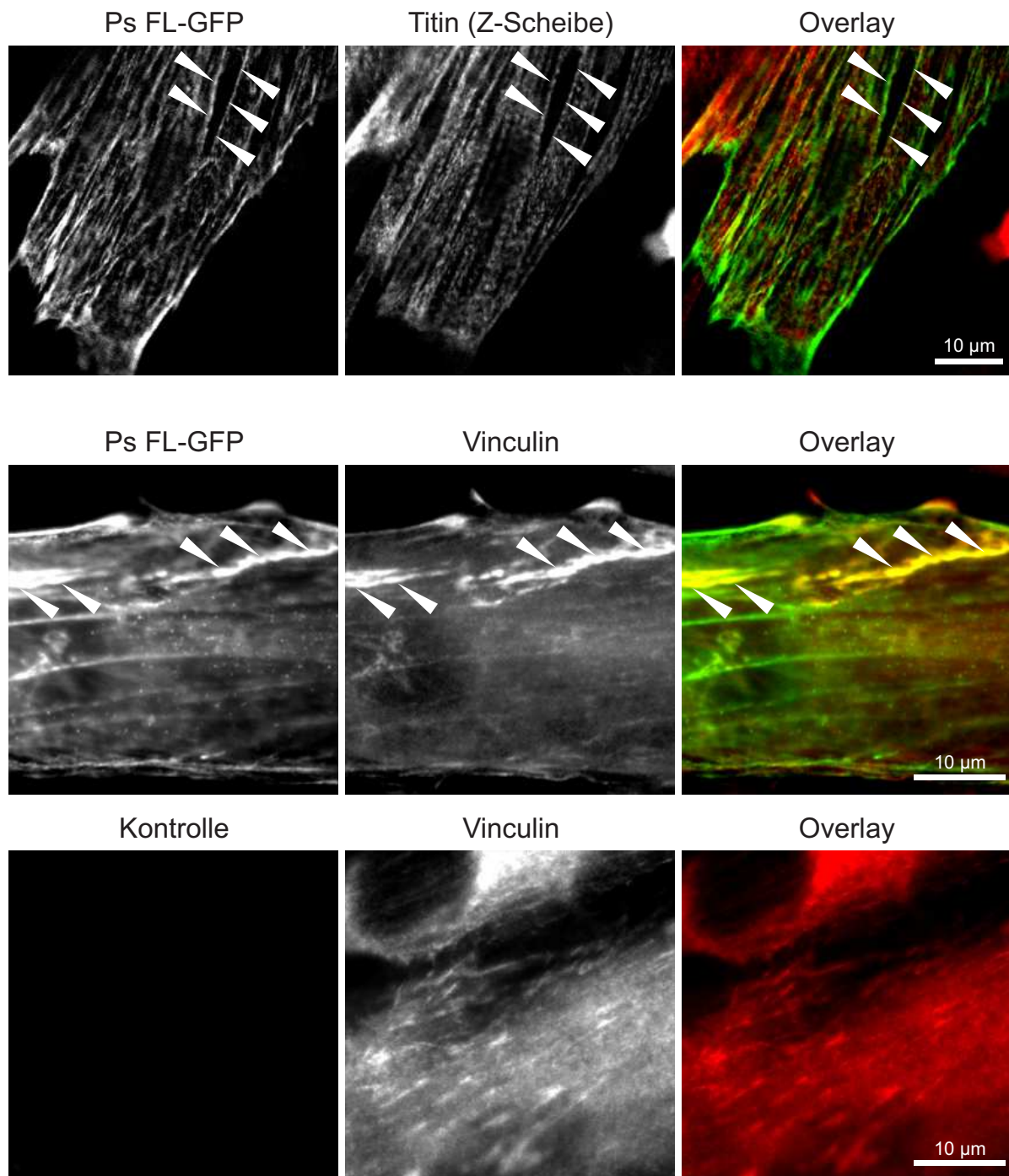


Abbildung 3.18: Überexpression des vollständigen Ponsins in C2C12-Myotuben. Dargestellt sind Zellen, die 4 Tage *in vitro* differenziert wurden und 'Ps FL' als GFP-Fusionsprotein überexprimierten (Reihen 1–2, Spalte 1). Erste Reihe: Das Ponsin-Konstrukt zeigte partielle Kollokalisierung mit Prämyofibrillen (angefärbt mit Titin mAB T12 (Spalte 2), Pfeilspitzen). Spalte 3 - Zwei-Kanal-Bild (GFP grün, Titin rot). Reihe 2: In transfizierten Zellen rekrutierte rekombinantes Ponsin Vinculin (Spalte 2) in morphologisch veränderte Zell-Matrix-Kontakte (Pfeilspitzen). Spalte 3 - Zwei-Kanal-Bild (GFP grün, Vinculin rot). Zum Vergleich wurde eine Vinculin-gefärbte, untransfizierte Zelle abgebildet (Reihe 3).

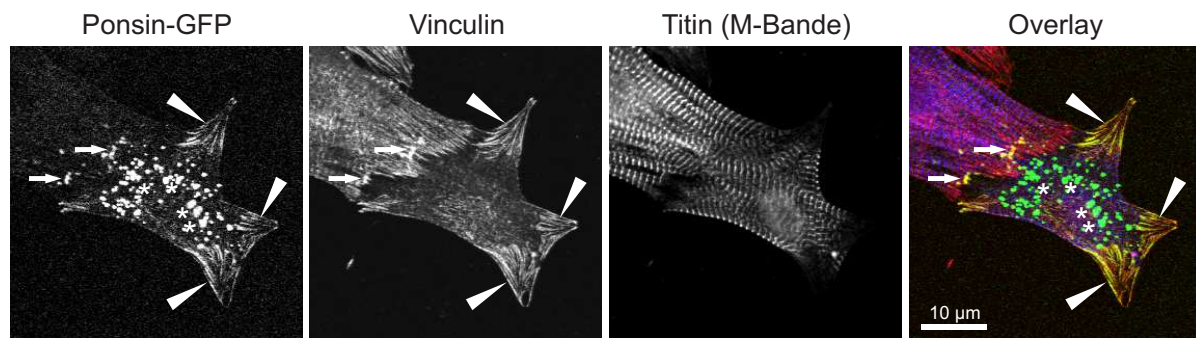


Abbildung 3.19: Expression von Ponsin-GFP-Fusionsprotein in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Es ist eine Zelle dargestellt, die das Konstrukt 'Ps Ex16-C  $\Delta$ Ex20,21' exprimierte (Spalte 1). Zum Vergleich wurden Vinculin (Spalte 2) und Titin (M-Banden-Epitop, angefärbt mit m8, Spalte 3) ebenfalls angefärbt. Spalte 4 - Drei-Kanal-Bild (GFP grün, Vinculin rot, Titin blau). Das Ponsin-Konstrukt zeigte Lokalisation in den Fokalkontakten (Pfeilspitzen) sowie Zell-Zell-Verbindungen (Pfeile) und bildete unspezifische Aggregate (\*). Durchgeführt von E. Ehler.

### 3.2.6 Funktionen der Skelettmuskel-spezifischen Insertion

Nachdem die Transfektionsstudien ergeben hatten, dass die Skelettmuskel-spezifische Insertion im Carboxyterminus für die subzelluläre Lokalisation des Ponsins nicht notwendig ist, lag die Vermutung nahe, dass dieser Bereich regulatorische Funktionen haben könnte.

#### 3.2.6.1 Vermutete Funktionen aufgrund der Aminosäuresequenz

Die Skelettmuskel-spezifische Insertion im Carboxyterminus des Ponsins ist 278 Aminosäuren lang und wird zum größten Teil vom alternativ gespleißten Exon 30 (258 Aminosäuren) sowie von einem weiteren alternativ gespleißten Exon, Exon 31 (20 Aminosäuren), kodiert (Abb. 3.20).

Eine Analyse der Sequenz mit bioinformatischen Programmen ergab, dass die Insertion keine Sequenz-Homologie zu bekannten Proteinen oder deren Domänen aufweist. Vorhersagen zur Sekundärstruktur zeigten, dass weder ausgeprägte  $\alpha$ -helikale Bereiche noch  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zu erwarten sind. Die Sequenz verfügt über einen überdurchschnittlich hohen Anteil an Serin und Prolin (17,6 % bzw. 10,8 %). Bei detaillierter Betrachtung stellte sich heraus, dass der aminoternale Bereich eine Prolin-reiche Region enthält (PPLPPLP, Aminosäuren 50–56 der Insertion, Abb. 3.20), die von einem Cluster von SP- und TP-Motiven umgeben ist. Eine solche Prolin-reiche Region ist ein potentieller Ligand für SH3- bzw. WW-Domänen (Kay *et al.*,



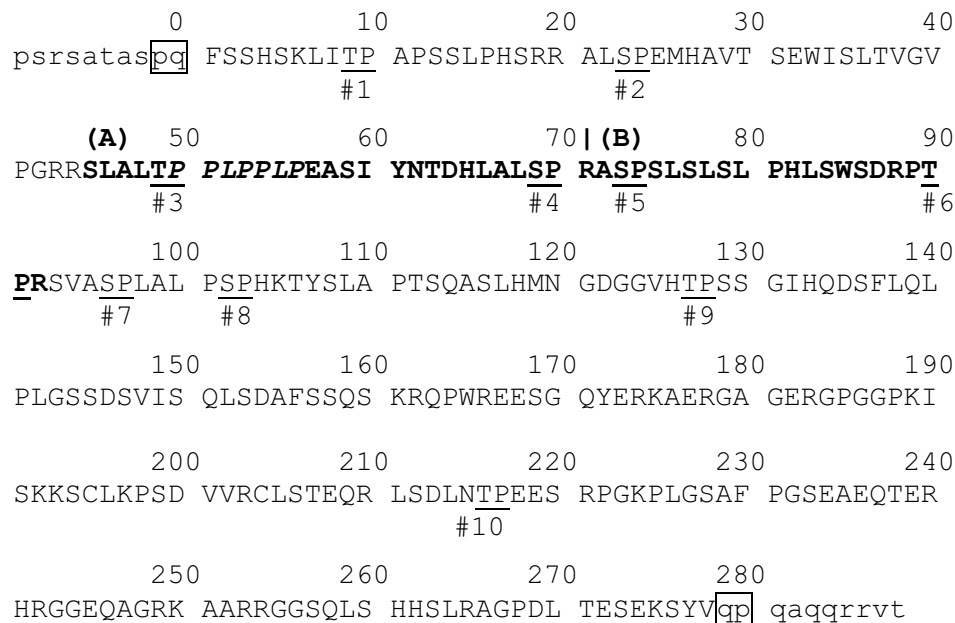


Abbildung 3.20: Aminosäuresequenz der Skelettmuskel-spezifischen Insertion im Carboxyterminus des Ponsin. Die 278 Aminosäuren lange Insertion ist in Großbuchstaben gedruckt, flankierende Bereiche in Kleinbuchstaben. Der Teil der Insertion, der von Exon 31 kodiert wird, ist gestrichelt unterstrichen. Die Prolin-reiche Region (Aminosäuren 50–56) ist kursiv dargestellt, die SP- und TP-Motive sind unterstrichen und durchnummeriert. Das PQQP-Motiv, das von der Insertion unterbrochen wird, ist durch Boxen markiert. In den fett gedruckten Peptiden (A: Aminosäuren 45–71; B: Aminosäuren 72–92) wurden durch Massenspektrometrie Phosphorylierungen nach Inkubation mit p42-MAPK nachgewiesen.

2000; Macias *et al.*, 2002). Dieser Sequenzabschnitt enthält zwei PXXP-Konsensus-Motive und könnte sowohl intramolekulare Bindungen zu einer der SH3-Domänen des Ponsins als auch zu SH3-Domänen anderer Proteine vermitteln.

Die SP- und TP-Motive stellen potentielle Konsensus-Motive für die Phosphorylierung durch MAPK dar (Davis, 1993), welche zur Familie der Serin- und Threonin-Kinasen gehören. Eine genauere Analyse der zehn SP- und TP-Motive und der sie umgebenden Sequenzbereiche ergab, dass sechs dieser Motive Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz aufweisen und sich mehr oder weniger gut dem Konsensus-Motiv 'R/L A L S/T P' zuordnen lassen (Abb. 3.21, Motive #2, #3, #4, #5, #7 und #8). Drei dieser Motive sind evolutionär innerhalb der Säugetiere konserviert.

Interessant ist weiterhin die Tatsache, dass die Insertion ein PXXP-Motiv unterbricht (PQQP, Abb. 3.20). Es wurde berichtet, dass dieses Motiv eine kritische Rolle bei der Bindung von Ponsin an das Adapterprotein Nck2 spielen soll (Cowan und Henkemeyer, 2001).

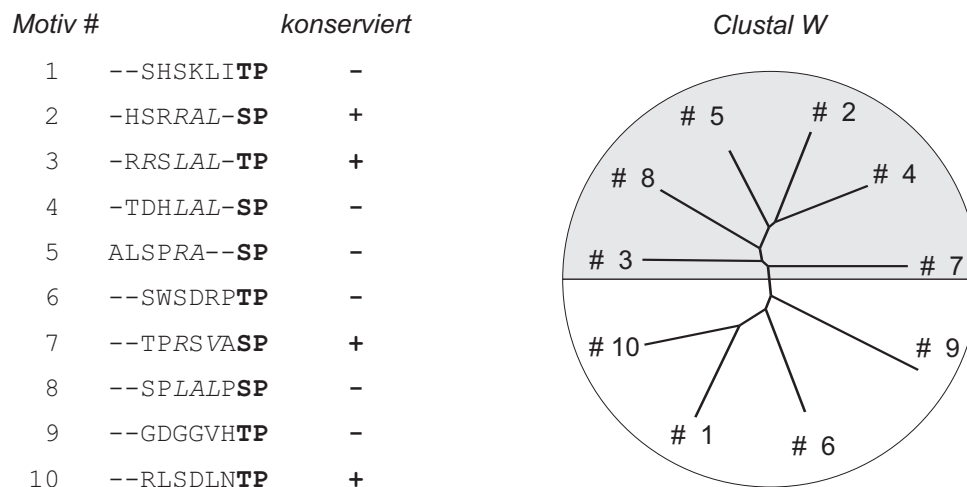


Abbildung 3.21: SP- und TP-Motive in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion des Ponsins. *Links*: Sequenzalignment der SP- und TP-Motive mit ihren umgebenden Sequenzen. Kursiv gedruckte Aminosäuren lassen sich dem Konsensus-Motiv 'R/L A L S/T P' zuordnen, + gibt an, dass dieses SP-/TP-Motiv in Mensch, Maus, Ratte und Hund gefunden wurde. *Rechts*: Ergebnis einer 'Clustal W'-Analyse dieser Sequenzen, dargestellt mit 'Treeview'. Die Motive, die sich dem Konsensus-Motiv zuordnen lassen, fallen in einen Cluster (grau hinterlegt).

### 3.2.6.2 Phosphorylierung der Insertion

***In vitro* Phosphorylierungsexperimente** Durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente wurde überprüft, ob die SP-/TP-Motive in der Insertion tatsächlich Substrate für MAPK darstellen können. Dazu wurden gereinigte, rekombinante Proteinfragmente mit p42-MAPK in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE konnte durch Autoradiographie der Einbau radioaktiv markierter Phosphatgruppen nachgewiesen werden. Alle Konstrukte, die die Skelettmuskel-spezifische Insertion enthielten, wurden in diesen Versuchen durch p42-MAPK phosphoryliert (Abb. 3.22 'Ps Ex30,31' und 'Ps SH3.2-C'; schematische Darstellung der Konstrukte Abb. B.1), hingegen war für keine der SH3-Domänen ein Einbau von Radioaktivität zu beobachten. Da auch ein Konstrukt, das Exon 31 nicht enthält ('Ps SH3.2-C ΔEx31'), phosphoryliert wurde, grenzt sich der phosphorylierte Bereich auf den Teil der Insertion ein, der von Exon 30 kodiert wird und die SP-/TP-Motive enthält. Das Konstrukt 'Ps PRR', das die Prolin-reiche Region der Insertion enthält (Aminosäuren 1–66 der Insertion), wurde ebenfalls phosphoryliert. Damit wurde gezeigt, dass eines oder mehrere der beschriebenen SP-/TP-Motive in der Umgebung der Prolin-reichen Region prinzipiell von MAPK *in vitro* phosphoryliert werden können.

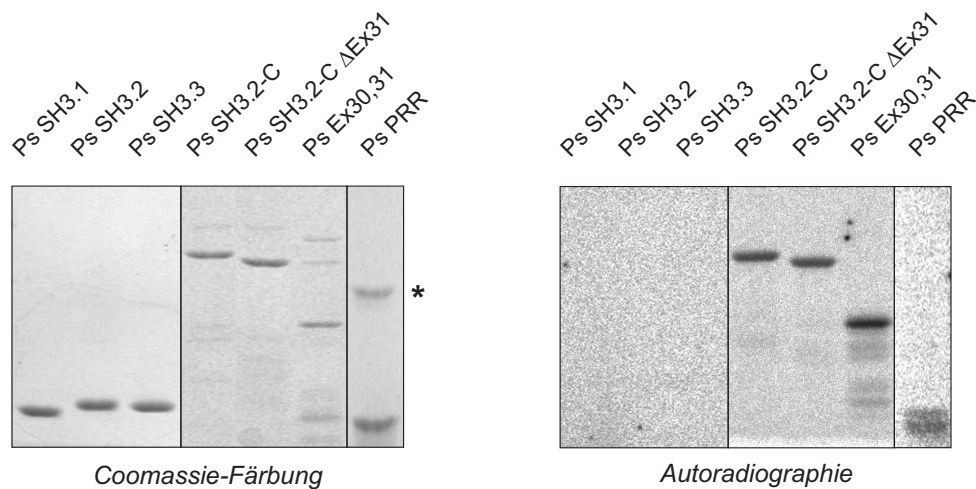


Abbildung 3.22: *In vitro* Phosphorylierung rekombinanter Ponsin-Fragmente. *Links*: Coomassie-Färbung gereinigter, rekombinanter Ponsin-Konstrukte nach Auftrennung durch SDS-PAGE; \* - Verunreinigung durch bakterielles Protein in der Präparation von 'Ps PRR'. Eine schematische Darstellung aller Konstrukte befindet sich im Anhang (Abb. B.1). *Rechts*: Autoradiographie. Die Ponsin-Proteine wurden vor Auftrennung per SDS-PAGE mit aktivierter, rekombinanter p42-MAPK in Gegenwart von  $\gamma$ -[<sup>33</sup>P]-ATP inkubiert (1  $\mu$ Ci). Alle Konstrukte, die den Teil der Insertion enthalten, der von Exon 30 kodiert wird, sowie das Konstrukt 'Ps PRR' zeigten einen Einbau von Radioaktivität.

Um zu überprüfen, ob in Skelettmuskelzellen Kinasen aktiv sind, die die Insertion des Ponsins phosphorylieren können, wurden *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit Zellextrakten durchgeführt. Rekombinantes, T7-markiertes Ponsin-Fragment ('Ps Ex30,31') wurde mit verschiedenen Zellextrakten in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP inkubiert, anschließend mit Hilfe eines Tag-Antikörpers präzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert. Die Abtrennung des rekombinanten Proteins war notwendig, da die Proteine der Zellextrakte einen starken Hintergrund in der Autoradiographie verursachten.

Im Zellextrakt von proliferierenden, *in vitro* kultivierten HSkM-Zellen war eine geringe Menge an Proteinkinaseaktivität nachweisbar, die in der Lage war, die Insertion im Ponsin zu phosphorylieren (Abb. 3.23, HSkM 0 d). Nach Beginn der Differenzierung nahm diese Kinaseaktivität zu (Abb. 3.23, HSkM 2 d). Mit Fortschreiten der Differenzierung erhöhte sich diese Kinaseaktivität noch leicht (Abb. 3.23, HSkM 4 d) und entsprach ca. 50 % der eingesetzten Aktivität der rekombinanten p42-MAPK. Analoge *in vitro* Phosphorylierungsversuche mit dem Konstrukt 'Ps PRR' und Zellextrakten konnten diese Ergebnisse bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Daraus kann geschlossen werden, dass in differenzierenden Skelettmuskelzellen Proteinkinase(n) aktiv sind, die SP-/TP-Motive in der Insertion des Ponsins phosphorylieren können.

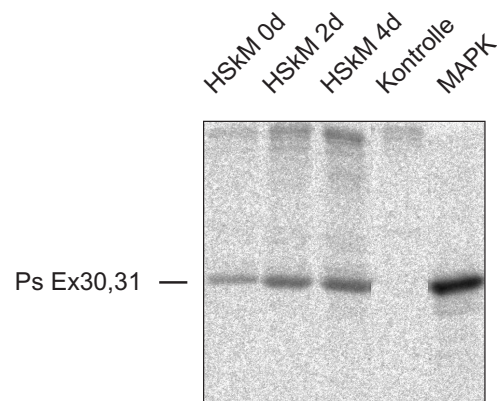


Abbildung 3.23: *In vitro* Phosphorylierung der Insertion durch HSkM-Zellextrakte. Rekombinantes, T7-markiertes Fragment 'Ps Ex30,31' wurde mit gleichen Proteinmengen von Triton-Zellextrakten in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ -ATP inkubiert ( $5 \mu\text{Ci}$ ), mit Hilfe eines T7-Antikörpers präzipitiert, und nach Auftrennung durch SDS-PAGE autoradiographiert. Als Kontrolle für die Spezifität des Signales diente ein Ansatz ohne rekombinantes Protein. Auftragung von links: Inkubation mit Zellextrakt proliferierender HSkM-Zellen (HSkM 0 d), Inkubation mit Zellextrakt von HSkM-Zellen, die 2 bzw. 4 Tage *in vitro* differenziert wurden (HSkM 2 d, HSkM 4 d), Kontrollansatz ohne rekombinantes Protein (Kontrolle), Vergleichsprobe, die statt mit Zellextrakt mit aktivierter, rekombinanter p42-MAPK inkubiert wurde (MAPK).

Die verantwortlichen Proteinkinase(n) scheinen außerdem einer differenzierungsabhängigen Regulation zu unterliegen.

Um die Zahl der Phosphorylierungsereignisse und den Phosphorylierungsgrad quantitativ abschätzen zu können, wurde Proben von *in vitro* phosphorylierten rekombinanten Ponsin-Fragmenten durch zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert. Nach Phosphorylierung der rekombinanten Ponsin-Konstrukte mit p42-MAPK bzw. mit Zellextrakten erfolgte die Auftrennung der Proben nach ihren Ladungseigenschaften durch NEPHGE (erste Dimension). In der zweiten Dimension wurden die Proteine durch SDS-PAGE entsprechend ihres Molekulargewichts separiert. Anschließend wurden die T7-markierten Ponsin-Konstrukte durch Immundetektion im Westernblot nachgewiesen. Im Vergleich zum unbehandelten Protein zeigte mit p42-MAPK inkubiertes 'Ps Ex30,31' vier Spots (Abb. 3.24, P1–P4), die äquidistant in den sauren pH-Bereich verschoben waren, während der Spot, der dem ursprünglichen, unphosphorylierten Protein entsprach, in dieser Probe kaum noch nachweisbar war (Abb. 3.24, U). Aus diesem Versuch kann geschlussfolgert werden, dass bis zu vier SP-/TP-Motive in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion des Ponsins von rekombinanter p42-MAPK phosphoryliert werden können (Abb. 3.24, P1–P4). Wurde mit Zellextrakt differenzierender HSkM-Zellen an Stelle von p42-MAPK inkubiert, waren einfach und zweifach phosphorylierte Moleküle

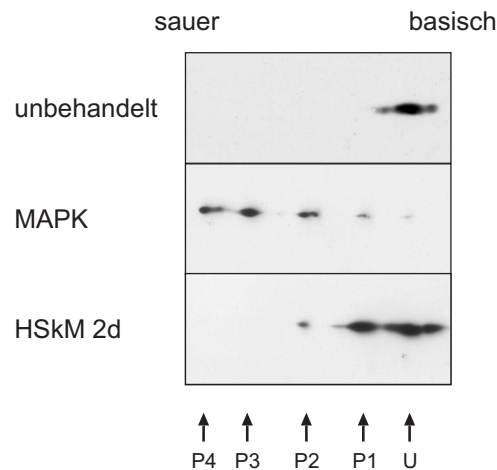


Abbildung 3.24: Zweidimensionale Gelelektrophorese von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Ponsin-Protein. Das rekombinante, T7-markierte Ponsin-Konstrukt 'Ps Ex30,31' wurde ohne (unbehandelt) oder nach Inkubation mit aktivierter, rekombinanter p42-MAPK (MAPK) bzw. mit Triton-Zellextrakt differenzierender HSkM-Zellen (HSkM 2d, d. h. 2 Tage *in vitro* differenziert) durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und über den T7-Immuntag nachgewiesen. Die Pfeile geben die Position des unphosphorylierten Proteins (U) sowie die Positionen von einfach bis vierfach phosphorylierten Molekülen (P1–P4) an.

neben unphosphoryliertem Protein erkennbar.

Nach Behandlung mit rekombinanter p42-MAPK oder Zellextrakt zeigte auch das Konstrukt 'Ps SH3.2-C', das ebenfalls die Skelettmuskel-spezifische Insertion enthält, vier in den sauren pH-Bereich verschobene Spots. Hingegen waren bei einem analogen Konstrukt ohne Insertion ('Ps SH3.2-C  $\Delta$ Ex30,31') keine Unterschiede vor und nach Behandlung mit MAPK zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

### Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche vier SP-/TP-Motive (von den zehn möglichen; vgl. Abb. 3.20) in der Insertion durch MAPK *in vitro* phosphoryliert werden. Dazu wurde ein kombinierter HPLC-Massenspektrometrie-Ansatz verwendet: Phosphorylierte Peptide, die durch tryptischen Verdau der Proben gewonnen werden, können in der HPLC durch ihr verändertes Laufverhalten gegenüber ihren unphosphorylierten Gegenstücken identifiziert werden. Eine Zuordnung dieser Peptide zur Sequenz ist durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie möglich, dabei werden die Peptide anhand ihres Molekulargewichtes identifiziert und Phosphorylierungen durch charakteristische Verschiebungen des Molekulargewichtes (um +80 D pro Phosphorylierungsereignis) erkannt. Um die Phosphorylierungsstelle

in einem Peptid weiter einzugrenzen, können Fragment-Ionen-Analysen in einem Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt werden. Dazu wird ein Peptid im Quadrupol ausgewählt und durch Kollision mit Argon zur Bildung von Fragmenten angeregt, welche in einem weiteren TOF-Massenspektrometer analysiert werden. Im Idealfall kann aus den entstandenen Fragment-Ionen die komplette Sequenz (einschließlich der Phosphorylierungsereignisse) generiert werden. In der Praxis hat sich die Kopplung dieser Technik mit einer Nano-Elektrospray-Ionisierungsquelle bewährt.

Rekombinantes 'Ps Ex30,31' wurde mit p42-MAPK inkubiert, tryptisch verdaut und die entstandenen Peptide durch HPLC aufgetrennt. Im Vergleich zu einer Probe, die nicht mit MAPK behandelt wurde, zeigten sich geringe Abweichungen im Chromatogramm (Abb. 3.25, Pfeile in I). Diese Elutionsfraktionen wurden in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert, um die entsprechenden Peptide zuzuordnen. In zwei Peptiden konnten Phosphorylierungen durch eine charakteristische Verschiebung der monoisotopische Masse (um +80 pro Phosphorylierung) identifiziert werden. Für das Peptid **SLALTPPLPPLPEASIYNTDHLALSPR** (Aminosäuren 45–71 der Insertion, s. Abb. 3.20) wurden sowohl einfach- als auch zweifach-phosphorylierte Peptide nachgewiesen (Abb. 3.25 II + III, Peptid B), so dass davon auszugehen ist, dass beide SP-/TP-Motive *in vitro* phosphoryliert werden. Eine detaillierte Fragment-Ionen-Analyse des einfach-phosphorylierten Peptides B\* ergab, dass präferentiell das SP-Motiv (S69 der Insertion, s. Abb. 3.20) phosphoryliert wird. Im Peptid **ASPSLSLSLPHLSWSDRPTPR** (Aminosäuren 45–71 der Insertion, s. Abb. 3.20) wurde ein weiteres Phosphorylierungsereignis identifiziert (Abb. 3.25 II, Peptid A). Damit wurde die Phosphorylierung des Ponsins am S69 der Insertion durch MAPK direkt nachgewiesen und zwei weitere Phosphorylierungsereignisse auf die unmittelbare Umgebung der Prolin-reichen Region in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion eingegrenzt (Abb. 3.20).

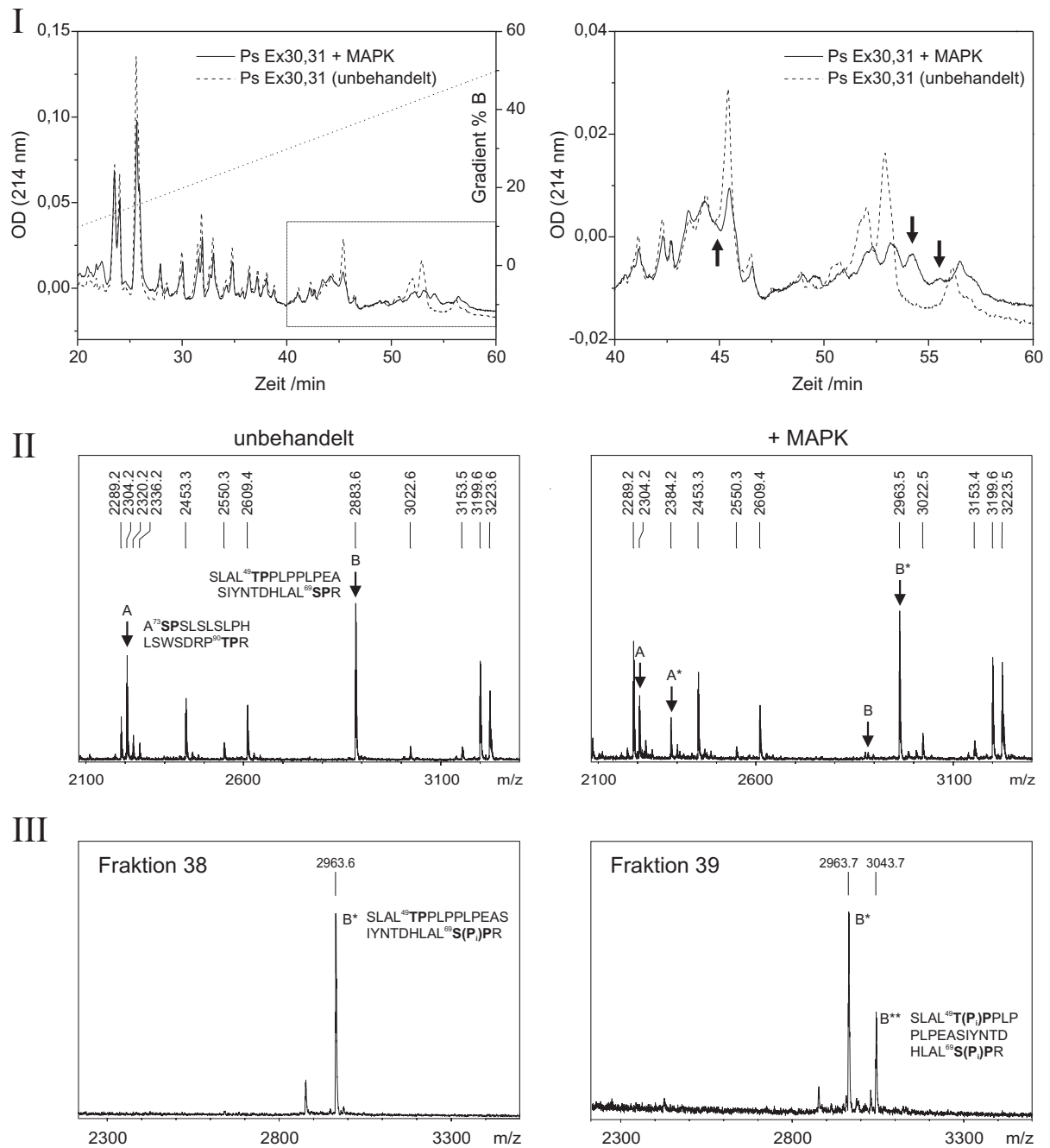


Abbildung 3.25: Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion; Erläuterungen auf S. 86.

Abbildung 3.25 (Seite 85):

Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion.

*I* - Chromatogramm tryptischer Peptide phosphorylierten und unphosphorylierten Ponsin-Fragments: Rekombinantes 'Ps Ex30,31' wurde unbehandelt (gestrichelte Linie) bzw. nach Inkubation mit aktivierter, rekombinanter p42-MAPK (ausgezogene Linie) tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide durch HPLC aufgetrennt (*links*). Der markierte Bereich, in dem sich die Chromatogramme beider Proben unterschieden, ist vergrößert dargestellt (*rechts*). Die phosphorylierte Probe wies veränderte Peak-Intensitäten und zusätzliche Peaks (Pfeile) auf.

*II + III* - Massenspektren phosphorylierter Ponsin-Peptide: *II* - Rekombinantes Ponsin-Fragment 'Ps Ex30,31' wurde unbehandelt (*links*) oder nach Phosphorylierung mit p42-MAPK (*rechts*) tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. In der mit p42-MAPK inkubierten Probe ('+MAPK') waren die phosphorylierten Peptide A\* und B\* (Verschiebung um +80 kD) erkennbar, gleichzeitig war die Intensität der unphosphorylierten Peptide A und B im Vergleich zur unphosphorylierten Probe ('unbehandelt') verringert. *III* - Nach Auftrennung der tryptischen Peptide durch HPLC wurde in der Elutionsfraktion 38 der phosphorylierten Probe einfach phosphoryliertes Peptid B\* nachgewiesen (*links*), in der darauffolgenden Elutionsfraktion 39 einfach phosphoryliertes Peptid B\* und zweifach phosphoryliertes Peptid B\*\* (*rechts*).

---

### 3.2.6.3 Potentielle Interaktionspartner der Insertion

**Überprüfung auf intramolekulare Interaktion** Die Lage der Prolin-reichen Region in der Nähe von drei SH3-Domänen ließ eine autoregulatorische Funktion möglich erscheinen, wie sie bereits für andere Proteine beschrieben wurde. Beispielsweise kann eine Prolin-reiche Region der Src-Kinase als intramolekularer Ligand für ihre SH3-Domäne dienen und so zur Inhibition der Src-Kinaseaktivität beitragen (Erpel *et al.*, 1995).

In Dot blot- und Western blot-Overlay-Experimenten zeigte keine der drei SH3-Domänen des Ponsins Bindung an das Konstrukt 'Ps Ex30,31', das die Prolin-reiche Region enthält (Daten nicht gezeigt). Daher kann eine regulatorische intramolekulare Assoziation der Skelettmuskel-spezifischen Insertion mit den SH3-Domänen ausgeschlossen werden. Die Prolin-reiche Region in der Insertion stellt somit wahrscheinlich ein Modul dar, das die Bindung anderer Proteine an Ponsin vermitteln könnte.

**Interaktion mit Nck2** Cowan und Henkemeyer (2001) haben die Bindung des Adapterproteins Nck2 an Ponsin beschrieben. In ihren Versuchen zeigte Nck2 Bindung an ein 16 Aminosäuren langes Peptid, das der Region des Ponsins entspricht, die von der Skelettmuskel-spezifischen Insertion unterbrochen wird (RSATASPQQPQAQQRR, Aminosäuren 902–909 und 1188–1195 in Abb. C.7, s. auch Abb. 3.20). Aus Mutationsanalysen schlussfolgerten sie,



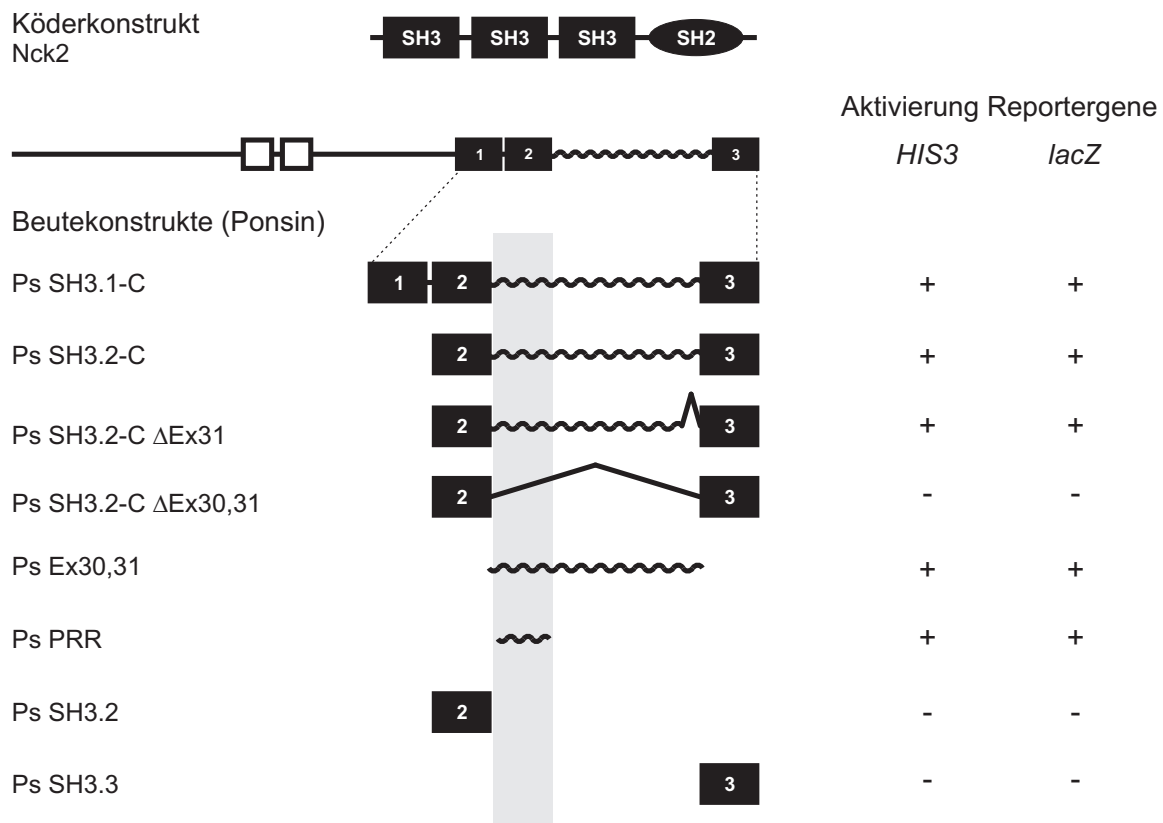


Abbildung 3.26: Gezielte Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente mit Nck2 und Ponsin. Hefezellen, die vollständiges Nck2 als Beutekonstrukt und eines der Ponsin-Köderkonstrukte koexprimierten, wurden auf Aktivierung der Reportergene getestet (+ messbare Aktivierung). Zum Vergleich sind die vollständigen Proteine schematisch dargestellt. Alle Ponsinkonstrukte, die die Prolin-reiche Region in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion enthielten, zeigten eine Bindung an Nck2 (Region grau hervorgehoben).

dass das PQQP-Motiv als Ligand für eine oder mehrere SH3-Domänen des Nck2 fungiert.

Da die Skelettmuskel-spezifische Insertion dieses PQQP-Motiv unterbricht (vgl. Abb. 3.20), sollte mit Hefe-Doppel-Hybrid-Experimenten überprüft werden, ob Ponsin-Konstrukte mit und ohne Skelettmuskel-spezifische Insertion unterschiedliches Bindungsverhalten an Nck2 zeigen. Überraschenderweise war für das Konstrukt 'Ps SH3.2-C ΔEx30,31' keine Bindung gegenüber Nck2 detektierbar, obwohl es das von Cowan und Henkemeyer (2001) beschriebene PQQP-Bindungsmotiv enthielt (Abb. 3.26). Hingegen zeigten alle Konstrukte, die die Prolin-reiche Region der Skelettmuskel-spezifischen Insertion enthielten, eine deutliche Aktivierung beider Reporter-Gene.

Damit wurde eine weitere Nck2-Bindungsstelle in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion identifiziert, die eine höhere Affinität zu Nck2 aufweisen muss, wenn man davon ausgeht, dass die von Cowan und Henkemeyer (2001) beschriebene Bindung so niedrig-affin ist, dass sie

im verwendeten Hefe-Doppel-Hybrid-System nicht nachgewiesen werden konnte. Da die Bindungsregion dieser neuen Nck2-Bindungsstelle auf den Teil der Insertion eingegrenzt wurde, der ein Prolin-reiches Motiv enthält, ist zu vermuten, dass die Bindung durch eine Interaktion des Prolin-reichen Motivs im Ponsin mit einer SH3-Domäne des Nck2 erfolgt.

Um die *in vitro* Bindungsdaten einordnen zu können, sollte mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen untersucht werden, ob und in welchen Stadien Nck2 und Ponsin in Zell-Matrix-Strukturen kolokalisieren. Da keiner der kommerziell verfügbaren Nck-Antikörper für Immunfluoreszenz-Untersuchungen geeignet war, wurde die Lokalisation von vollständigem, rekombinantem Nck2-Protein in PtK2-Zellen untersucht. Der überwiegende Anteil der transfizierten Zellen zeigte eine diffuse Lokalisation von überexprimiertem Nck2 in Zellen, die eine stark veränderte Morphologie aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression des Adapterproteins schien toxisch für die Zellen zu sein. Eine Population von transfizierten Zellen, die nur geringe Expressionslevel aufwiesen, unterschied sich morphologisch nicht von untransfizierten Zellen. In diesem Fall lokalisierte rekombinantes Nck2 in den Fokalkontakten (Abb. 3.27, Reihe 2).

In doppelt-transfizierten PtK2-Zellen, die rekombinantes Nck2 und Ponsin-GFP-Fusionsprotein koexprimierten, zeigten beide Proteine eine partielle Kolokalisation in den Fokalkontakten (Abb. 3.27, Reihe 1). Dies bedeutet, dass die identifizierte Interaktion der beiden Proteine *in vivo* in Zell-Matrix-Strukturen stattfinden kann.

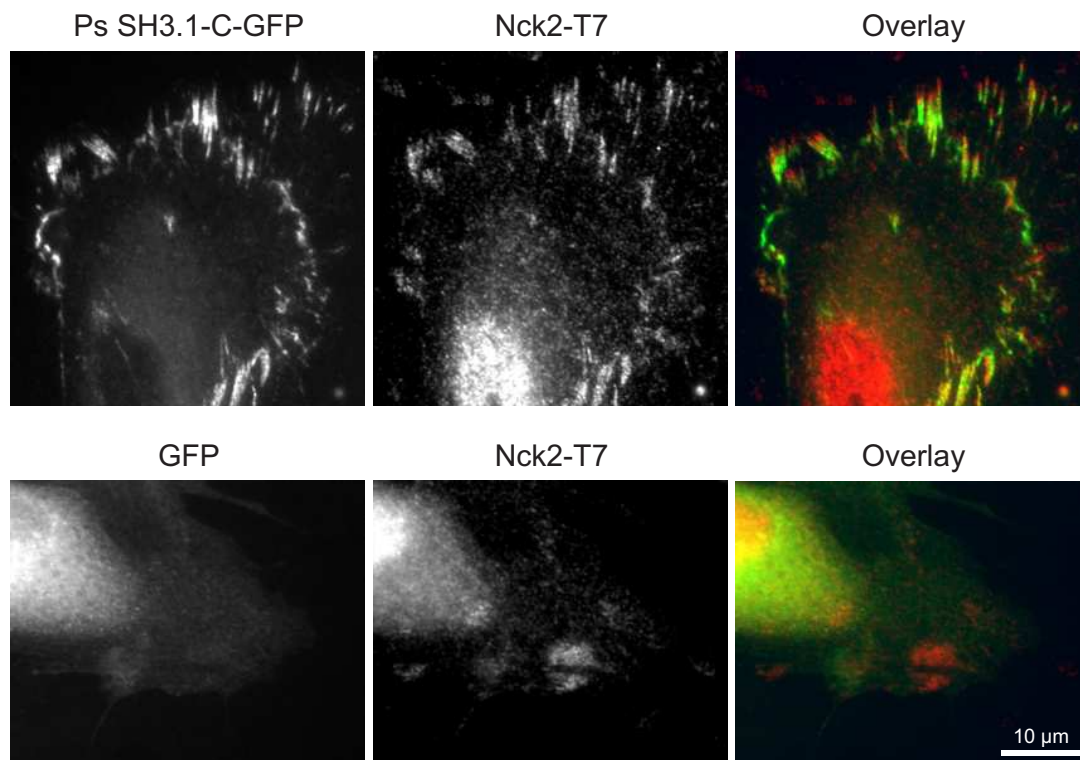


Abbildung 3.27: Transfektion von Nck2 und Ponsin in PtK2-Zellen. Rekombinantes, T7-markiertes Nck2-Protein wurde zusammen mit dem Ponsin-Konstrukt 'Ps SH3.1-C' als GFP-Fusionsprotein in PtK2-Zellen exprimiert (Reihe 1); beide Proteine wiesen partielle Kolo-kalisation in den Fokalkontakten auf. Zum Vergleich ist eine Transfektion von T7-markiertem Nck2-Protein zusammen mit GFP (leerer pMypG-Vektor) dargestellt (Reihe 2). Spalte 1 - GFP, Spalte 2 - Nck2-T7, Spalte 3 - Zwei-Kanal-Bild (GFP grün, Nck2 rot). Die Kernfärbung im Nck2-Kanal ist eine unspezifische Reaktion des T7-Antikörpers.

Die Ergebnisse der Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente wurden durch einen biochemischen Ansatz näher analysiert. Da die Prolin-reiche Region der Insertion von Phosphorylierungsstellen für MAPK umgeben ist (s. Abschnitt 3.2.6.2), wurde zusätzlich der Einfluss des Phosphorylierungsstatus dieser Region auf die Nck2-Ponsin-Interaktion untersucht.

Rekombinante, T7-markierte Ponsin-Konstrukte, welche die Skelettmuskel-spezifische Insertion enthielten ('Ps SH3.2-C' und 'Ps Ex30,31'), sowie das Konstrukt 'Ps SH3.2-C  $\Delta$ Ex30,31', das die letzten zwei SH3-Domänen ohne die Insertion enthielt (schematische Darstellung der Konstrukte in Abb. B.1), wurden unbehandelt oder nach Phosphorylierung mit p42-MAPK durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit rekombinantem, EEF-markiertem Nck2-Protein inkubiert. Anschließend wurde das gebundene Protein über seinen Immunotag detektiert. In diesem Versuch zeigte Nck2 deutliche Bindung an unphosphoryliertes 'Ps SH3.2-C' sowie 'Ps Ex30,31', also an die beiden Konstrukte, die die Insertion mit der

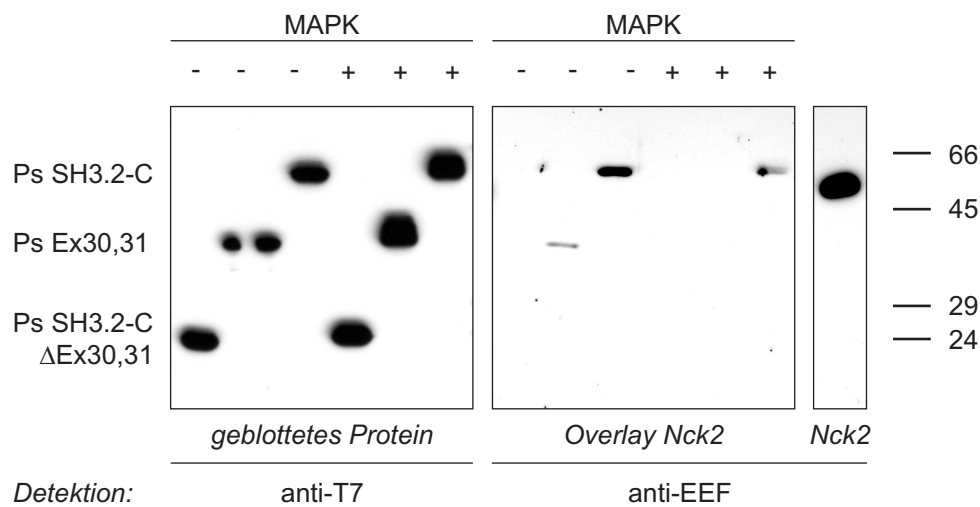


Abbildung 3.28: Bindung von Nck2 an die Skelettmuskel-spezifische Insertion im Ponsin in Westernblot-Overlay-Experimenten. *Links*: Westernblot der aufgereinigten, rekombinanten Ponsin-Proteine 'Ps SH3.2-C', 'Ps Ex30,31' und 'Ps SH3.2-C ΔEx30,31', nachgewiesen über ihren T7-Immunotag (- unphosphoryliert, + nach Inkubation mit aktivierter, rekombinanter p42-MAPK). *Rechts*: Westernblot-Overlay-Experimente. Die links dargestellten geblotteten Proteine wurden mit rekombinantem, EEF-markiertem Nck2-Protein inkubiert und gebundenes Protein über den EEF-Immunotag nachgewiesen. Zum Vergleich ist das verwendete Nck2-Protein detektiert. Nck2 zeigte Bindung an die unphosphorylierten Konstrukte 'Ps SH3.2-C' und 'Ps Ex30,31', welche die Insertion mit der Prolinreichen Region enthielten. Vorherige Phosphorylierung der Konstrukte durch p42-MAPK verminderte deutlich die Fähigkeit von Nck2, an die Ponsin-Konstrukte zu binden. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kD angegeben.

Prolin-reichen Region enthielten. Im Gegensatz dazu wurde keine Bindung an das Konstrukt 'Ps SH3.2-C ΔEx30,31' detektiert (Abb. 3.28). Damit wurden die Befunde der Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente bestätigt. Es ist zu vermuten, dass die von Cowan und Henkemeyer (2001) beschriebene, ursprüngliche Nck2-Bindungsstelle im Konstrukt 'Ps SH3.2-C ΔEx30,31' eine so geringe Affinität zu Ponsin besitzt, dass diese Interaktion mit den hier verwendeten Methoden nicht nachweisbar ist.

Nach Phosphorylierung der Insertion an SP-/TP-Motiven zeigte Nck2 eine dramatisch verringerte Bindung an die beiden Konstrukte 'Ps SH3.2-C' und 'Ps Ex30,31'. Diese Ergebnisse zeigen, dass MAPK-abhängige Phosphorylierungen der Insertion mit der Bindung von Nck2 an Ponsin interferieren.

### **3.3 Die Anpassung von Zell-Matrix-Kontakten in adulten quergestreiften Muskelzellen: MLP im gesunden und erkrankten Muskelgewebe**

#### **3.3.1 Die Rolle von mutierten MLP-Proteinen in Kardiomyopathien**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Fragestellung nachgegangen werden, wie einzelne Aminosäure-Austausche im MLP-Protein zu hypertropher Kardiomyopathie führen (s. Kapitel 1). Zusammengefasst stellt sich die Frage, worin sich die MLP-Mutanten (L44P, S54R E55G, C58G) auf molekularer Ebene vom Wildtyp-Protein unterscheiden und welche nachgeschalteten molekularen Vorgänge an der Erkrankung des Myokards beteiligt sind. Dabei sollte die DCM-assozierte Mutation MLP W4R vergleichend in die Experimente einbezogen werden.

##### **3.3.1.1 Lokalisation des Wildtyp-MLP und mutierter Formen in Nichtmuskelzellen und Kardiomyozyten**

Es wurde zunächst überprüft, ob die mutierten MLP-Formen in der Lage sind, die „richtige“ intrazelluläre Lokalisation einzunehmen. Dazu wurden das Wildtyp-Protein, die drei beschriebenen HCM-assozierten Mutanten und zusätzlich die DCM-assozierte Mutante als GFP-Fusionsproteine in transienten Transfektionen untersucht.

In PtK2-Zellen, die als Nichtmuskelzellen kein endogenes MLP enthalten, lokalisierte das Wildtyp-Protein vor allem in den Stressfasern (Abb. 3.29, erste Reihe). Diese Strukturen wurden mehr oder weniger stark diskontinuierlich dekoriert. Dies weist darauf hin, dass MLP sowohl an die *dense bodies* als auch kontinuierlich entlang der Stressfasern bindet. Auch eine nukleäre Lokalisation wurde gelegentlich beobachtet.

Alle mutierten MLP-Varianten wiesen eine ähnliche Lokalisation wie das Wildtyp-Protein auf (Abb. 3.29, Reihen 2–5). Die beobachteten Unterschiede lagen im Variationsbereich der Wildtyp-Transfektionen. Die Tatsache, dass keine Protein-Aggregate oder auffällige Fehllokalisationen beobachtet wurden, lässt darauf schließen, dass alle untersuchten mutierten MLP-Proteine prinzipiell in der Lage sind, in definierte subzelluläre Strukturen eingebaut zu werden. Da MLP ein muskelspezifisches Protein ist und die Mutationen kardiale Phänotypen verur-

sachen, wurden auch Transfektionstudien in neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. In diesem Zelltyp lokalisierte rekombinantes Wildtyp-MLP prominent in den Z-Scheiben (Abb. 3.30, erste Reihe). Daneben waren auch diffuse zytoplasmatische Anteile zu beobachten.

Die mutierten MLP-Proteine wiesen ebenfalls eine Z-Scheiben-Lokalisation auf (Abb. 3.30, Reihen 2–5). Sie unterschieden sich nicht vom Wildtyp-Protein in ihren subzellulären Lokalisationen. Die Unterschiede zwischen den abgebildeten Zellen entsprechen dem Variationsspektrum der Wildtyp-Transfektionen und reflektieren den unterschiedlichen Differenzierungs- bzw. Dedifferenzierungsgrad der einzelnen Zellen (Carroll *et al.*, 2001).

### 3.3.1.2 Überprüfung der MLP-Mutantenproteine auf $\alpha$ -Actinin-Bindung

Die Transfektionsstudien deuteten darauf hin, dass alle mutierten MLP-Varianten prinzipiell in das Sarkomer eingebaut werden können. Dies setzt unter anderem voraus, dass die Protein-Protein-Interaktionen, die für die subzelluläre Lokalisation des MLP in der Z-Scheibe verantwortlich sind, auch von den mutierten Proteinen eingegangen werden können. Als Bindungspartner des MLP in der Z-Scheibe sind  $\alpha$ -Actinin und Telethonin beschrieben worden (Louis *et al.*, 1997; Knöll *et al.*, 2002). Die Bindung an  $\alpha$ -Actinin ist eine konservierte Eigenschaft aller CRP-Proteine und scheint für die Stressfaser-Lokalisation der Proteine verantwortlich zu sein (Louis *et al.*, 1997). Da auch die MLP W4R Variante Z-Scheiben-Lokalisation aufwies (Abb. 3.30, Reihe 2), obwohl dieses Protein nicht in der Lage ist, an Telethonin zu binden (Knöll *et al.*, 2002), liegt die Vermutung nahe, dass die Wechselwirkung von MLP mit  $\alpha$ -Actinin das Protein an die Z-Scheibe rekrutiert. Die  $\alpha$ -Actinin Bindungsregion des MLP schließt sich unmittelbar an die Region an, in der die HCM-assoziierten MLP-Mutationen beschrieben wurden (Harper *et al.*, 2000; vgl. Abb. 1.8). Aus diesen Gründen wurde biochemisch überprüft, ob die mutierten Proteine in der Lage sind,  $\alpha$ -Actinin zu binden. Dazu wurden Westernblot-Overlay-Experimente mit rekombinanten Proteinen durchgeführt (Abb. 3.31).

Wie in der Literatur beschrieben (Louis *et al.*, 1997), wiesen CRP1, CRP2 und Wildtyp-MLP eine Bindung an  $\alpha$ -Actinin auf. Auch alle mutierten MLP-Proteine verfügten über die Fähigkeit,  $\alpha$ -Actinin zu binden. Daraus ergibt sich, dass keiner der Aminosäureaustausche in den mutierten MLP-Formen die  $\alpha$ -Actinin Bindungsstelle vollständig zerstört.

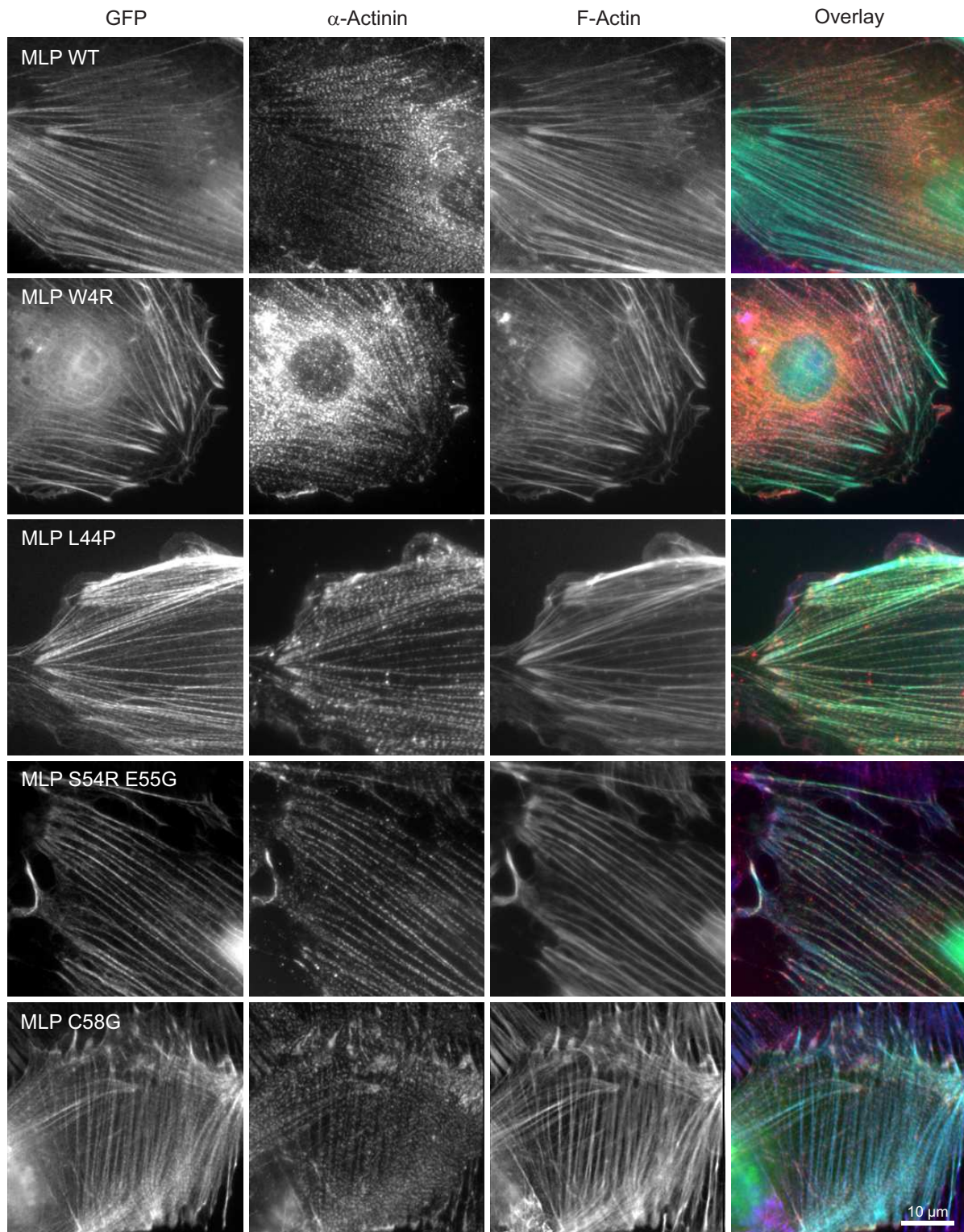


Abbildung 3.29: Transfektion von MLP-GFP-Fusionsproteinen in PtK2-Zellen. Erste Spalte: MLP-GFP, zweite Spalte:  $\alpha$ -Actinin (BM75.2), dritte Spalte: F-Actin (CPITC-Phalloidin), vierte Spalte: Drei-Kanal-Bild (GFP - grün,  $\alpha$ -Actinin - rot, F-Actin - blau). Wildtyp-MLP (erste Reihe) lokalisierte vor allem in den Stressfasern. Die MLP-Mutanten (Reihen 2–5) zeigten in ihren subzellulären Lokalisationen keine Unterschiede zum Wildtyp.

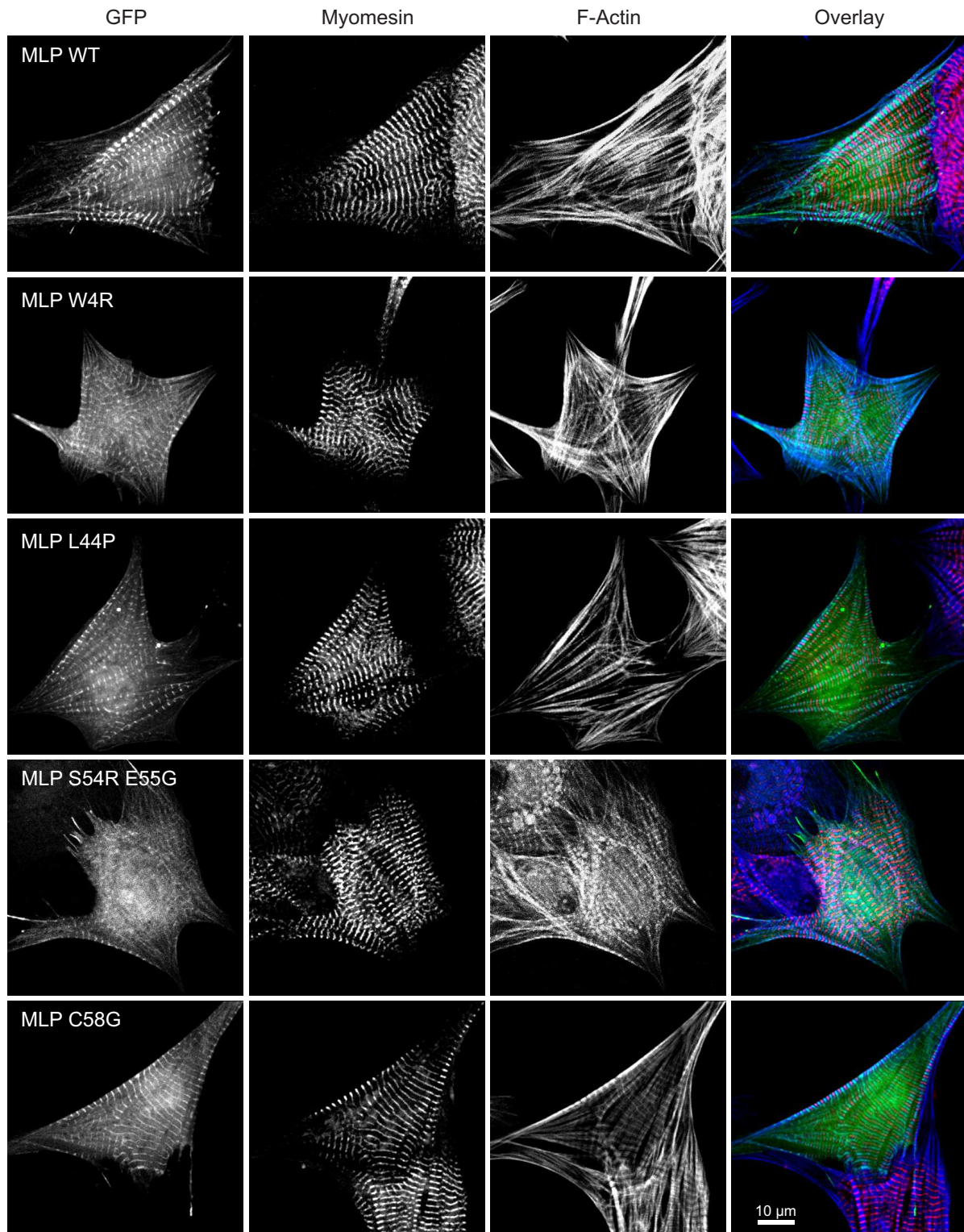


Abbildung 3.30: Transfektion von MLP-GFP-Fusionsproteinen in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Erste Spalte: MLP-GFP, zweite Spalte: Myomesin, dritte Spalte: F-Actin (CPITC-Phalloidin), vierte Spalte: Drei-Kanal-Bild (GFP - grün, Myomesin - rot, F-Actin - blau). Die alternierende Streifung von MLP und Myomesin (M-Banden-Protein) wies MLP als Z-Scheiben-Komponente aus. Die mutierten MLP-Proteine (Reihen 2–5) unterschieden sich nicht vom Wildtyp-MLP (erste Reihe). Durchgeführt von E. Ehler.



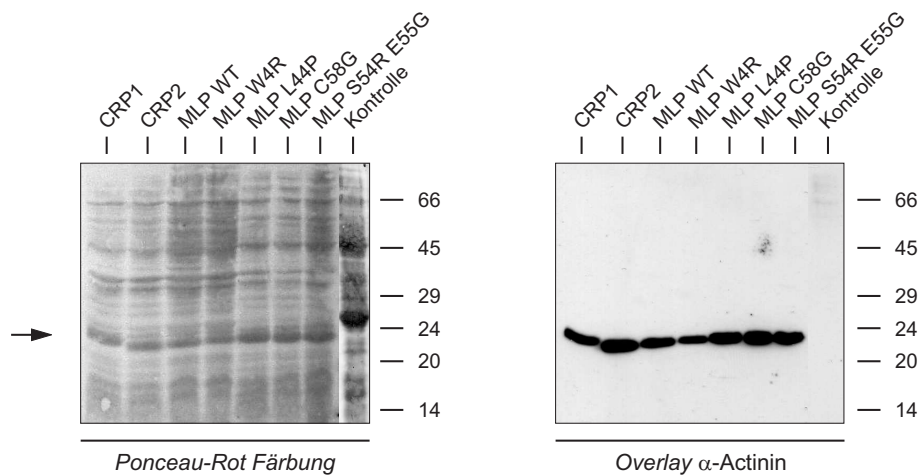


Abbildung 3.31: Überprüfung rekombinanter CRP/MLP-Proteine auf  $\alpha$ -Actinin Binding in Westernblot-Overlay-Experimenten. Totalextrakte bakterieller Expressionskulturen mit rekombinanten, EEF-markierten Proteinen (*links*: Ponceau-Rot-Färbung) wurden mit T7-markiertem, rekombinatem  $\alpha$ -Actinin inkubiert und gebundenes Protein über den T7-Tag nachgewiesen (*rechts*: T7-Detektion). Als Negativ-Kontrolle diente ein Bakterienlysate ohne rekombinantes Protein. Der Pfeil gibt die Lage der rekombinanten Proteine an; die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kD angegeben. Alle untersuchten rekombinanten CRP/MLP-Varianten zeigten Bindung an  $\alpha$ -Actinin.

### 3.3.2 Detaillierte biochemische Analyse der MLP C58G Variante

#### 3.3.2.1 Analyse der Faltung und strukturellen Stabilität

Die vorangegangenen Experimente (s. Abschnitt 3.3.1) deuteten darauf hin, dass die Aminosäureaustausche in den Kardiomyopathie-assoziierten MLP-Proteinen weder zur Aggregation bzw. Fehllokalisierung noch zu einem vollständigen Verlust der  $\alpha$ -Actinin Bindung führten. Es schienen also bereits geringe strukturelle oder funktionelle Veränderungen in den MLP-Mutanten Ursache der Pathogenese zu sein. Aus diesem Grund sollte eine detaillierte biochemische Analyse diese geringeren, eher quantitativen Unterschiede zwischen Wildtyp und mutierten Proteinen aufzeigen. Die nachfolgenden Untersuchungen konzentrierten sich auf die Analyse eines der mutierten MLP-Proteine. MLP C58G diente in allen weiteren Experimenten als Modellprotein für die Kardiomyopathie-verursachenden MLP-Mutanten, da für dieses Protein aufgrund des Austausches einer Zink-koordinierenden Aminosäure die deutlichsten Effekte zu erwarten waren.

**Zinkbindung** LIM-Domänen zeigen eine charakteristische Faltung in zwei Zinkfinger (Perez-Alvarado *et al.*, 1994), wobei in jedem dieser Finger vier konservierte Aminosäuren (C, H oder D) ein Zinkatom koordinieren (Michelsen *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 1994). Grundlegende Arbeiten von Schmeichel und Beckerle (1997) haben gezeigt, dass bereits die Mutation *eines* Zink-koordinierenden Restes in der LIM-Domäne des Zyxins dazu führt, dass das Zinkatom nicht mehr koordiniert werden kann. Da im MLP C58G Protein eine vergleichbare Situation vorliegt (Abb. 3.32 *links*), wurde die Zinkbindungskapazität des mutierten Proteins mit dem MLP-Wildtyp verglichen. Rekombinantes MLP C58G zeigte im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine um 25 % verminderte Kapazität, Zinkatome zu koordinieren. Dies entspricht drei statt vier gebundenen Zinkatomen im mutierten Protein und impliziert, dass der mutierte Zinkfinger seine Fähigkeit, Zink zu koordinieren, verloren hat. Beim Zyxin führt die fehlende Metall-Koordination zur Fehlfaltung des betroffenen Zinkfingers (Schmeichel und Beckerle, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass dies zusätzlich eine strukturelle Destabilisierung des anderen Zinkfingers in der LIM-Domäne bewirkt. Auch für das hier untersuchte MLP-Protein sind strukturelle Konsequenzen für betroffene LIM-Domäne und die angrenzenden Bereiche, d. h. auch für den ersten Zinkfinger und für den Glycin-reichen Abschnitt nach der ersten LIM-Domäne, zu erwarten.

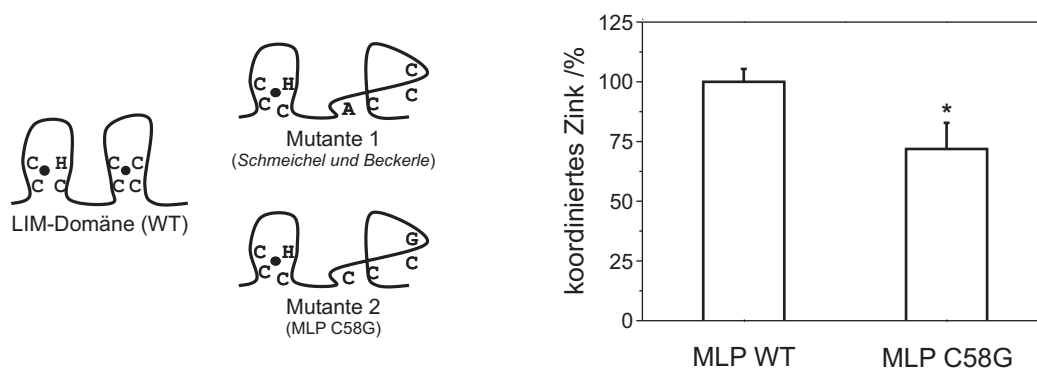


Abbildung 3.32: Zinkbindungskapazität von MLP WT und C58G. *Links*: Schematische Darstellung einer korrekt gefalteten LIM-Domäne (links) mit koordinierenden Aminosäuren und gebundenen Zinkatomen (schwarze Punkte). Mutierte Zinkfinger (rechts) sind nicht in der Lage, Zinkatome zu koordinieren. Das MLP C58G Protein (unten) ist mit der von Schmeichel und Beckerle (1997) verwendeten Mutante (oben) vergleichbar. *Rechts*: MLP C58G zeigte signifikant verminderte Zinkbindungskapazität relativ zu MLP WT (\*  $p < 0,01$ ).

**Erhöhte Proteolyseempfindlichkeit** Bei der Aufreinigung der heterolog exprimierten Mutante waren reproduzierbare Proteolyseprodukte auffällig, die in Wildtyp-Präparationen nicht beobachtet wurden. Um zu überprüfen, ob MLP C58G generell anfälliger für Proteolysevorgänge ist, wurden rekombinantes Wildtyp- und mutiertes MLP mit der Protease Thermolysin behandelt (Abb. 3.33).

MLP C58G wurde in diesen Experimenten schneller als die Wildtyp-Variante abgebaut, wobei prinzipiell die gleichen Intermediate auftraten. Als Endprodukt des Verdaus entstanden beim Wildtyp-Protein zwei prominente Produkte (ca. 10 und 14 kD), beim mutierten Protein war nur ein Endprodukt (ca. 10 kD) zu beobachten.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass es in der ersten LIM-Domäne auf Grund der fehlenden Zink-Koordination falsch oder unvollständig gefaltete Bereiche gibt, die im mutierten Protein über eine weniger kompakte Tertiärstruktur verfügen und leichter zugänglich für Proteasen sind. Folglich ist die Mutante anfälliger für Proteolyse.

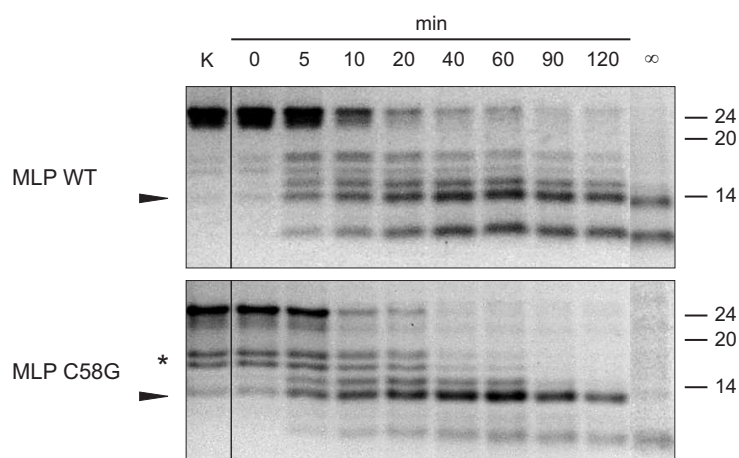


Abbildung 3.33: Proteasebehandlung von Wildtyp und mutiertem MLP. MLP C58G (unten) zeigte bereits vor der Inkubation (K) prominente Proteolyseprodukte (\*) und wurde schneller und vollständiger von Thermolysin abgebaut als MLP WT (oben); ebenso beachte man die fehlende Bande nach Übernachtverdau (∞, Pfeilspitze). Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kD angegeben.

### 3.3.2.2 Untersuchung der Bindungseigenschaften

Im nächsten Abschnitt sollte untersucht werden, inwieweit die veränderten strukturellen Eigenschaften der Mutante Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften des Moleküles haben. Dazu

wurden die Bindungseigenschaften von MLP C58G mit denen des Wildtyp-Proteins quantitativ verglichen.

**Gezielte Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente** Da sich die  $\alpha$ -Actinin Bindungsstelle im MLP unmittelbar an die mutierte Region anschließt (Harper *et al.*, 2000; vgl. Abb. 1.8), wurde in Hefe-Doppel-Hybrid-Experimenten die Bindung an dieses Protein untersucht (Abb. 3.34). Unter den verwendeten Bedingungen wies die C58G Mutante im Vergleich zum Wildtyp-MLP eine um ca. 75 % verringerte Aktivierung des *lacZ*-Reportergenes auf. Dies bestätigt die Aussage, dass die MLP C58G Variante prinzipiell noch in der Lage ist, an  $\alpha$ -Actinin zu binden (s. Abschnitt 3.3.1). Die dramatisch verringerte Aktivierung des Reportergenes reflektiert neben der verminderten Stabilität des mutierten Proteins offenbar auch eine verringerte Bindungskapazität an den Liganden  $\alpha$ -Actinin.

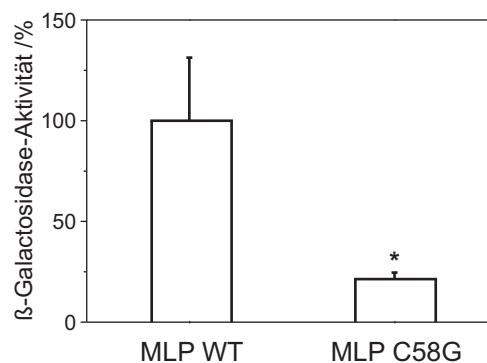


Abbildung 3.34: Bindung von MLP-Proteinen an  $\alpha$ -Actinin in gezielten Hefe-Doppel-Hybrid-Experimenten. Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität von Hefen, die MLP C58G und  $\alpha$ -Actinin koexprimierten ( $n = 11$ ) war signifikant reduziert im Vergleich zu Hefen, die MLP WT und  $\alpha$ -Actinin koexprimierten ( $n = 8$ ), (\*  $p < 0,0001$ ).

**Biochemische Charakterisierung** Sowohl  $\alpha$ -Actinin als auch N-RAP wurden als Bindungspartner des MLP beschrieben (Louis *et al.*, 1997; Ehler *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob MLP C58G tatsächlich ein verändertes Bindungsverhalten zu den Liganden  $\alpha$ -Actinin und N-RAP aufweist, wurden biochemische Bindungsversuche mit gereinigten, rekombinanten Proteinen durchgeführt (Abb. 3.35). Die beiden rekombinanten MLP-Proteine WT und C58G verfügten über einen EEF-Immunotag, alle anderen Konstrukte waren mit einem T7-Immunotag ausgestattet. Für das N-RAP wurden zwei aminoterminalen Konstrukte entworfen: 'N-RAP LI' enthielt die LIM-Domäne und den sich anschließenden nichtmodularen Teil, das

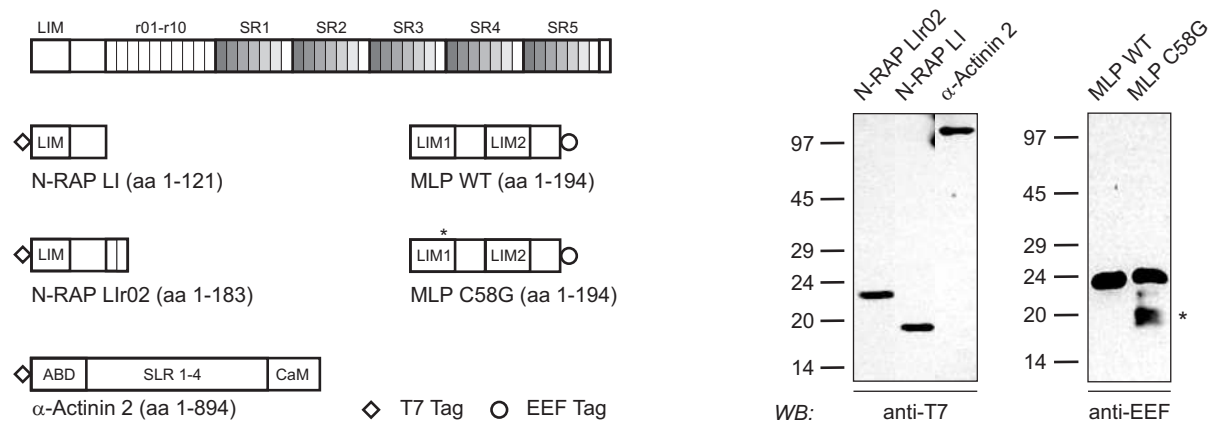


Abbildung 3.35: Konstrukte für biochemische Bindungsversuche. *Links*: Schematische Darstellung der Konstrukte; zum Vergleich ist auch das vollständige N-RAP Protein dargestellt; aa Aminosäure, r *repeat*, SLR *spectrin like repeat*, SR *superrepeat*. *Rechts*: Westernblot der gereinigten, rekombinanten Proteine; \* Proteolyseprodukte des MLP C58G. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kD angegeben.

Konstrukt 'N-RAP Llr02' zusätzlich die ersten beiden Nebulin-artigen *repeats*.  $\alpha$ -Actinin wurde als vollständiges Protein verwendet. Da für  $\alpha$ -Actinin zusätzlich spezifische Antikörper zur Verfügung standen (s. Tab B.1), ermöglichten diese Konstrukte in jedem Fall die spezifische Immundetektion des gebundenen Proteins. In Dotblot-Overlay-Experimenten zeigten sowohl die beiden N-RAP Konstrukte als auch  $\alpha$ -Actinin Bindung an Wildtyp-MLP, ebenso banden beide N-RAP-Konstrukte an  $\alpha$ -Actinin (Abb. 3.36). Für die Bindung von N-RAP an MLP wurde zusätzlich gezeigt, dass diese konzentrationsabhängig und sättigbar ist.

Da aufgrund früherer Bindungsversuche (Ehler *et al.*, 2001) bekannt ist, dass die LIM-Domäne des N-RAP nicht für die Bindung an MLP erforderlich ist, kann geschlossen werden, dass der sich unmittelbar anschließende, nichtmodulare Teil des N-RAP die Bindung an MLP vermittelt. Trotzdem zeigte das längere N-RAP-Konstrukt 'Llr02' stärkere Bindung an MLP. Möglicherweise bewirken in diesem Konstrukt die nachfolgenden Nebulin-artigen *repeats* eine stabilere Faltung der Bindungsregion.

MLP C58G zeigte in diesen Versuchen ein deutlich verändertes Bindungsverhalten: Die Bindung des längeren N-RAP Konstruktes an immobilisiertes MLP C58G war mit deutlich geringerer Stärke nachweisbar; eine Bindung des kürzeren N-RAP Konstruktes war kaum noch detektierbar (Abb. 3.36).

Jedes der drei Proteine MLP,  $\alpha$ -Actinin und N-RAP verfügt über Bindungsstellen für die jeweils anderen Proteine (Abb. 3.36 links). Weiterhin zeigte MLP C58G eine verringerte Bindung so-

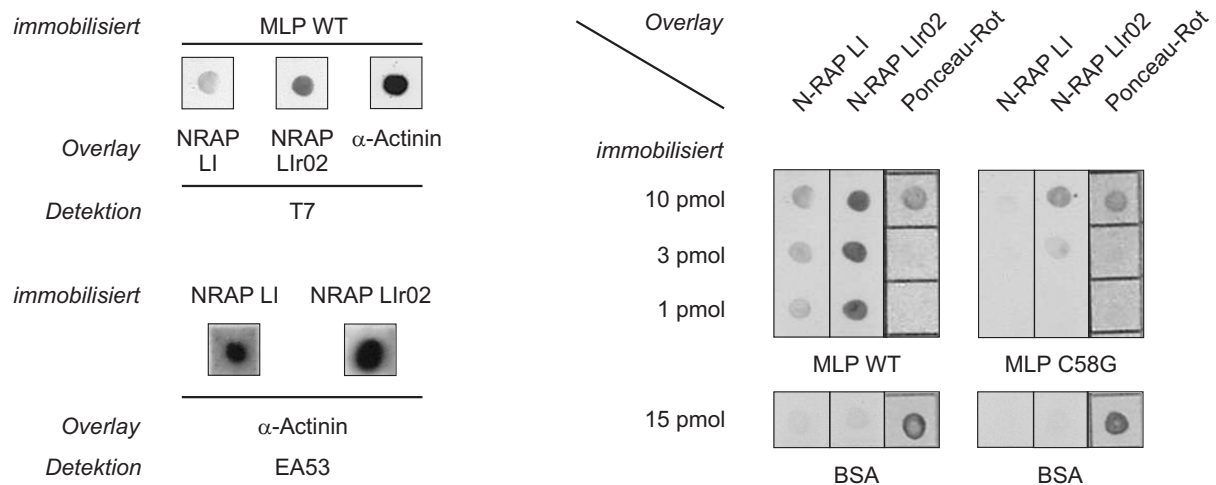


Abbildung 3.36: Dotblot-Overlay-Experimente. Rekombinante MLP- und N-RAP-Konstrukte wurden auf Nitrozellulose immobilisiert, mit rekombinanten Proteinen inkubiert (je 500 pmol) und gebundenes Protein immunologisch nachgewiesen. *Links*: Beide N-RAP Konstrukte und  $\alpha$ -Actinin zeigten Bindung an immobilisiertes MLP WT (5 pmol; oben). Ebenso interagierte  $\alpha$ -Actinin mit beiden N-RAP Konstrukten (5 pmol; unten). *Rechts*: MLP C58G zeigte eine verringerte Bindung an beide N-RAP Konstrukte. BSA diente als Kontrollprotein, die Ponceau-Rot-Färbung visualisiert immobilisiertes Protein. Gebundene Proteine wurden über den T7-Immunitag nachgewiesen.

wohl an  $\alpha$ -Actinin (Abb. 3.34) als auch an N-RAP (Abb. 3.36). Damit ergab sich die Frage, ob beide Proteine überlappende Bindungsstellen auf dem MLP haben.

In Koimmunpräzitationsversuchen wurde  $\alpha$ -Actinin mit MLP sowie N-RAP inkubiert und anschließend mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gefällt. Die gebundenen, mit-präzipitierten Proteine konnten im darauf folgenden Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 3.37).

In diesen Versuchen band MLP in Gegenwart und Abwesenheit von N-RAP an  $\alpha$ -Actinin, umgekehrt konnte an  $\alpha$ -Actinin gebundenes N-RAP in Gegenwart oder Abwesenheit beider MLP Varianten nachgewiesen werden. Wie schon in den vorangegangenen Experimenten (Abb. 3.34 und 3.36) zeigte MLP C58G eine verringerte Bindungsfähigkeit.

Um zu untersuchen, ob statt eines ternären Komplexes MLP –  $\alpha$ -Actinin – N-RAP zwei binäre Komplexe vorliegen (vgl. Abb. 3.37 rechts), wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Da steigende Mengen MLP keine Auswirkungen auf die Bindung von N-RAP an  $\alpha$ -Actinin hatten, lag keine Konkurrenz um Bindungsstellen auf dem  $\alpha$ -Actinin vor (Abb. 3.37 Mitte). Folglich ist davon auszugehen, dass die drei Proteine tatsächlich einen ternären Komplex bilden. Der Aminosäureaustausch im MLP C58G bewirkt eine strukturelle Destabilisierung des Proteins, die sich in der verminderten Bindungsfähigkeit der beiden unabhängigen Bindungsstellen für  $\alpha$ -Actinin und N-RAP widerspiegelt.

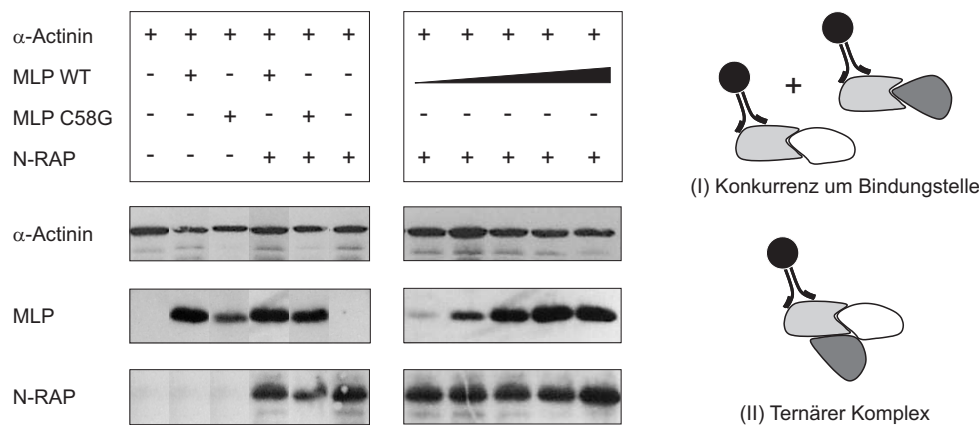


Abbildung 3.37: Koimmunpräzipitationsexperimente.  $\alpha$ -Actinin wurde unter Verwendung des Serums 653 präzipitiert und die gebundenen Proteine über ihre Immuntags nachgewiesen. *Links*: MLP WT und C58G kopräzipitierten mit  $\alpha$ -Actinin in Gegenwart und Abwesenheit von N-RAP ('Lir02'). Ebenso kopräzipitierte N-RAP mit  $\alpha$ -Actinin in Gegenwart und Abwesenheit beider MLP-Proteine. *Mitte*: Konkurrenzexperimente. Steigende Mengen MLP WT beeinflussten nicht die Kopräzipitation von N-RAP mit  $\alpha$ -Actinin. *Rechts*: Schematische Darstellung der beiden möglichen molekularen Situationen während der Immunpräzipitationsexperimente (schwarz: immobilisierter Antikörper, hellgrau:  $\alpha$ -Actinin, weiß: MLP, dunkelgrau: N-RAP).

### 3.3.3 Charakterisierung eines monoklonalen MLP-Antikörpers

Mit Hilfe eines gegen MLP gerichteten Antikörpers kann die Expression und Lokalisation des Proteins in den von MLP-Mutationen betroffenen Patienten analysiert werden. Es existieren zwar bereits einige MLP-Antikörper (polyklonale Kaninchen- bzw. Ziegenseren; Arber *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1999; Flick und Konieczny, 2000), keiner dieser Antikörper erfüllt jedoch *alle* nachfolgenden Anforderungen: Der Antikörper sollte mit MLP, nicht aber mit den eng verwandten Proteinen CRP1 und CRP2 reagieren. Da verschiedene Mausmodelle für Kardiomyopathien existieren (z. B. Arber *et al.*, 1997; Sussman *et al.*, 1998), sollte der Antikörper nicht nur humanes Protein, sondern auch das MLP der Maus erkennen. Weiterhin sollte der Antikörper über ein breites Anwendungsspektrum verfügen und für Westernblot-, Immunpräzipitations- sowie Immunfluoreszenz-Anwendungen geeignet sein. Auch wäre es vorteilhaft, wenn der Antikörper in unbegrenzter Menge in gleichbleibender Qualität zur Verfügung stehen würde (monoklonaler Antikörper).

#### 3.3.3.1 Strategie und Selektion geeigneter Hybridome

Ein Sequenzvergleich von CRP1, CRP2 und MLP ergab, dass die drei Proteine nur in zwei Regionen größere Unterschiede in der Aminosäureabfolge aufweisen (Abb. 3.38). Als Immuni-

CRP1	1	MPNWGGGKRCGVCKOKTVYFAEEVQCEGNSFHKS CFLCMVCKKNLDSTTVAVHGEETIYCKS	60
CRP2	1	MPVWGGGNKCGACGRTVYHAAEVQCDERSEFHRC CFLCMVCRKNLDSTTVAIHDEETIYCKS	60
MLP	1	MPNWGGGAKCGACEKTVYHAAEETQCNERSEFKTCFHCMA CRKALDSTTVAAHSEETIYCKV	60
CRP1	61	CYGGKYGPKGYGYGQAGTLLSTDKGESLGIKHE~EAPGHRPTINPNASKFAOKIGGSERC	119
CRP2	61	CYGGKYGPKGYGYGQAGTLLNMDRGERLGIKPE~SVQPHRPTINPNISKFAOKYGGAEKC	119
MLP	61	CYGRRYGPKGIGYGQAGCLSTDTGEHLGLQFQOSPAPRSVITSNPSKETAKFGSEK	120
CRP1	120	PRCSQAVYAAEKVIGAGKSWHKA CFRCAKCGKGLESTTLADKDGELYCKGCYAKNFGPKG	179
CRP2	120	SRCGDSVYAAEKIIGAGKPWHKN CFRCAKCGKSLSTTLTEKDGELYCKGCYAKNFGPKG	179
MLP	121	PRCGKSVYAAEKVMGGKPPWHKT CFRCAKCGKSLSTNVTDKDGELYCKVCYAKNFGPTG	180
CRP1	180	<u>FGFGQAGALVHSE</u> 193	
CRP2	180	<u>FGYCGAGALVHAQ</u> 193	
MLP	181	<u>IGFGGLTQQVEKKE</u> 194	

Abbildung 3.38: Sequenzalignment von CRP1, CRP2 und MLP. Nur zwei Regionen (Aminosäuren 90–105 und 180–194) der MLP-Sequenz zeigen deutliche Unterschiede zu CRP1 und CRP2; identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt. Die Aminosäuren, die dem verwendeten Immunisierungspeptid entsprechen, sind unterstrichen.

sierungspeptid wurde daher ein carboxyterminales, 30 Aminosäuren langes Peptid gewählt, das eine MLP-spezifische Region enthält.

Nach Fusion von Milzzellen einer immunisierten Maus mit einer Myelom-Zelllinie (Köhler und Milstein, 1975) wurden Oligo-Hybridoma-Klone selektiert, die Antikörper produzierten, die in ELISA-Tests mit rekombinantem MLP, nicht aber mit rekombinantem CRP1 oder CRP2 reagierten. Diese Arbeiten wurden von C. Erck (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, GBF, Braunschweig) durchgeführt.

Zehn Kulturüberstände von Hybridomaklonen wurden im Westernblot auf Reaktivität mit rekombinantem MLP und Herzextrakten getestet (Abb. 3.39). Parallel wurden sie in Immunfluoreszenz-Anwendungen überprüft. Nur die Überstände der Klone #79, #177 und #238 zeigten deutliche Signale in der Immunfluoreszenz. Sie wurden subkloniert und die Kulturüberstände einzelner Antikörper-produzierender Zellklone wie oben beschrieben getestet. Da nur der Überstand 79D2 zufriedenstellende Ergebnisse in Westernblots zeigte (Abb. 3.39), wurde dieser als endgültiger monoklonaler MLP-Antikörper selektiert. Seine Immunglobulin-Subklasse wurde als 'G2a' bestimmt.

### 3.3.3.2 Charakterisierung des Antikörpers 79D2

Von der GBF Braunschweig wurde gereinigter monoklonaler Antikörper 79D2 zur Verfügung gestellt, welcher zunächst für biochemische Anwendungen charakterisiert werden sollte.



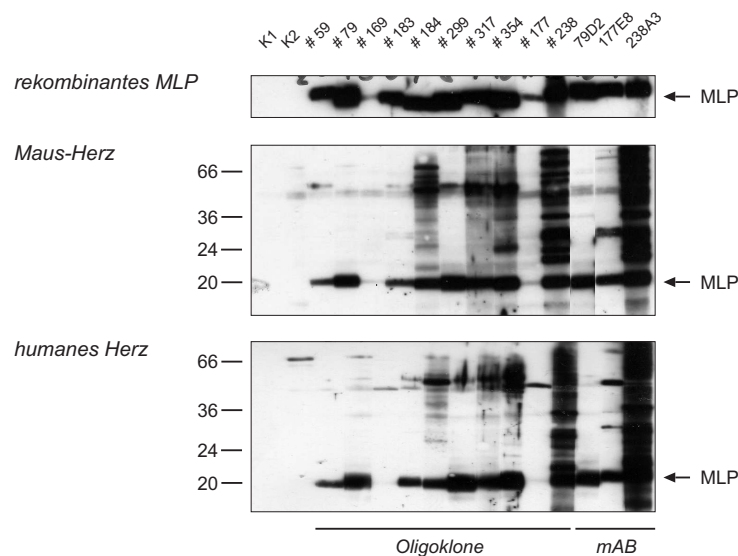


Abbildung 3.39: Testung verschiedener Kulturüberstände im Westernblot. Zehn verschiedene Oligo-Hybridoma-Klone (Bahnen 3–12) und drei monoklonale Kulturüberstände (Bahnen 13–15) wurden im Westernblot auf Reaktivität mit rekombinantem MLP (*oben*), MLP im Herzextrakt der Maus (*Mitte*) und des Menschen (*unten*) überprüft. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kD angegeben; *K1* - Inkubation ohne Ig, *K2* - Inkubation mit Kontroll-Ig.

Der Antikörper reagierte mit endogenem MLP des Menschen, der Maus und der Ratte sowie mit rekombinantem (humanem) MLP (Abb. 3.40). Er war weiterhin in der Lage, MLP zu präzipitieren und reagierte nicht mit rekombinantem CRP1 oder CRP2. Die Tatsache, dass in Herzproben von MLP *knock out* Mäusen keine Bande detektiert wurde, ist ein weiterer Beweis für die Spezifität des Antikörpers.

MLP war mit Hilfe dieses Antikörpers im Herzen und im adulten Skelettmuskel (in geringem Maße) nachweisbar. Dies bestätigte frühere Expressionsstudien (Arber *et al.*, 1994). Interessant war der Befund, dass MLP weder in undifferenzierten noch in differenzierten HSkM-Zellen detektierbar war (Abb. 3.40, C). Damit unterschied sich dieses Zellsystem erheblich von C2C12-Zellen, die MLP bereits mit Beginn der Differenzierung exprimieren (Arber *et al.*, 1997). Mögliche Erklärungen für diese Diskrepanzen sind, dass (a) MLP in HSkM-Zellen erst in weiter differenzierten Stadien exprimiert wird oder dass (b) die verwendeten HSkM-Zellen Satelliten-Zellen schneller Muskelfasern darstellen, die laut Untersuchungen von Schneider *et al.* (1999) kein MLP enthalten.

In HSkM-Zellextrakten und Herzgewebeextrakten wurden kreuzreaktive Banden um 60 kD beobachtet (Abb. 3.40, B, C). Sequenzvergleiche nach Datenbankrecherchen ergaben, dass diese

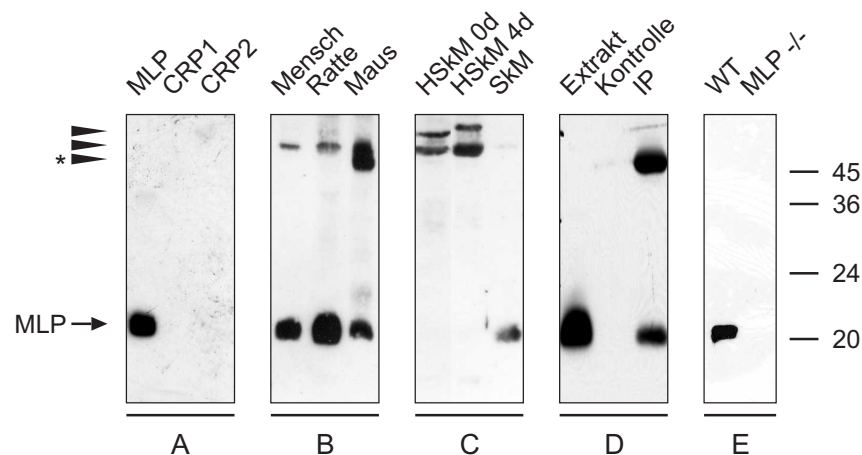


Abbildung 3.40: Charakterisierung des MLP-Antikörpers 79D2 in Westernblot-Anwendungen. Auftragung von links: A - rekombinante Proteine: MLP, CRP1, CRP2; B - Herzextrakte von Mensch, Ratte und Maus; C - Skelettmuskelextrakte: undifferenzierte HSkM-Zellen (0 d), differenzierte HSkM-Zellen (4 d), Gewebeextrakt adulter Skelettmuskel (human); D - Immunpräzipitation: verwendeter Extrakt, Kontrolle ohne Antikörper, Immunpräzipitation; E - Herzextrakt Maus (WT), Herzextrakt MLP<sup>-/-</sup> Maus. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kD angegeben; Pfeil: MLP, Pfeilspitzen: kreuzreaktive Banden, \* Immunglobuline (schwere Ketten); E wurde von E. Ehler durchgeführt.

von nukleären Proteinen hervorgerufen werden könnten, die mit MLP in kurzen Sequenzabschnitten übereinstimmen (Tab. B.7).

Obwohl der Antikörper in der Lage war, transfiziertes MLP in PtK2-Zellen anzufärben (Daten nicht gezeigt), waren alle weiteren Immunfluoreszenz-Analysen unbefriedigend: Auf Gewebeschnitten (Herz und Skelettmuskel) konnten mit dem Antikörper keine spezifischen, subzellulären Strukturen angefärbt werden. Gelegentlich beobachtete Kernfärbungen sind kritisch zu bewerten, da sie auch in Immunfluoreszenz-Färbungen von HSkM-Zellen zu beobachten waren, die kein MLP exprimieren (Abb. 3.40, C und Abb. 3.41). Folglich könnten sie durch die kreuzreaktiven nukleären Proteine (s. o.) hervorgerufen werden.

Zusammenfassend steht also mit dem Antikörper 79D2 erstmals ein spezifischer, monoklonaler MLP-Antikörper für Westernblot- und Immunpräzipitationsanwendungen zur Verfügung.

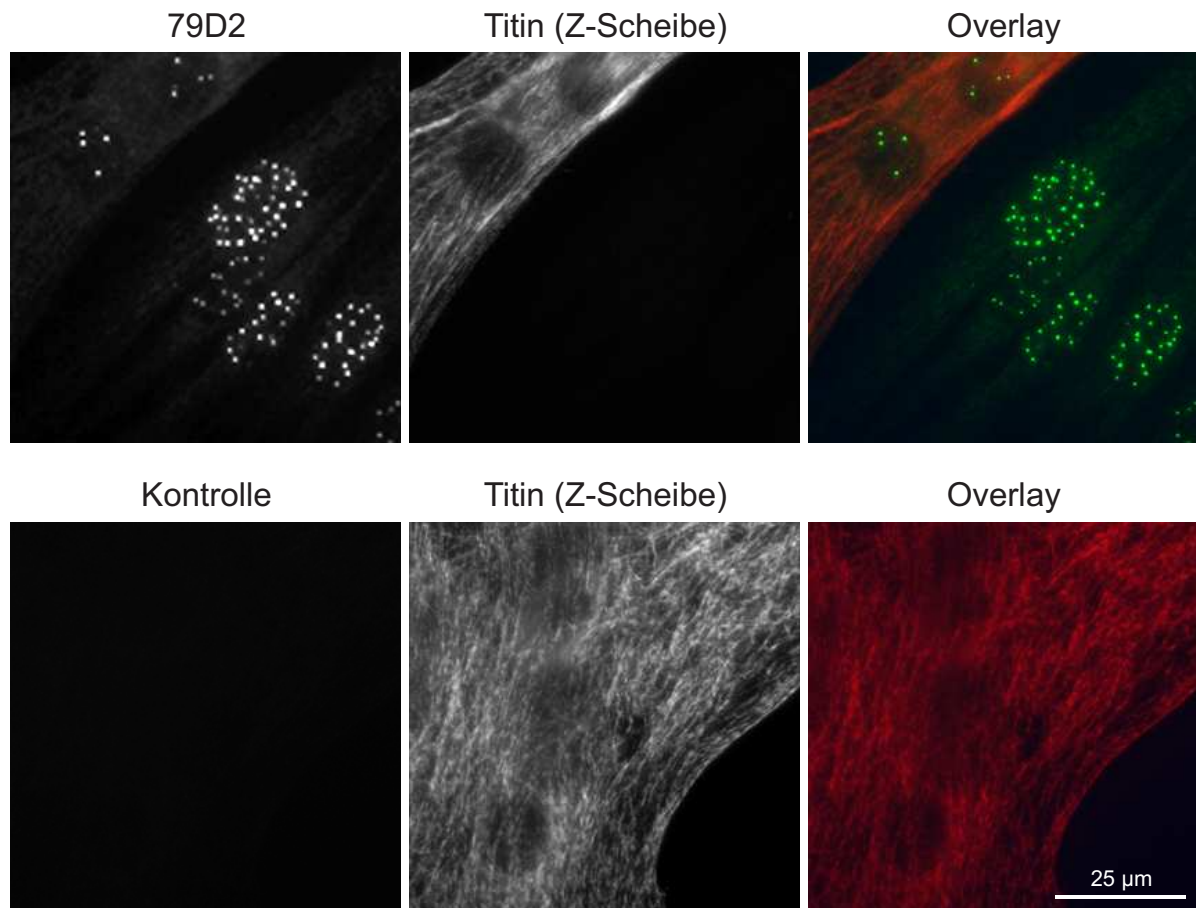


Abbildung 3.41: Kreuzreaktivität des mAB 79D2 mit nukleären Proteinen. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Analysen kultivierter HSkM-Zellen, die vier Tage *in vitro* differenziert wurden. Der monoklonale MLP-Antikörper 79D2 färbte nukleäre Strukturen in Titin-positiven Myotuben und Titin-negativen Myoblasten an (Reihe 1), während diese Markierung in Kontrollfärbungen (Reihe 2, identische Antikörperkombination unter Auslassung des mAB 79D2) nicht beobachtet wurde. Erste Spalte: 79D2 (Reihe 1) bzw. kein Antikörper (Reihe 2), zweite Spalte: Titin Z-Scheibe (mAB T12), dritte Spalte: Zwei-Kanal-Bild (79D2 bzw. Kontrolle grün, Titin rot). Man beachte, dass im Westernblot kein MLP in HSkM-Zellen nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 3.40).

### 3.3.4 Potentielle Beteiligung von MLP an Herz- und Skelettmuskel-Erkrankungen

#### 3.3.4.1 Analyse der Expression von MLP im Myokard von DCM- und HCM-Patienten

Heterozygote MLP-Mutationen können eine HCM verursachen (Geier *et al.*, 2003). Daher stellte sich die Frage, ob im Myokard von HCM-Patienten, bei denen keine MLP-Mutation vorliegt, die Expression von MLP verändert ist, wie es für die Expression des Proteins im Myokard von DCM-Patienten beschrieben wurde (Zolk *et al.*, 2000).

Mit dem hier beschriebenen MLP-Antikörper stand ein Werkzeug zur Verfügung, die Expression von MLP im Myokard von HCM-Patienten, im Vergleich zu DCM-Patienten, zu überprüfen. Es wurden die bereits beschriebenen DCM- und Kontrollproben verwendet (s. Abschnitt 3.2.4.1) und auf gleiche Art und Weise HCM-Proben, die aus Myektomien stammten, analysiert. Letztere wurden vom Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen und der Humboldt-Universität Berlin zur Verfügung gestellt (s. Tab. B.5).

Die Extrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und MLP sowie sarkomeres  $\alpha$ -Actinin im Westernblot nachgewiesen (Abb. 3.42). Die densitometrische Auswertung der Gele erfolgte in Analogie zum Ponsin (s. Abschnitt 3.2.4.1). Die auf sarkomeres  $\alpha$ -Actinin bezogenen, normierten Werte der einzelnen Proben sind in Tab. B.5 zusammengefasst. Ein Vergleich von Kontrollproben und DCM-Proben zeigte, dass in fünf der sechs untersuchten DCM-Proben der MLP-Gehalt signifikant herabgesetzt war (Abb. 3.42 *rechts oben*). Eine Probe (Abb. 3.42, Bahn 9 in Blot 1; Probe '1155') wurde mit statistischen Methoden als Ausreißer identifiziert (s. Abschnitt 2.6.2) und nicht in die Mittelwertberechnung einbezogen.

Die verminderte Expression in von DCM betroffenen Herzen steht in Einklang mit den Daten von Zolk *et al.* (2000), welcher ebenfalls eine verminderte MLP-Expression auf Proteinebene in DCM-Herzen beschrieben hat. Auch die auffällig hohe Variationsbreite des MLP-Gehalts, insbesondere in den Kontrollproben, konnte bestätigt werden. Diese könnte auch Ausdruck der Heterogenität der Kontrollproben hinsichtlich Alter, Gesundheitszustand und Probenbehandlung nach Explantation sein.

Ein anderes Bild ergab sich für die HCM-Proben, in welchen sich die durchschnittliche Expression von MLP nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterschied (Abb. 3.42 rechts unten). Im ersten HCM-Kollektiv waren die MLP-Gehalte in der Regel leicht erhöht, während das zweite HCM-Kollektiv eine sehr heterogene MLP-Expression aufwies.

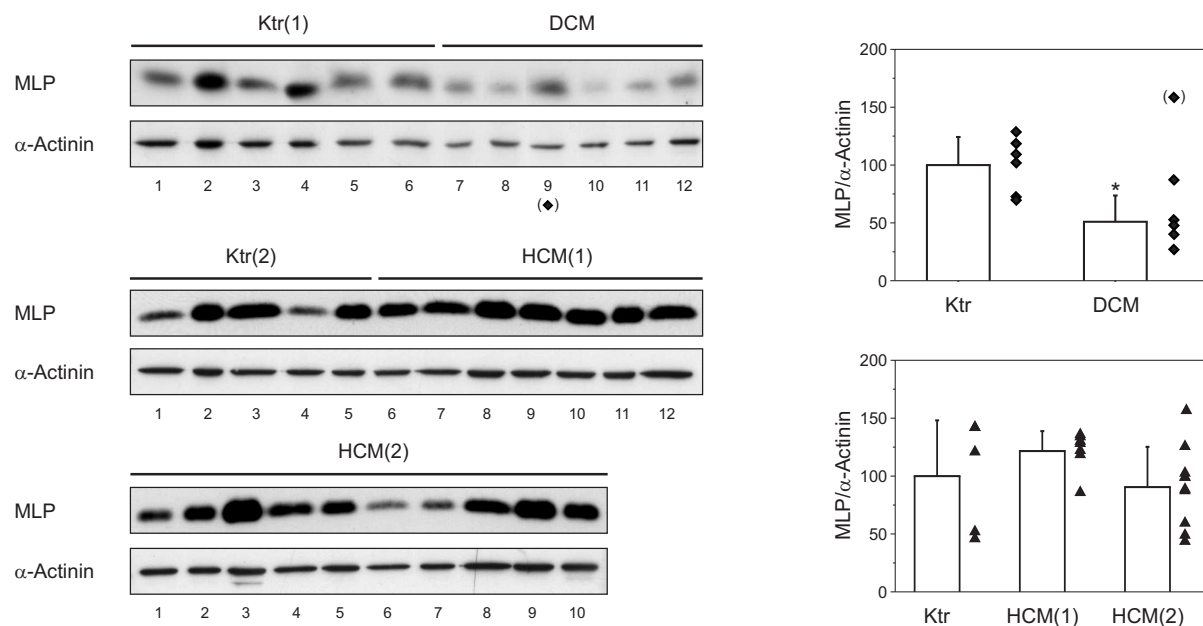


Abbildung 3.42: Expression von MLP und  $\alpha$ -Actinin im Myokard von DCM- und HCM-Patienten. *Links:* In Westernblots detektiertes MLP und sarkomeres  $\alpha$ -Actinin in Kontrollgeweben (Ktr 1 und 2), Extrakten von DCM-Patienten (DCM) und HCM-Patienten (HCM 1 und 2). MLP wurde mit mAB 79D2,  $\alpha$ -Actinin mit dem Serum 653 nachgewiesen. *Rechts:* Densitometrische Auswertung der Blots. Der MLP-Gehalt wurde auf den  $\alpha$ -Actinin-Gehalt der gleichen Probe normiert und der Mittelwert des Kontrollkollektives auf den Wert 100 gesetzt. Relativ zum jeweiligen Kontrollkollektiv sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des DCM-Kollektives (*oben*) bzw. der HCM-Kollektive (*unten*) aufgetragen. Rechts der Mittelwerte sind die mit gleichem Skalierungsfaktor multiplizierten Werte der einzelnen Proben des Kollektives dargestellt. Die mit Klammern markierte DCM-Probe wurde mit einem statistischen Test als Ausreißer identifiziert (s. Abschnitt 2.6.2) und nicht in die Mittelwertberechnung eingezogen. Man beachte, dass die Analyse des DCM- und der HCM-Kollektive zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit unterschiedlichen Kontrollkollektiven erfolgten und folglich die Absolutwerte der DCM- und HCM-Kollektive nicht direkt miteinander vergleichbar sind. \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ).

### 3.3.4.2 Veränderte Expression von MLP im Skelettmuskel eines Mausmodelles für Kyphoskoliose

Während die Beteiligung von MLP an Kardiomyopathien weithin akzeptiert ist, ist über die Funktion dieses muskelspezifischen Proteins bei Erkrankungen der Skelettmuskulatur nur wenig bekannt.

Die *ky*-Maus ist ein Tiermodell für idiopathische Kyphoskoliose (Mason und Palfrey, 1984; Bridges *et al.*, 1992). Eine homozygote Mutation im Gen des *ky*-Proteins bewirkt ein vorzeitiges Stop-Codon in der mRNA (Blanco *et al.*, 2001). Infolgedessen wird die mRNA über einen *nonsense mediated decay* Mechanismus abgebaut (Frischmeyer und Dietz, 1999) und das *ky*-Protein ist auf Westernblot-Ebene nicht nachweisbar (Blanco *et al.*, 2001). Die makroskopische Konsequenz ist eine degenerative Myopathie, die mit einer Skoliose (Verkrümmung der Wirbelsäule) einhergeht. Auf zellulärer Ebene durchlaufen die betroffenen Muskelpartien mit vorwiegend langsamen Fasertypen kurz nach der Geburt einmalig einen Degenerations- und Regenerationsprozess. Im adulten Tier sind die betroffenen Muskelfasern dystroph und mikroskopisch an ihrem kleinen Durchmesser erkennbar. mRNA-Expressionsanalysen haben gezeigt, dass mehrere Gene eine veränderte Expression in betroffenen Muskelpartien der *ky*-Maus aufweisen, darunter auch MLP (Blanco *et al.*, 2004). Mit Hilfe des hier beschriebenen MLP-Antikörpers sollte überprüft werden, ob die veränderte Expression des MLP auch auf Proteinebene nachweisbar ist. Dazu wurden Westernblot-Analysen zweier Muskelgruppen der *ky*-Maus im Vergleich zu Wildtyp-Gewebe durchgeführt (Abb. 3.43).

In beiden untersuchten Muskelgruppen ist eine erhöhte Expression des MLP-Proteins zu beobachten. Im Gegensatz dazu blieb die Expression eines anderen sarkomeren Proteins, des  $\alpha$ -Actinins, im Vergleich zum Grundstoffwechsel-Enzym GAPDH unverändert. Damit werden nicht nur die Expressionsdaten auf mRNA-Ebene bestätigt, sondern zum ersten Mal eine Beteiligung von MLP an einer Skelettmuskel-Erkrankung auf Proteinebene beschrieben.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die erhöhte Expression des MLP in den molekularen Kontext der Erkrankung einordnen zu können: Es stellt sich die Frage, ob MLP an den Umstrukturierungsprozessen in den Skelettmuskeln der *ky*-Maus direkt beteiligt ist, oder ob die erhöhte MLP-Expression nur eine sekundäre Folge der Erkrankung ist.

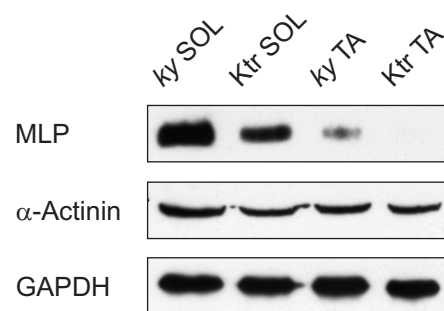


Abbildung 3.43: Veränderte MLP-Expression in Skelettmuskelproben der *ky*-Maus. In Muskelproben gleichen Proteingehaltes der *ky*-Maus (*ky*) und einer Wildtyp-Maus (Ktr) wurden MLP mit mAB 79D2, sarkomeres  $\alpha$ -Actinin mit dem Serum 653 und GAPDH mit einem mAB detektiert. SOL - *M. soleus*, TA - *M. tibialis anterior*.

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Die Rolle Integrin-assoziiierter Proteine in den Zell-Matrix-Verbindungen differenzierender Skelettmuskelzellen

Die lateralen Zell-Matrix-Kontakte quergestreifter Muskelzellen – die Costamere – wurden ursprünglich als Vinculin-haltige, rippenförmige Strukturen beschrieben, welche die Myofibrillen auf Höhe der Z-Scheiben umspannen (Pardo *et al.*, 1983). Während die Lokalisation des muskelspezifischen Dystrophins und anderer Proteine des Sarkoglycan-Komplexes in diesen Strukturen der Kraftübertragung nachgewiesen wurde (Ervasti, 2003), war wenig über die Ausstattung dieser Strukturen mit „klassischen“ Proteinen der Fokalkontakte bekannt.

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit stellten morphologische Untersuchungen dar, die die Entwicklung der Zell-Matrix-Kontakte, im Speziellen der Costamere, im Verlauf der Differenzierung von Skelettmuskelzellen beschreiben sollten. Dazu wurde die Expression „klassischer“ Fokalkontakt-Marker in differenzierenden HSkM-Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen untersucht: Während die angefärbten Zell-Matrix-Kontakte proliferierender HSkM-Zellen morphologisch einheitlich waren und weitestgehend den Fokalkontakten adhärenter Nichtmuskelzellen entsprachen, wiesen differenzierende HSkM-Zellen eine erstaunliche Variabilität bezüglich der Gestalt und Lage der Zell-Matrix-Kontakte auf: Neben großen, flächigen Fokalkontakten an den Enden der Myotuben befanden sich in zentralen, dem Substrat zuge-



wandten Bereichen viele kleine, unregelmäßig geformte Zell-Matrix-Kontakte (Abb. 3.2). Die Enden der entstehenden Prämyofibrillen wurden in frühen Differenzierungsstadien durch elongierte Kontakt-Strukturen mit der Zellmembran verankert. Im weiteren Verlauf der Differenzierung bildeten sich PLAS-artige Strukturen, welche die reifenden Myofibrillen mit der Zellmembran verbinden. Da diese Strukturen ausschließlich auf der substratabgewandten Seite zu finden waren, ist davon auszugehen, dass die PLAS-artigen Strukturen eine Verbindung zu Komponenten der extrazellulären Matrix darstellen, die von den Myotuben selbst sezerniert wurden (Rao *et al.*, 1985).

Die Ausstattung proliferierender HSkM-Zellen mit Fokalkontakt-Proteinen entsprach weitgehend der von Nichtmuskelzellen: Neben Vinculin waren Paxillin, FAK sowie Tensin anzutreffen. Weiterhin wurden die Fokalkontakte prominent durch einen Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper angefärbt (Abb. 3.1). Dies bedeutet, dass Proteine der Fokalkontakte auch in diesem Zellsystem einen hohen Anteil an Tyrosin-Phosphorylierungen aufweisen. Im Laufe der Muskelentwicklung erfolgten nicht nur morphologische Veränderungen der Zell-Matrix-Kontakte, auch die Proteinzusammensetzung änderte sich nach Beginn der myogenen Differenzierung: Die Strukturen wurden durch muskelspezifisch exprimierte Proteine, z. B. Ponsin und  $\beta$ 1D-Integrin, ergänzt, gleichzeitig veränderte sich das Expressionsmuster einiger „klassischer“ Fokalkontakt-Proteine (Abb. 3.1). Bereits früh nach Beginn der Differenzierung war die Abnahme der FAK in den Zell-Matrix-Kontakten beobachtbar (Abb. 3.2), diese wurde gefolgt von einer dramatischen Abnahme des Phospho-Tyrosin-Gehaltes. Zeitlich verzögert verringerte sich auch die Expression des Paxillins. In adulten Muskelzellen waren die drei Fokalkontakt-Marker nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.12). Im Gegensatz dazu zeigten Vinculin und Tensin eine unveränderte Expression in differenzierenden Skelettmuskelzellen und waren auch in den Costameren adulter Muskelzellen sowie den Glanzstreifen der Kardiomyozyten anzutreffen.

Der Übergang von PLAS-artigen Strukturen zu reifen Costameren konnte im verwendeten Modellsystem nicht beobachtet werden, da sich die HSkM-Zellen bei spontanen Kontraktionen – also zu dem Zeitpunkt, an dem die Ausbildung von Costameren zu erwarten ist – von der Kulturschale ablösten. Immunfluoreszenz-Untersuchungen adulter Gewebe lieferten zwar ergänzende Aussagen zur Proteinexpression in adulten Costameren, es verblieb jedoch ein Zeitfenster in der Entwicklung der Costamere, das experimentell nicht erfaßt wurde. Es ist zu vermuten, dass in diesem Zeitraum das Adapterprotein Paxillin aus den Vorläuferstrukturen der

Costamere verschwindet.

Da das verringerte Expressionsniveau der FAK dem sinkenden Gehalt an Phospho-Tyrosin vorausgeht, ist zu vermuten, dass die Aktivität der FAK die Phosphorylierung der Fokalkontakt-Proteine – direkt oder indirekt über andere Proteinkinasen – bewirkt (Schaller *et al.*, 1992). Der FAK wird in Nichtmuskelzellen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Dynamik von Fokalkontakten zugeschrieben (Parsons, 2003). Damit werden wichtige Prozesse, wie beispielsweise die Migration von Zellen oder die Anheftung an die extrazelluläre Matrix, kontrolliert. FAK-defiziente Zellen weisen eine eingeschränkte Motilität auf und bilden verstärkt Fokalkontakte aus (Ilic *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu proliferierenden Myoblasten, die motil sind und deren definierte Anordnung Voraussetzung für Fusionsereignisse ist (Clark *et al.*, 2002b), sind die Myotuben differenzierender HSkM-Zellen in ihrer Migrationsfähigkeit eingeschränkt. Es ist denkbar, dass zu diesem Zeitpunkt ein Umbau der Zell-Matrix-Strukturen eingeleitet wird, in dessen Verlauf die Aktivität der FAK kontraproduktiv wäre, und gleichzeitig die Proteinzusammensetzung an die neuen Bedingungen angepasst wird. Welche Signale eine derartige Änderung der Proteinzusammensetzung in den Zell-Matrix-Strukturen der differenzierenden Skelettmuskelzellen bewirken, ist zum heutigen Zeitpunkt unklar.

Untersuchungen von Carragher *et al.* (1999) haben gezeigt, dass Collagen-Fragmente über Integrin-vermittelte Signalwege den Abbau von FAK in Glattmuskelzellen induzieren können, der mit einer Disassemblierung der Fokalkontakte einhergeht. An diesen Abbauprozessen ist die Protease Calpain maßgeblich beteiligt (Carragher *et al.*, 2001, 2003). Ob Umbauvorgänge in der extrazellulären Matrix von Skelettmuskelzellen während der Differenzierung (Swadison und Mayne, 1992) ebenfalls einen Calpain-vermittelten Abbau von FAK bewirken, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Festzuhalten ist zunächst, dass die „klassischen“ Signaltransduktionskaskaden in den Fokalkontakten adhärenter Nichtmuskelzellen, die von der Aktivität von Tyrosin-Kinasen (z. B. FAK und Src) und des Adapterproteins Paxillin mitbestimmt werden, in Skelettmuskelzellen nur für frühe Differenzierungsstadien von Bedeutung sein können. Da die Umbauprozesse des Zytoskeletts und der dazugehörigen Zell-Matrix-Kontakte zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen sind, muss es also weitere, bisher noch unidentifizierte Signalwege geben, die die Dynamik der Zell-Matrix-Kontakte in späteren Differenzierungsstadien modulieren.

## 4.2 Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Paxillin-Liganden: Ponsin

### 4.2.1 Paxillin interagiert mit Ponsin in differenzierenden Skelettmuskelzellen

Um neue Signalwege in differenzierenden Muskelzellen zu entdecken, sollten darin involvierte Proteine identifiziert werden. Als Ausgangspunkt erschien es sinnvoll, neue Bindungspartner eines bekannten Fokalkontakt-Proteins im System „Muskel“ zu bestimmen. Für diesen Ansatz wurde das Protein Paxillin gewählt und mit Hilfe der Hefe-Doppel-Hybrid-Technik Ponsin als Bindungspartner identifiziert. Nachfolgende biochemische Experimente zeigten, dass die zweite SH3-Domäne im Carboxyterminus des Ponsins die Bindung an die Prolin-reiche Region im Aminoterminus des Paxillins vermittelt (Abb. 3.4 und Abb. 3.5).

Das Protein Ponsin wurde ursprünglich als Signalmolekül in Adipozyten beschrieben (Ribon *et al.*, 1998a). In diesem Zelltyp ist es an einem Phosphatidylinositol-3-Kinase-unabhängigen Weg zur Glucose-Aufnahme beteiligt. Als Antwort auf die Stimulierung mit Insulin wird in Adipozyten das Protein c-Cbl phosphoryliert und anschließend von Ponsin durch Interaktion mit dem Protein Flotillin zu den *lipid rafts* rekrutiert (Kimura *et al.*, 2001). Nachgeschaltete Prozesse, die u. a. die Aktivierung der Rho-GTPase TC10 beinhalten (Chiang *et al.*, 2001), führen zur Translokation des Glucose-Transporters GLUT4 an die Zellmembran, wodurch die Aufnahme von Glucose ins Zytoplasma ermöglicht wird (Baumann *et al.*, 2000).

Neuere Untersuchungen in Skelettmuskelzellen und -geweben weisen jedoch darauf hin, dass der beschriebene metabolische Weg nicht auf Muskelzellen übertragbar ist (JeBailey *et al.*, 2004; Thirone *et al.*, 2004). Vielmehr scheint Ponsin auch im Muskel Funktionen als Actin-Zytoskelett-assoziiertes Protein wahrzunehmen. Ähnliche Befunde wurden bereits für andere Zellsysteme beschrieben: So ist Ponsin ein Interaktionspartner von I-Afadin und Vinculin in der Leber und lokalisiert in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten verschiedener Zelllinien und Gewebe (Mandai *et al.*, 1999). Weiterhin wiesen stabil transfizierte Zellen, die Ponsin und den Insulin-Rezeptor gemeinsam (über-)exprimierten, eine verstärkte Ausbildung von Stressfasern und Fokalkontakten im Vergleich zu einer Zelllinie auf, die nur den Insulin-Rezeptor (über)-

exprimierte (Ribon *et al.*, 1998b).

Die identifizierte Interaktion zwischen Paxillin und Ponsin scheint ein transientes Ereignis während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen zu sein: Proliferierende HSkM-Zellen exprimieren Paxillin, nicht aber Ponsin (Abb. 3.13). Nach Induktion des myogenen Programmes setzt rasch die Expression des Ponsins ein und beide Proteine kolokalisieren in den verschiedenen Zell-Matrix-Kontakten, später auch in den Vorläuferstrukturen der Costamere. Das Verschwinden der FAK aus diesen Strukturen könnte den Beginn eines Umbauvorgangs markieren, in dessen Folge auch Paxillin aus den Zell-Matrix-Strukturen verschwindet (s. Abschnitt 4.1). Im adulten Gewebe ist Ponsin in den Costameren sowie den Glanzstreifen anzutreffen, während Paxillin in adulten quergestreiften Muskelzellen nicht mehr nachweisbar ist (Abb. 3.12).

Interessanterweise bindet Ponsin an die Prolin-reiche Region im Paxillin, die auch als Bindungsmodul für die Tyrosin-Kinase Src beschrieben wurde (Weng *et al.*, 1993). Die Rolle von Src bei der Differenzierung von Skelettmuskelzellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Während Claycomb und Lanson (1987) berichteten, dass Src in proliferierenden, nicht aber in differenzierenden Skelettmuskelzellen exprimiert wird, zeigten neuere Untersuchungen von Lu *et al.* (2002), dass die Inhibierung der Src-Aktivität in L6-Zellen die Differenzierung, insbesondere die Fusion der Myoblasten zu Myotuben, blockiert. Andererseits bewirkte die Expression der konstitutiv-aktiven Form v-Src eine Inhibierung der myogenen Differenzierung in C2C12-Zellen (Falcone *et al.*, 2003). Offensichtlich bedeutet dies, dass die Aktivität der Src-Kinase von differenzierenden Skelettmuskelzellen streng reguliert werden muss. Neben der Feinabstimmung der Kinaseaktivität durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse im Src-Molekül selbst, insbesondere am regulatorischen Tyrosin-Rest Y527 (Zheng *et al.*, 1992), kann die Verfügbarkeit von Substraten einen limitierenden Faktor darstellen. Möglicherweise wird dies durch die Bindung von Ponsin an die Src-Bindungsstelle im Paxillin bewirkt, das damit die Bindung der Src an Paxillin blockiert. Dies könnte zur Folge haben, dass die Src-Kinase Substrate in den Zell-Matrix-Strukturen differenzierender Skelettmuskelzellen nicht mehr phosphorylieren kann und dadurch andere Signalwege aktiviert werden, womit schließlich der Umbau der Zell-Matrix-Kontakte eingeleitet wird.

Infolge dieses Umbaus ist als eines der ersten Proteine FAK in diesen Strukturen nicht mehr nachweisbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die von Lin *et al.* (2001a)

beschriebene Interaktion der FAK mit Ponsin indirekter Natur ist und von Paxillin vermittelt wird. Es wurde gezeigt, dass die drei Proteine FAK, Paxillin und Ponsin einen ternären Komplex *in vitro* ausbilden können (Abb. 3.6). Die Anwesenheit von skelettmuskelspezifischen Ponsin-Isoformen in Proteinkomplexen der Zell-Matrix-Kontakte differenzierender Skelettmuskelzellen stellt einen wesentlichen Unterschied zu „klassischen“ Fokalkontakt-Komplexen dar und korreliert wahrscheinlich mit den speziellen Signaltransduktionsvorgängen während der Differenzierung. Da Ponsin über keine enzymatische Aktivität verfügt, ist anzunehmen, dass es als Adapterprotein fungiert und Signalmoleküle zu den sich im Umbau befindenden Zell-Matrix-Strukturen rekrutiert. Erst in späteren Stadien der Differenzierung, wenn sich reife Costamere ausbilden und Paxillin in den Strukturen nicht mehr vorkommt, scheint die niedrig-affine Interaktion von Ponsin mit Vinculin Bedeutung zu erlangen (Mandai *et al.*, 1999).

#### 4.2.2 Expression und Lokalisation von Ponsin in Muskelzellen

Für Transfektionsstudien war die Klonierung einer vollständigen Ponsin-cDNA Voraussetzung. Dazu wurde der carboxyterminale Teil des Ponsins aus einer Skelettmuskel-cDNA-Bibliothek amplifiziert und der Aminoterminus durch RT-PCR auf RNA, die aus differenzierenden HSkM-Zellen isoliert wurde, gewonnen. Die Sequenzierung entsprechender Klone ergab, dass Skelettmuskel-Varianten des Ponsin mehrere Exone enthalten, die als alternativ gespleißte Exone beschrieben wurden (Lin *et al.*, 2001b): Die Exone 3, 5, 7, 19, 20, 21, 25, 30 und 31 wurden in allen Ponsin-Varianten angetroffen. In einer Subpopulation der Klone waren zusätzlich die Exone 12 und 13 enthalten, während in keinem der Klone die Exone 14 oder 15 gefunden wurden (Tab. 3.1).

Über die Funktion der alternativ gespleißten Exone im Ponsin ist wenig bekannt. Die Primärsequenz des Exons 3 erlaubt keine Vorhersagen zu dessen Funktion; das Exon 5 ist mit neun Aminosäuren so kurz, dass zu vermuten ist, dass seine Anwesenheit flankierende Bereiche modifiziert. Im Exon 7 finden sich zwei Prolin-reiche Regionen (RPPTPLGP, Aminosäuren 178–185 und PPPPLVPPAP, Aminosäuren 243–252 in Abb. C.7), die putative Liganden für SH3- oder WW-Domänen darstellen (Kay *et al.*, 2000; Macias *et al.*, 2002). Untersuchungen von Zhang *et al.* (2003) deuteten darauf hin, dass dieses Modul an einer Homodimerisierung von Ponsin *in vitro* beteiligt ist und die Affinität zu Vinculin verringert. Daneben enthält Exon 7

vier SP-/TP-Motive, die potentielle Substrate für MAPK darstellen (Davis, 1993), aber keine Sequenz-Ähnlichkeit zu den identifizierten Phosphorylierungsstellen in Exon 30 aufweisen.

Die Exone 12 und 13 zeigen in ihrer Primärsequenz Ähnlichkeit zu Exon 16 und enthalten einen Teil der Region, die Homologie zum Peptid-Hormon Sorbin aufweist. Es ist denkbar, dass diese Exone durch Genduplikationen entstanden sind (Doolittle, 1995). Exon 19 ist dem Bereich des Proteins ArgBP2<sup>1</sup> homolog, der sich auch dort unmittelbar an die Sorbin-Homologie-Region anschließt. Ob und auf welche Weise die Anwesenheit dieser Exone die Funktion der Sorbin-Homologie-Region moduliert, ist unbekannt.

Die Exone 20 und 21 zeigen keine Homologie zu bekannten Proteinen. Da sie nicht in PCR-Produkten einer Herzmuskel-cDNA-Bibliothek gefunden wurden, könnten sie unbekannte, Skelettmuskel-spezifische Funktionen haben.

Obwohl das Exon 25 von mehreren Gruppen beschrieben wurde, besteht kein Konsens über sein Expressionmuster. Lebre *et al.* (2001) identifizierten eine Ponsin-Variante, die dieses Exon enthielt, in neuronalen (Purkinje)-Zellen; eine andere Gruppe fand dieses Modul in drei RT-PCR-Produkten des weißen Fettgewebes (Zhang *et al.*, 2003). Hingegen beschrieben Alcazar *et al.* (2004), dass die Expression des Exons 25 auf Herz- und Skelettmuskelgewebe beschränkt ist. Übereinstimmend sind die Vorhersagen zur Funktion aufgrund der Aminosäure-Sequenz: Durch die Anwesenheit des Exons 25 wird eine putative, zweiteilige Kernlokalisationssequenz (NLS) gebildet. Ausserdem gibt es Sequenzabschnitte, die zur Ausbildung von *coiled-coil* Strukturen geeignet scheinen. Ob diese Elemente funktionell sind, konnten die Untersuchungen der Arbeitsgruppen nicht abschließend klären.

Diese Arbeit konnte einen Beitrag dazu leisten, die Funktion der Exone 30 und 31 zu analysieren, die zusammen eine Insertion zwischen der zweiten und dritten SH3-Domäne bilden. Auf Eigenschaften und mögliche Funktionen dieser Region soll in einem gesonderten Abschnitt (4.2.3) eingegangen werden.

Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, dass Ponsin in adulten Muskelzellen in den Costameren lokalisiert, in Kardiomyozyten war das Protein zusätzlich in den Glanzstreifen anzutreffen (Abb. 3.12). Damit ist Ponsin in adulten Muskelgeweben in Strukturen lokalisiert, die die kontraktile Kraft auf die umgebende extrazelluläre Matrix bzw. auf benachbarte Kardiomyozyten

---

<sup>1</sup>Datenbankeintrag NM 003603

übertragen. In differenzierenden Skelettmuskelzellen lokalisiert das Protein in verschiedenen Zell-Matrix-Strukturen und markiert auch sich entwickelnde Vorläuferstrukturen der Costamere (Abb. 3.13).

Umfangreiche Transfektionsstudien in Nichtmuskel- und Muskel-Zellsystemen belegen (vgl. Abschnitt 3.2.5), dass der gesamte Carboxyterminus, welcher die drei SH3-Domänen enthält, für die beschriebenen Lokalisationen verantwortlich ist (Abb. 3.17). Keine der drei SH3-Domänen allein ist in der Lage, das Protein zu den Strukturen zu rekrutieren, dies wird erst durch das Zusammenspiel der drei Domänen erreicht (Tab. 3.2 und Tab. 3.3). Dabei scheint die carboxyterminale, Skelettmuskel-spezifische Insertion nur einen untergeordneten Beitrag zur Lokalisation zu leisten. Es ist zu vermuten, dass mehrere (schwache) Protein-Protein-Interaktionen, die von den individuellen SH3-Domänen zu Proteinen der Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Kontakte vermittelt werden, in Summe für die Lokalisation des Ponsins verantwortlich sind. Die Interaktion der zweiten SH3-Domäne mit Paxillin in differenzierenden Skelettmuskelzellen sowie mit Vinculin in adulten Muskelzellen (Mandai *et al.*, 1999) stellen Beispiele für solche Interaktionen dar. An der Rekrutierung des Ponsins zu Zell-Zell-Kontakten könnte die Wechselwirkung der dritten SH3-Domäne mit I-Afadin beteiligt sein (Mandai *et al.*, 1999). Für die erste SH3-Domäne des Ponsins wurden bis heute keine Bindungspartner identifiziert.

Der aminoternale Bereich des Ponsins, der die Sorbin-Homologie-Region enthält, ist nicht an der Lokalisation des Moleküls in Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Auch eine beschriebene Rekrutierung zu spezialisierten Bereichen der Zellmembran, den *lipid rafts* (Kimura *et al.*, 2001), wurde in den Transfektionsexperimenten dieser Arbeit nicht beobachtet. Es ist möglich, dass in der verwendeten Zelllinie (PtK2) *lipid raft* Strukturen nur wenig ausgeprägt sind oder die verwendete Fixierungsmethode für die Analyse membranassoziierter Strukturen ungeeignet ist. Die beobachtete Kernlokalisierung des Konstruktes 'Ps N-Ex25' könnte von der NLS im Exon 25 hervorgerufen werden, scheint aber für das vollständige Ponsin-Molekül keine Bedeutung zu haben (Abb. 3.17).

Experimente, bei denen Ponsin überexprimiert wurde, zeigten, dass die Sorbin-Homologie-Region eine Funktion im Ponsin-Protein haben muss. Wie das vollständige Ponsin-Protein übten alle Konstrukte, die neben dem Carboxyterminus auch die Sorbin-Homologie-Region enthielten, einen negativen Effekt auf Actin-assoziierte Zytoskelett-Strukturen aus (Abb. 3.17). Dosis-

abhängig veränderten sich zunächst Größe, Gestalt und Lage der Zell-Matrix-Strukturen. Bei stärkerer Überexpression wurden Stressfasern und Fokalkontakte zerstört und die Fokalkontakt-Proteine zu unregelmässigen Strukturen rekrutiert. Diese Resultate belegen, dass Ponsin eine wichtige Rolle für die Integrität der Zell-Matrix-Strukturen hat, wobei sowohl die Sorbin-Homologie-Region, als auch die drei carboxyterminalen SH3-Domänen bedeutsam sind. Untersuchungen in Adipozyten haben ebenfalls gezeigt, dass beide funktionellen Bereiche des Proteins, d. h. die Sorbin-Homologie-Region *und* die drei SH3-Domänen, notwendig sind, damit Signale übertragen werden können (Baumann *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2001).

### **4.2.3 Die Skelettmuskel-spezifische Insertion im Ponsin interagiert mit Nck2**

Die beiden alternativ gespleißten Exone 30 und 31 kodieren eine 278 Aminosäuren lange Insertion zwischen der zweiten und dritten SH3-Domäne im Carboxyterminus des Ponsins, wobei nur die letzten 20 Aminosäuren auf Exon 31 entfallen (Abb. 3.20). Expressionsdaten auf Nukleinsäure-Ebene deuten darauf hin, dass es sich bei der Insertion um ein Skelettmuskel-spezifisches Modul handelt (Abb. 3.9), das auch von differenzierenden HSkM-Zellen exprimiert wird (Abb. 3.14). Die Frage, ob die Insertion auch von Ponsin-Varianten im fötalen oder adulten Myokard exprimiert wird, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Diskrepanzen zu anderen veröffentlichten Daten bezüglich der Expression von Exon 30 und 31 im Skelettmuskel sind nicht erklärbar: Mehrere Gruppen haben die Klonierung von Ponsin-Varianten aus Skelettmuskel-Geweben beschrieben, die diese Kombination von Exon 30 und 31 nicht enthielten (Lin *et al.*, 2001a; Alcazar *et al.*, 2004). Als Bestätigung für die hier beschriebenen Befunde sind Northernblots zu bewerten, in denen Ponsin mRNA mit einer Größe von 7,5 kb im Skelettmuskel nachgewiesen wurde (Ribon *et al.*, 1998a; Mandai *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2001a), da dieser Wert hervorragend mit dem berechneten Wert (7,3 kb) übereinstimmt. In Nicht-Muskelgeweben wurden durch die gleichen Arbeitsgruppen kürzere Transkripte nachgewiesen (ca. 6 kb und kleiner), die Ponsin-Varianten ohne Insertion entsprechen könnten.



Die Insertion enthält eine Prolin-reiche Region, die von einem Cluster von SP-/TP-Motiven umgeben ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Prolin-reiche Region die Bindung an Nck2 vermittelt (Abb. 3.26 und Abb. 3.28).

Dass Nck2 ein Bindungspartner des Ponsins ist, wurde bereits von Cowan und Henkemeyer (2001) gezeigt. Diese Gruppe beschrieb jedoch ein PQQP-Motiv als Kern der Nck2-Bindungsstelle im Ponsin, welches im Übergang von der zweiten zur dritten SH3-Domäne liegt und von der hier beschriebenen Insertion unterbrochen wird. Die Bindung von Nck2 an diese weitere, wahrscheinlich niedrig-affine Bindungsstelle konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Es ist denkbar, dass die hier verwendeten Bindungsversuche nicht die nötige Empfindlichkeit aufwiesen. So musste beispielsweise die Sensitivität in den Hefe-Doppel-Hybrid-Experimenten durch den Zusatz von 3-AT herabgesetzt werden, um die Autoaktivierung des Köderkonstruktes zu unterdrücken.

Die hier gezeigte Interaktion der Prolin-reichen Region in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion des Ponsins mit Nck2 impliziert, dass die drei Proteine Paxillin, Ponsin und Nck2 einen transienten Proteinkomplex in den Zell-Matrix-Kontakten differenzierender Skelettmuskelzellen bilden, der am Umbau der Vorläuferstrukturen der Costamere während der Differenzierung beteiligt sein könnte.

Biochemische Untersuchungen verschiedener Gruppen ergaben, dass Nck2 und das verwandte Nck1 (Chen *et al.*, 1998) an der Regulation der Dynamik des Actin-Zytoskeletts beteiligt sind, indem sie Signale von Oberflächen-Rezeptoren (z. B. EGFR und PDGFR) zu Signalmolekülen, wie z. B. FAK, WASP oder PAK1, übertragen (zusammengefasst in Li *et al.*, 2001; Buday *et al.*, 2002). Tiermodelle belegen, dass das Zusammenspiel der beiden Proteine eine wichtige funktionelle Bedeutung *in vivo* hat. Die Inaktivierung von Nck1 oder Nck2 in Mäusen verursachte keine Anormalitäten, hingegen war ein doppelter *knock out* beider Gene letal, die Tiere starben während der Embryonalentwicklung (Bladt *et al.*, 2003).

Es ist bekannt, dass der Insulin-Rezeptor durch Stimulierung mit Insulin aktiviert wird und nachfolgend assoziierte Proteine, die sogenannten *insulin receptor substrates* (IRS), an Tyrosinresten phosphoryliert. Nck2 ist in der Lage, an IRS1 zu binden und könnte so Insulin-abhängige Signale weiterleiten (Lee *et al.*, 1993; Tu *et al.*, 2001). Daneben wurde beschrieben, dass Nck2 mit dem Protein PINCH interagiert (Tu *et al.*, 1998). Dieses LIM-Domänenprotein bindet an

*integrin linked kinase* (ILK), eine Serin-/Threonin-Kinase, deren Aktivität Signale in Antwort auf Integrin-vermittelte Zell-Adhäsions-Prozesse weiterleitet (Hannigan *et al.*, 1996; Tu *et al.*, 1999). Ein Komplex der Proteine Paxillin, Ponsin und Nck2 in den Zell-Matrix-Strukturen differenzierender Skelettmuskelzellen könnte demnach sowohl Insulin-abhängige als auch Integrin-vermittelte Signale weiterleiten und so einen Schnittpunkt mehrerer Signalwege darstellen.

In den Nck-Proteinen wird die Bindung der Src-Homologie-2-Domäne (SH2) an Oberflächenrezeptoren durch Phosphorylierungen an Tyrosin-Resten der Liganden kontrolliert (Mayer *et al.*, 1991). Weniger ist darüber bekannt, wie in diesen Proteinen die Bindung der SH3-Domänen an Effektor-Moleküle reguliert wird.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass vier SP-/TP-Motive in der Insertion des Ponsins prinzipiell *in vitro* von MAPK phosphoryliert werden (Abb. 3.22 und Abb. 3.24). Drei dieser putativen Phosphorylierungsstellen wurden auf Peptide eingegrenzt, die in unmittelbarer Nähe der Prolinreichen Region liegen, und die Phosphorylierung des Restes S69 der Insertion durch massenspektrometrische Analysen eindeutig belegt (Abb. 3.25).

Auch differenzierende HSkM-Zellen verfügen über Kinaseaktivität, die die Insertion im Ponsin phosphorylieren kann (Abb. 3.23). Durch zweidimensionale Gelelektrophorese wurde jedoch gezeigt, dass dabei nur ein und in geringen Anteilen auch ein zweites SP-/TP-Motiv phosphoryliert werden (Abb. 3.24). Folglich könnte die identifizierte Phosphorylierung auch während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen Relevanz haben, wobei die *in vivo* verantwortliche MAPK eine höhere Spezifität aufzuweisen und einer differenzierungsabhängigen Regulierung ihrer Aktivität zu unterliegen scheint.

In Westernblot-Overlay-Experimenten zeigte Nck2 eine deutlich verringerte Bindung an phosphorylierte Ponsin-Konstrukte, welche die Prolin-reiche Nck2-Bindungsregion enthielten (Abb. 3.28). Die Einführung negativer Ladungen durch Phosphorylierungsereignisse könnte eine elektrostatische Abstoßung zwischen den Bindungsregionen im Nck2 und Ponsin bewirken. Es ist weiterhin möglich, dass die Phosphorylierung der Insertion die Konformation dieser Ponsin-Region in der Art ändert, dass die Nck2-Bindungsstelle nicht mehr zugänglich ist.

Da in differenzierenden Skelettmuskelzellen ebenfalls Kinasen aktiv sind, die diese SP-/TP-Motive in der Umgebung der Prolin-reichen Region phosphorylieren (Abb. 3.23), und Nck2 und Ponsin in Zell-Matrix-Kontakten eine Kolokalisation aufweisen (Abb. 3.27), ist es denkbar,

dass die Interaktion von Nck2 und Ponsin in Vorläuferstrukturen der Costamere durch einen solchen Mechanismus moduliert wird. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Bindung von Nck2 an Ponsin auch in differenzierenden Skelettmuskelzellen durch MAPK-abhängige Phosphorylierungsereignisse reguliert werden könnte. Damit wird ein Mechanismus vorgeschlagen, der die Bindung von Nck2 an die Prolin-reiche Region eines Effektor-Moleküls kontrolliert.

Vinexin-beta, ein weiteres Mitglied der Ponsin-Protein-Familie, stellt ein Substrat für die MAPK ERK2 dar (Mitsushima *et al.*, 2004). In diesem Fall erfolgt die Phosphorylierung des Fokalkontakt-Proteins Vinexin-beta in Antwort auf die Aktivierung der ERK2, z. B. nach Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix. Dieses Phosphorylierungsereignis scheint möglicherweise an der Regulation von Umbau-Vorgängen des Actin-Zytoskeletts während der Ausbreitung von Zellen beteiligt zu sein. Interessant ist die Tatsache, dass sich die identifizierte Phosphorylierungsstelle im Vinexin-Molekül (S189) ebenfalls in einer Linker-Region zwischen der zweiten und der dritten SH3-Domäne befindet. Obwohl die Aminosäuresequenz dieser Linker-Region zwischen Vinexin-beta und Ponsin nicht konserviert ist, könnte es sich um eine funktionelle Konservierung innerhalb der Proteinfamilie handeln.

Für welche MAPK in differenzierenden Skelettmuskelzellen die Insertion des Ponsins ein potentiell Substrat darstellt, ist zum heutigen Zeitpunkt unbekannt. Neben der oben beschriebenen ERK2 ist auch die muskelspezifische ERK6 (auch SAPK3) ein Kandidat, deren Expression differenzierungsabhängig reguliert wird und die in differenzierenden Skelettmuskelzellen aktiv ist (Lechner *et al.*, 1996; Tortorella *et al.*, 2003). Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Hypothesen zu verifizieren.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Proteine Paxillin, Ponsin und Nck2 einen transienten Proteinkomplex während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen bilden können, der möglicherweise an der Detektion und Transduktion von Signalen in Zell-Matrix-Kontakten beteiligt ist. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass dieser Komplex an Umbauvorgängen in den Vorläuferstrukturen der Costamere beteiligt ist, wobei seine Aktivität von MAPK kontrolliert wird.

## **4.3 Die Anpassung von Zell-Matrix-Kontakten in adulten quergestreiften Muskelzellen: MLP im gesunden und erkrankten Muskelgewebe**

### **4.3.1 Die Rolle von mutierten MLP-Proteinen in Kardiomyopathien**

Die Bedeutung von Signaltransduktionsprozessen in den Zell-Matrix-Strukturen differenzierender Skelettmuskelzellen wurde in den vorherigen Abschnitten untersucht. Ein weiterer Teilaspekt dieser Arbeit war die Frage, wie sich die Strukturen der Kraftübertragung im adulten Muskelgewebe an veränderte Bedingungen anpassen können. Als Ausgangspunkt für diesen zweiten Ansatz dienten Befunde von Geier *et al.* (2003), die beschrieben, dass heterozygote Mutationen im MLP eine hypertrophe Kardiomyopathie beim Menschen auslösen können. Eine Analyse der mutierten Proteine sollte Aufschlüsse über die molekulare Pathogenese der Erkrankung geben.

In Transfektionsstudien waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Protein und den untersuchten mutierten MLP-Varianten zu beobachten (Abb. 3.29 und Abb. 3.30). Dies legt nahe, dass diese veränderten Proteine auch in den Patienten die Protein-Protein-Interaktionen eingehen können, die die Lokalisation des MLP vermitteln, sowie über eine ausreichende Stabilität verfügen, um in sarkomere Strukturen eingebaut zu werden. Protein-Aggregate, wie sie beispielsweise für Kardiomyopathie-assoziierte Desmin-Mutationen beschrieben wurden (Wang *et al.*, 2001), waren nicht zu beobachten. Weiterhin wiesen alle mutierten MLP-Proteine prinzipiell die Fähigkeit auf, den Liganden  $\alpha$ -Actinin zu binden (Abb. 3.31). Damit unterschieden sich die untersuchten Mutanten von der DCM-assoziierten MLP W4R Variante, in der die Missense-Mutation zu einem völligen Verlust der Fähigkeit führte, den Liganden Telethonin zu binden (Knöll *et al.*, 2002).

Die Interaktion mit  $\alpha$ -Actinin könnte für die Lokalisation des MLP mitverantwortlich sein. Die kritische Rolle von  $\alpha$ -Actinin für Muskelgewebe wurde durch Studien in Tiermodellen belegt (Fyrberg *et al.*, 1998; Dubreuil und Wang, 2000). Es ist anzunehmen, dass ein vollständiger Verlust der  $\alpha$ -Actinin-Bindung gravierende Auswirkungen hätte, die sich in einer frühen Manifestation der Krankheit äußern würden bzw. eventuell sogar letal in der Embryonalentwick-

lung wären. Da die Patienten jedoch erst im mittleren Alter Krankheitssymptome aufweisen (Geier *et al.*, 2003), ist eine dermaßen drastische Veränderung der Bindungseigenschaften auszuschließen, vielmehr scheinen weniger offensichtliche, quantitative Veränderungen die Erkrankung auszulösen.

Am Beispiel der MLP C58G Variante wurde eine eingehende biochemische Charakterisierung eines HCM-assoziierten Proteins durchgeführt. Durch den Austausch einer Zinkkoordinierenden Aminosäure im zweiten Zinkfinger der ersten LIM-Domäne ist dieses MLP-Protein nicht mehr in der Lage, die vier benötigten Zink-Ionen zu komplexieren, stattdessen werden nur noch drei Zink-Ionen gebunden (Abb. 3.32). Wie für mutierte Varianten des Zyxins gezeigt wurde, führt die fehlende Zink-Koordination im betroffenen Zinkfinger dazu, dass diese Region nicht mehr die native Tertiär-Struktur einnehmen kann (Schmeichel und Beckerle, 1997). Die betroffenen Bereiche sind instabiler und anfälliger für Proteolyse-Ereignisse, eine Eigenschaft, die für MLP C58G experimentell durch Behandlung mit der Protease Thermolysin belegt wurde (Abb. 3.33).

Die strukturelle Instabilität spiegelt sich auch im veränderten Bindungsverhalten des mutierten MLP-Proteins wider. Obwohl die beiden Liganden N-RAP und  $\alpha$ -Actinin distinkte Bindungsstellen auf dem MLP haben (Abb. 3.37) und die Bindungsstelle des  $\alpha$ -Actinins nicht direkt von der Mutation betroffen ist (Harper *et al.*, 2000; vgl. Abb. 1.8), zeigte MLP C58G im Vergleich zum Wildtyp-Protein verringerte Bindungen an beide Proteine (Abb. 3.34 und Abb. 3.36). Dies impliziert, dass die strukturellen Veränderungen über die eigentliche Region der Mutation hinausgehen und auch angrenzende Bereiche, z. B. die  $\alpha$ -Actinin-Bindungsstelle im Glycinreichen Abschnitt, betreffen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit durch Konkurrenzexperimente gezeigt, dass sowohl Wildtyp-MLP als auch die C58G-Variante einen ternären Komplex mit  $\alpha$ -Actinin und N-RAP bilden können (Abb. 3.37). Gleichzeitig wurde von anderen Gruppen vorgeschlagen, dass MLP – neben den Proteinen Telethonin und Titin – Bestandteil eines Mechanosensors sein könnte (Knöll *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2004). In der Tropomodulin-überexprimierenden Maus (Sussman *et al.*, 1998), einem genetischen Tiermodell für Kardiomyopathien, wurde eine verringerte Expression des MLP im Myokard festgestellt. Gleichzeitig wurde bei diesem Tier, wie auch bei der MLP *knock out* Maus (Arber *et al.*, 1997), ein erhöhter Expressionslevel des Li-

ganden N-RAP beobachtet (Ehler *et al.*, 2001). Ob diese verminderte Expression des MLP (im Fall der Tropomodulin-überexprimierenden Maus) sowie die Hochregulierung des N-RAP Antworten des postulierten Mechanosensors auf eine verstärkte mechanische Beanspruchung sind, bleibt bis zum heutigen Tag rein spekulativ.

Es ist denkbar, dass die Kardiomyozyten versuchen, die verringerte Stabilität des mutierten MLP-Proteins bzw. des Komplexes MLP –  $\alpha$ -Actinin – N-RAP durch eine gesteigerte Expression des Liganden N-RAP auszugleichen. Dieses veränderte Gleichgewicht könnte eine hypertrophe Antwort der Kardiomyozyten provozieren und schließlich zur Ausbildung der hypertrophen Kardiomyopathie führen.

In der jüngsten Literatur zeichnet sich ab, dass die hypertrophe Kardiomyopathie nicht als eine „Erkrankung des Sarkomers“ (zusammengefasst in Towbin, 1998), sondern als „Erkrankung infolge eines ineffizienten Energiehaushalts“ verstanden werden sollte (Blair *et al.*, 2001; Crilley *et al.*, 2003). Unter diesem Aspekt kann auch die Erkrankung infolge einer heterozygoten MLP C58G Mutation interpretiert werden: Ein instabiles, mutiertes MLP-Protein weist in den Kardiomyozyten wahrscheinlich einen höheren *turn over* auf, folglich werden die zellulären Maschinerien der Proteinsynthese und des Proteinabbaus stärker beansprucht. Für HCM-assoziierte Myosin-Bindungsprotein C Varianten wurde beispielsweise eine fast vollständige Auslastung des Proteasoms *in vitro* gezeigt (Sarikas *et al.*, 2004). Auch eine Kompensation der verringerten Bindung im ternären Komplex MLP –  $\alpha$ -Actinin – N-RAP durch verstärkte Expression eines Bindungspartners wäre mit einem erhöhten energetischen Aufwand verbunden.

#### **4.3.2 Potentielle Beteiligung von MLP an Herz- und Skelettmuskerkrankungen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der monoklonale MLP-Antikörper 79D2 charakterisiert, dessen zukünftiger Einsatz ein wertvolles Werkzeug bei der funktionellen Analyse des Proteins darstellen könnte.

Dieser Antikörper erkannte endogenes MLP im Myokard verschiedener Säugetiere sowie rekombinantes MLP-Protein im Westernblot und in der Immunpräzipitation, nicht aber CRP1 bzw. CRP2 (Abb. 3.40). Durch Westernblot-Analysen von MLP *knock out* Gewebe wurde die

Spezifität des Antikörpers für dieses Protein belegt.

Obwohl es bis jetzt nicht gelungen ist, den Antikörper für Immunfluoreszenz-Anwendungen zu optimieren, deuten die Befunde erster Färbungen darauf hin, dass die in der Literatur beschriebene Kernlokalisation des MLP und die damit verbundenen Funktionen (Arber *et al.*, 1994; Kong *et al.*, 1997) einer kritischen Revision bedürfen. MLP war in Westernblot-Analysen in proliferierenden und differenzierenden HSkM-Zellen nicht nachweisbar (Abb. 3.40). Stattdessen zeigte der Antikörper in diesen Proben eine Kreuzreaktion mit Proteinen höheren Molekulargewichts (um 60 kD). In Immunfluoreszenz-Analysen von differenzierenden HSKM-Zellen wurden ebenfalls deutliche Kernfärbungen beobachtet (Abb. 3.41). Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die beobachtete Kernlokalisation nicht durch MLP, sondern durch kreuzreaktive Proteine hervorgerufen wird. Eine Datenbank-Recherche ergab, dass es verschiedene nukleäre Proteine gibt, die mit dem Immunisierungspeptid in kurzen Sequenzabschnitten übereinstimmen (Tab. B.7). Da alle publizierten MLP-Antikörper polyklonale Seren sind, die durch Immunisierung mit der gleichen carboxyterminalen MLP-Region gewonnen wurden (Arber *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1999; Flick und Konieczny, 2000), ist davon auszugehen, dass sie vergleichbare Kreuzreaktivitäten aufweisen.

Unter diesem Aspekt sind auch die biochemischen Bindungsdaten mit dem Kernprotein MyoD kritisch zu bewerten (Kong *et al.*, 1997), da bereits von Arber und Caroni (1996) gezeigt wurde, dass die LIM-Domänen des MLP *in vitro* wenig spezifische Bindungsmodule darstellen. Gelegentlich beobachtete Kernlokalisationen von MLP-Proteinen in Transfektionsexperimenten sind ebenfalls wenig aussagekräftig, da rekombinante GFP-Fusionsproteine häufig diese unspezifische Lokalisation aufweisen.

Der neu generierte MLP-Antikörper wurde verwendet, um die Expression des Proteins in Myokardproben verschiedener Patienten-Kollektive zu analysieren (Abb. 3.42). In der Mehrheit der Myokardproben von DCM-Patienten war die MLP-Expression im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant reduziert, mit Ausnahme einer Probe wiesen alle DCM-Proben reduzierte MLP-Gehalte auf. Im Gegensatz dazu wurden in den HCM-Proben sowohl erhöhte als auch verringerte MLP-Gehalte gemessen, im Mittel war die MLP-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert.

Die drastische Reduzierung des MLP-Gehaltes in DCM-Herzen reproduziert frühere Daten von Zolk *et al.* (2000), wobei ebenfalls deutliche Schwankungen innerhalb der Kollektive vorliegen. Die Tatsache, dass die hypertrophe Kardiomyopathie nicht generell zur Reduzierung des MLP-Gehaltes auf Protein-Ebene führt, deutet darauf hin, dass sich die untersuchten HCM-Myokardproben prinzipiell von den analysierten DCM-Myokardproben unterscheiden. Das untersuchte DCM-Material stammte aus explantierten Herzen (mit systolischer Dysfunktion), es handelt sich also *per definitionem* um terminal-insuffizientes Myokard (NYHA-Klasse III und IV). Hingegen stammten die untersuchten HCM-Proben aus Myektomien, d. h. aus Geweben, die in den Patienten weiterhin – wenn auch mit eingeschränkter diastolischer Leistung – funktionstüchtig sind (NYHA-Klasse II und III; Spirito *et al.*, 1997; Seidman und Seidman, 2001). Zahlreiche Publikationen, in denen Mutationen von Proteinen in den Strukturen der Kraftübertragung als Auslöser dilatativer Kardiomyopathien identifiziert wurden, belegen, dass die Integrität dieser Strukturen Voraussetzung für ein gesundes Myokard ist (zusammengefasst in Seidman und Seidman, 2001; Perriard *et al.*, 2003). In den hier untersuchten DCM-Proben war auch der Gehalt an Ponsin, eines weiteren Proteins dieser Strukturen, signifikant verringert (Abb. 3.11). Folglich könnten Veränderungen in den Strukturen der Kraftübertragung, d. h. in den Costameren und den Glanzstreifen, das Erreichen des terminal-insuffizienten Stadiums markieren. Für die Glanzstreifen von DCM-Herzen wurden morphologische Veränderungen beschrieben, die mit Änderungen in der (quantitativen) Proteinzusammensetzung einhergehen (Ehler *et al.*, 2001). Ebenso scheint der Abbau des Proteins Dystrophin in den Costameren mit der terminalen Herzinsuffizienz zu korrelieren (Toyo-Oka *et al.*, 2004).

In diesem Zusammenhang erscheint es möglich, dass der MLP-Gehalt nicht von der Art der Erkrankung, sondern vom Status der Herzinsuffizienz bestimmt wird. Eine experimentelle Überprüfung dieser Hypothese war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da nur kleine Patienten-Kollektive zur Verfügung standen und über die einzelnen Patienten nur unzureichende Daten bezüglich kardialer Leistungsfähigkeit, Vorgeschichte, Krankheitsverlauf, genetischem Hintergrund, Medikation etc. zugänglich waren. Insbesondere die Verfügbarkeit von gesundem Myokard (Kontrollgruppe) ist naturgemäß limitiert. Weiterhin bedürfen die Probennahme und Konservierung einer Kollektiv-übergreifenden Standardisierung.

Im Gegensatz zu „makroskopischen“ Markern der systolischen Herzfunktion, wie z. B. der



Ejektionsfraktion oder des enddiastolische Durchmessers des linken Ventrikels (Cheitlin *et al.*, 2003), stellt die Integrität des Dystrophins einen molekularen Marker der terminalen Herzinsuffizienz dar. Diese Aussage stützt sich auf Untersuchungen, die belegen, dass Dystrophin im terminal-insuffizienten Myokard einem vermehrten Abbau am Aminoterminus unterliegt und in Immunfluoreszenz-Analysen terminal-insuffizienter Kardiomyozyten nicht mehr nachweisbar ist (Toyo-Oka *et al.*, 2004). Erste klinische Befunde haben gezeigt, dass der Rückgang von Spaltprodukten des Dystrophins ein geeigneter Marker ist, um den Therapieerfolg durch eine mechanische Unterstützung des Herzens zu verfolgen (Wallace *et al.*, 2004; Vatta *et al.*, 2004). Sollte sich für MLP eine ähnliche Markerprotein-Funktion bestätigen lassen, ist ein Einsatz des hier beschriebenen Antikörpers als diagnostisches Werkzeug bei der Beurteilung des Patientenstatus vorstellbar. Auch wenn beide Methoden durch die Verfügbarkeit geeigneten Probenmaterials limitiert sind, hätte die Quantifizierung des MLP im Vergleich zum Dystrophin den Vorteil, dass die Aussagen nicht von Proteolyse-Produkten abhängig wären, die durch unsachgemäße Probenbehandlung verfälscht werden können.

Während Untersuchungen im Tiermodell und am Menschen deutlich gemacht haben, dass die Funktionen des MLP für die Integrität des gesunden Myokards notwendig sind (Arber *et al.*, 1997; Knöll *et al.*, 2002; Geier *et al.*, 2003), ist die Bedeutung von MLP für die Skelettmuskulatur noch weitgehend unerforscht. Da MLP nur in langsamen Muskelfasertypen exprimiert wird (Schneider *et al.*, 1999), ist eine strukturelle Funktion in den Myotuben auszuschließen. Vielmehr kann man annehmen, dass das Protein regulatorische Funktionen in Teilen der Skelettmuskulatur hat. In der Beschreibung der MLP *knock out* Mäuse finden sich Hinweise auf einen Skelettmuskel-Phänotyp, der jedoch nicht näher analysiert wurde (Arber *et al.*, 1997).

Mit Hilfe des MLP-Antikörpers 79D2 wurde die Expression des Proteins in Skelettmuskelproben der *ky*-Maus, einem Tiermodell für Kyphoskoliose, untersucht (Abb. 3.43). Die erhöhte Expression des MLP war nicht auf den dystrophischen *M. soleus* beschränkt, sondern wurde auch im phänotypisch unauffälligen *M. tibialis anterior* nachgewiesen. Damit konnten nicht nur publizierte mRNA-Expressionsdaten bestätigt werden (Blanco *et al.*, 2004), darüber hinaus zeichnet sich eine Beteiligung von MLP an molekularen Umorganisationsprozessen infolge der Erkrankung ab.

Analysen von Marechal *et al.* (1996) ergaben, dass alle Muskeln der *ky*-Mäuse langsamere Myosin-Isoformen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen exprimieren. Auch in Muskeln von Ratten, in denen ein Übergang von schnellen zu langsamen Fasertypen durch mechanische Dauerbelastung erzwungen wurde, wurden erhöhte MLP-Expressionslevel detektiert (Willmann *et al.*, 2001).

In den beiden aufgeführten Fällen korrelieren erhöhte MLP-Gehalte im Gewebe mit langsameren Myosin-Isoformen. Es ist vorstellbar, dass MLP auch im Skelettmuskel als Teil eines Mechanosensors fungiert, der veränderte Situationen detektiert, z. B. Mutationen im *ky*-Protein (Blanco *et al.*, 2001) oder chronische mechanische Beanspruchung, und einen Umbau des Fasertyps einleitet, in dessen Folge sich langsamere Myosin-Isoformen durchsetzen. Es ist noch nicht klar, ob die erhöhte Expression des MLP als Startsignal für diesen Umbauprozess dient oder eine Folge des aktivierten Programms ist.

Zusammenfassend zeichnet sich ab, dass MLP auch im Skelettmuskel eine wichtige Rolle bei der Detektion und Weiterleitung von Signalen in den Strukturen der Kraftübertragung haben könnte, vielleicht sogar als Teil eines Mechanosensors fungiert.

## 4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen neue, interessante Fragen auf, die dazu beitragen könnten, das Verständnis über die Strukturen der Kraftübertragung in der quergestreiften Muskulatur zu erweitern:

Es wurde gezeigt, dass die Proteine FAK und Paxillin im Verlauf der Differenzierung aus den Zell-Matrix-Kontakten der Skelettmuskelzellen verschwinden. Es bleibt zu analysieren, welche Signale diesen Umbauvorgang einleiten und wie die Umbauprozesse zeitlich und räumlich koordiniert werden. Auch die Frage, ob Calpain am Abbau der Proteine beteiligt ist, bedarf experimenteller Klärung.

Für die Untersuchung von Umbauprozessen der Zell-Matrix-Kontakte in späten Stadien der Differenzierung stellen kultivierte HSkM-Zellen ein nur unzureichendes Modellsystem dar. Es wird ein Zellsystem benötigt, das *in vitro* so weit differenziert, dass reife Costamere ausgebildet

werden. Die Kultivierung der Zellen auf elastischen Substraten (beschrieben z. B. in Bischofs und Schwarz, 2003) kann einen Beitrag dazu leisten, da so die spontane Ablösung der Myotuben vom Substrat verhindert werden könnte. Auch die Eignung anderer Zell-Modelle, beispielsweise einer immortalisierten Myoblasten-Zelllinie, sollte getestet werden.

Mittlerweile stehen verschiedene Varianten des GFP-Proteins zur Verfügung, die es erlauben, die Dynamik von bis zu vier verschiedenen Proteinen in den Zell-Matrix-Kontakten lebender Zellen gleichzeitig zu beobachten (Zaidel-Bar *et al.*, 2003). Ein transfizierbares Skelettmuskelsystem ist Voraussetzung, um diese *live cell imaging* Technik anzuwenden. Bei der Auswahl geeigneter Zellen ist es lohnenswert, auch die Möglichkeiten viraler Transfektionssysteme zu überprüfen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Proteine Paxillin, Ponsin und Nck2 einen transienten Signalkomplex in differenzierenden Skelettmuskelzellen bilden. Die Bindung von Nck2 an Ponsin wird dabei möglicherweise durch die Aktivität von MAPK reguliert. Die Identifizierung von Proteinkinasen, die an diesen Phosphorylierungsvorgängen *in vivo* beteiligt sind, können zum Verständnis der Signalwege beitragen. Um die Konsequenzen der beschriebenen Signaltransduktionsprozesse für die Differenzierung von Skelettmuskelzellen zu verstehen, sollten gezielte Blockierungen bzw. Aktivierungen einzelner Signalwege durchgeführt werden. Dabei können neben chemischen Substanzen *small interfering* RNAs zum Einsatz kommen, welche die Expression individueller Signalmoleküle gezielt hemmen (Elbashir *et al.*, 2001). Auch die Verwendung konstitutiv-aktiver bzw. dominant-negativer MAPK ist denkbar, um ausgewählte Signalwege gezielt zu aktivieren bzw. zu hemmen und *down stream* gelegene Substrate zu identifizieren.

Ein Themenkomplex, der im Rahmen dieser Arbeit nur ansatzweise bearbeitet werden konnte, ist die Frage, welche Funktionen Ponsin im Myokard wahrnimmt. Zunächst ist zu analysieren, welche Isoformen im Herzen exprimiert werden. Dabei können neben Northernblot-Experimenten Isoform-spezifische Antikörper Aussagen zur Expression und Lokalisation liefern. Interessant ist auch die Frage, welche Bedeutung das Protein für die dilatative bzw. hypertrophe Kardiomyopathie hat.

Im Fall des MLP ist besonders die Frage interessant, ob im Myokard von MLP C58G Patienten der Abbau von MLP-Proteinen nachweisbar ist und die Bindungspartner  $\alpha$ -Actinin und N-RAP veränderte Expressionsmuster aufweisen. Da die Verfügbarkeit von Patientenmaterial limitiert ist, kann ein Tiermodell (*knock in*) für diese Untersuchungen in Erwägung gezogen werden.

Falls es gelingt, den hier beschriebenen MLP-Antikörper für Immunfluoreszenz-Anwendungen zu optimieren, kann mit einer genauen Analyse der subzellulären Lokalisation des Proteins in gesunden und erkrankten Muskelgeweben begonnen werden.

Eine noch ungeklärte Fragestellung in der Kardiologie ist, warum sich bei einigen Patienten durch mechanische Herzunterstützung (z. B. durch *left ventricular assist devices*; LVAD) eine deutliche, lang anhaltende Verbesserung der kardialen Leistungsfähigkeit erzielen lässt, während andere Patienten auf diese Therapie nicht ansprechen (Mancini *et al.*, 1998). Zum heutigen Zeitpunkt sind keine Parameter bekannt, die die Prognose eines Therapieerfolges durch LVAD-Unterstützung erlauben. Es ist denkbar, dass die Integrität eines MLP-assoziierten Mechanosensor Voraussetzung für die Erholung des Myokards unter LVAD-Unterstützung sein könnte. Um diese Hypothese zu testen, sollte beispielsweise überprüft werden, ob die MLP-Expression vor LVAD-Einbau bzw. zum Zeitpunkt des LVAD-Ausbaus mit der Erholung der Patienten-Herzen korreliert.

Weiterhin deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass MLP auch an Erkrankungen des Skelettmuskels beteiligt sein könnte. Damit stellt das Protein ein Kandidaten-Gen für familiäre Myopathien ungeklärter genetischer Ursache dar.

Um die Funktion von MLP in der Skelettmuskulatur eingehender zu beleuchten, sollte der postulierte Zusammenhang zwischen MLP-Expression und Umorganisation hin zu langsameren Fasertypen untersucht werden. Beispielsweise stellt sich die Frage, ob MLP *knock out* Tiere in der Lage sind, Fasertypen an mechanische Dauerbelastung anzupassen. Auch die Analyse anderer Tiermodelle für Skelettmuskel-Erkrankungen (zusammengefasst z. B. in Agbulut *et al.*, 2004) kann Aufschluss über die Funktionen von MLP in der Skelettmuskulatur geben.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

In der quergestreiften Muskulatur wird die Kontraktionskraft der Myofibrillen von spezialisierten Zell-Matrix-Kontakten (z. B. den Costameren) und Zell-Zell-Kontakten (den Glanzstreifen der Kardiomyozyten) auf die umgebende extrazelluläre Matrix bzw. auf benachbarte Zellen übertragen. Genetische Erkrankungen der Skelett- und Herzmuskulatur sowie Untersuchungen an Tiermodellen deuten darauf hin, dass diese Strukturen auch Orte der Detektion und Weiterleitung von Signalen sind.

Ziel dieser Arbeit war es, Signalwege in den Strukturen der Kraftübertragung zu identifizieren. Dazu wurden zwei Ansätze gewählt: Zum einen sollte die Entwicklung der Costamere während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen und darin involvierte Signalwege beschrieben werden. Zum anderen sollten Anpassungsvorgänge der Strukturen der Kraftübertragung an veränderte Situationen, z. B. bei Erkrankungen, in der adulten quergestreiften Muskulatur untersucht werden.

Ausgehend von der Hypothese, dass die Costamere in ihrer prinzipiellen Proteinzusammensetzung den Fokalkontakten von Nichtmuskelzellen ähneln, wurden Immunfluoreszenz-Analysen kultivierter Skelettmuskelzellen verschiedener Differenzierungsstadien durchgeführt. Damit konnte die morphologische Variabilität der Zell-Matrix-Kontakte erfasst werden: Neben Strukturen, die den Fokalkontakten von Nichtmuskelzellen entsprachen, wurden kleine, unregelmäßig geformte Zell-Matrix-Kontakte und *primary longitudinal adhesion sites* (PLAS) beobachtet. Auch wurde deutlich, dass die Costamere erst mit Einsetzen der Kontraktilität aus PLAS-artigen Strukturen hervorgehen.

Während der Differenzierung waren auch dramatische Veränderungen in der Proteinzusammensetzung zu beobachten: Die Ausstattung der Zell-Matrix-Kontakte proliferierender Myoblasten entsprach weitgehend der von Nichtmuskelzellen. Nach Induktion des myogenen Programms wurde sie durch die Expression muskelspezifischer Proteine bzw. Isoformen (z. B. Ponsin und  $\beta$ 1D-Integrin) ergänzt. Bereits kurz nach Beginn der Differenzierung waren typische Fokalkontakt-Marker, insbesondere die *focal adhesion kinase* (FAK) und an Tyrosin-Resten phosphorylierte Proteine, nicht mehr nachweisbar.

Damit deutet sich an, dass Tyrosin-Kinasen-abhängige Signalwege, welche die Dynamik der Fokalkontakte in Nichtmuskelzellen bestimmen, nur für frühe Differenzierungsstadien der Muskelzellen von Bedeutung sind. Auch *lipid raft* vermittelte Signalwege scheinen nur eine untergeordnete Rolle bei der Entwicklung der Costamere zu spielen.

Um andere, noch unbekannte Signalwege während der Differenzierung zu entdecken, sollten involvierte Signalmoleküle identifiziert werden. Dafür erschien es sinnvoll, nach muskelspezifischen Liganden eines klassischen Fokalkontaktproteins, des Paxillins, zu suchen. Mit Hilfe der Hefe-Doppel-Hybrid-Technik wurde Ponsin als Interaktionspartner identifiziert. Durch biochemische Bindungsversuche wurde die Paxillin-Bindungsregion im Ponsin auf die zweite der drei Src-Homologie-3-Domänen (SH3) eingegrenzt. Expressionsstudien belegten, dass die Interaktion der beiden Proteine in den Vorläuferstrukturen der Costamere ein transientes Ereignis während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen darstellt.

Im Skelettmuskel scheinen bisher noch nicht beschriebene Spleiß-Isoformen des Ponsins zu dominieren, die sich durch eine 278 Aminosäuren lange Insertion im carboxyterminalen Teil auszeichnen. Transfektionsstudien in Nichtmuskel- und Muskelsystemen konnten zeigen, dass nicht diese Insertion, sondern das Zusammenspiel der drei SH3-Domänen für die subzellulären Lokalisationen in Costameren und Glanzstreifen verantwortlich ist, so dass zu vermuten ist, dass die Insertion regulatorische Funktionen besitzt. Im aminoterminalen Bereich der Insertion wurden multiple Phosphorylierungsereignisse an SP- und TP-Motiven durch *mitogen activated protein kinases* (MAPK) nachgewiesen und Serin69 der Insertion massenspektrometrisch als die bevorzugte Phosphorylierungsstelle identifiziert. Diese Proteinkinaseaktivität konnte in differenzierenden Skelettmuskelzellen ebenfalls nachgewiesen werden.

Der gleiche Abschnitt der Insertion enthält ein Protein-Bindungsmodul, das die Bindung an das Adapterprotein Nck2 vermittelt. In biochemischen Bindungsversuchen zeigte Nck2 deut-

lich verringerte Bindung an Ponsin-Fragmente, die zuvor mit MAPK inkubiert wurden.

Zusammenfassend wird daher vorgeschlagen, dass die Proteine Paxillin, Ponsin und Nck2 einen transienten Signalkomplex in den Vorläuferstrukturen der Costamere bilden, dessen Aktivität von MAPK kontrolliert wird. Dieser Komplex könnte an den beobachteten Umstrukturierungsprozessen der Zell-Matrix-Kontakte und des assoziierten Zytoskelettes während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen beteiligt sein.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle des *muscle LIM protein* (MLP) im gesunden und erkrankten adulten Gewebe. Für dieses muskelspezifische Protein wurde u. a. eine costamerische Lokalisation beschrieben (Flick und Konieczny, 2000) und vorgeschlagen, dass es als Komponente eines Mechanosensor den Dehnungszustand der Kardiomyozyten detektiert (Knöll *et al.*, 2002). Vor kurzem wurde gezeigt, dass heterozygote Mutationen im MLP Herzmuskelerkrankungen, d. h. dilatative bzw. hypertrophe Kardiomyopathien (DCM bzw. HCM), auslösen können (Knöll *et al.*, 2002; Geier *et al.*, 2003). Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Unterschiede zwischen den HCM-assoziierten mutierten Proteinen und dem Wildtyp-MLP aufzuzeigen.

Alle mutierten MLP-Proteine wurden in sarkomere Strukturen eingebaut und verfügten über die Fähigkeit, den Liganden  $\alpha$ -Actinin zu binden. Bei der detaillierten biochemischen Analyse des MLP C58G Proteins wurde jedoch deutlich, dass die Mutation verstärkt zu Fehlfaltungen und damit zu einer verringerten Stabilität des betroffenen Abschnittes führt. Dies wurde auch durch das veränderte Bindungsverhalten des mutierten Proteins zu den Liganden  $\alpha$ -Actinin und N-RAP reflektiert. Die molekulare Grundlage für die HCM-Erkrankung scheint folglich eine Veränderung der Homöostase im ternären Komplex MLP –  $\alpha$ -Actinin – N-RAP zu sein.

Mit Hilfe eines neu entwickelten monoklonalen MLP-Antikörpers ließ sich die Expression des Proteins in solchen DCM- und HCM-Patienten analysieren, deren Erkrankung nicht durch eine Mutation im MLP ausgelöst wurde. Die Tatsache, dass der MLP-Gehalt in den HCM-Patientenkollektiven nicht generell erniedrigt ist, deutet darauf hin, dass die verminderte Expression des Proteins in DCM-Patienten nicht mit der Erkrankung an sich, sondern mit dem Voranschreiten der Herzinsuffizienz korrelieren könnte.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Funktionen des MLP auch für die Integrität der Skelettmuskulatur notwendig sind. Beispielsweise wurde eine veränderte Expression des Proteins in Skelettmuskel-Proben der *ky*-Maus, eines Tiermodelles für Kyphoskoliose, beobachtet.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit verdeutlichen, dass die Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte der quergestreiften Muskelzellen nicht nur als statische Strukturen der Kraftübertragung zu verstehen sind, sie stellen darüber hinaus Orte der Detektion und Weiterleitung von Signalen dar. Die exemplarische Untersuchung der Proteine Ponsin und MLP belegt, dass in diesen Strukturen verschiedenste Signalwege konvergieren, deren Zusammenspiel für die Funktionen der Herz- und Skelettmuskulatur Voraussetzung ist. Störungen in einzelnen Komponenten, z. B. durch Gen-Mutationen, provozieren eine Reaktion des gesamten Signalnetzes, woraus u. a. Erkrankungen – beispielsweise Kardiomyopathien – resultieren können.



# Literaturverzeichnis

- Agbulut, O., Noirez, P., Butler-Browne, G., and Jockusch, H. (2004). Specific isomyosin proportions in hyperexcitable and physiologically denervated mouse muscle. *FEBS Lett.*, **561**(1-3), 191–194.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (2002). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing Inc., New York and London.
- Alcazar, O., Ho, R. C., Fujii, N., and Goodyear, L. J. (2004). cDNA cloning and functional characterization of a novel splice variant of c-Cbl-associated protein from mouse skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**(1), 285–293.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**(17), 3389–3402.
- Aquila, L. A., McCarthy, P. M., Smedira, N. G., Young, J. B., and Moravec, C. S. (2004). Cytoskeletal structure and recovery in single human cardiac myocytes. *J Heart Lung Transplant.*, **23**(8), 954–963.
- Arber, S. and Caroni, P. (1996). Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev.*, **10**(3), 289–300.
- Arber, S., Halder, G., and Caroni, P. (1994). Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell*, **79**(2), 221–231.
- Arber, S., Hunter, J. J., Ross, J., Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., Perriard, J. C., Chien, K. R., and Caroni, P. (1997). MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*, **88**(3), 393–403.
- Archer, V. E., Breton, J., Sanchez-Garcia, I., Osada, H., Forster, A., Thomson, A. J., and Rabbitts, T. H. (1994). Cysteine-rich LIM domains of LIM-homeodomain and LIM-only proteins contain zinc but not iron. *Proc Natl Acad Sci*, **91**(1), 316–320.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York.

- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R., and Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, **14**(6), 920–924.
- Baumann, C. A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P. E., Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*, **407**(6801), 202–207.
- Baumann, O. (2004). Spatial pattern of nonmuscle myosin-II distribution during the development of the *Drosophila* compound eye and implications for retinal morphogenesis. *Developmental Biology*, **269**(2), 519–533.
- Bershadsky, A. D., Balaban, N. Q., and Geiger, B. (2003). Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 677–695.
- Bickel, P. E. (2002). Lipid rafts and insulin signaling. *Am. J Physiol Endocrinol Metab*, **282**(1), E1–E10.
- Biggar, W. D., Klamut, H. J., Demacio, P. C., Stevens, D. J., and Ray, P. N. (2002). Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. *Clin. Orthop.*, **401**, 88–106.
- Bischofs, I. B. and Schwarz, U. S. (2003). Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci*, **100**(16), 9274–9279.
- Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G. A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F. B., and Pawson, T. (2003). The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol. Cell. Biol.*, **23**(13), 4586–4597.
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., Salmon, A., Ostman-Smith, I., and Watkins, H. (2001). Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum. Mol Genet.*, **10**(11), 1215–1220.
- Blanco, G., Coulton, G. R., Biggin, A., Grainge, C., Moss, J., Barrett, M., Berquin, A., Marchal, G., Skynner, M., Van Mier, P., Nikitopoulou, A., Kraus, M., Ponting, C. P., Mason, R. M., and Brown, S. D. (2001). The kyphoscoliosis (*ky*) mouse is deficient in hypertrophic responses and is caused by a mutation in a novel muscle-specific protein. *Hum. Mol Genet.*, **10**(1), 9–16.
- Blanco, G., Pritchard, C., Underhill, P., Breeds, S., Townsend, K. M., Greenfield, A., and Brown, S. D. (2004). Molecular phenotyping of the mouse *ky* mutant reveals UCP1 upregulation at the neuromuscular junctions of dystrophic soleus muscle. *Neuromuscul. Disord.*, **14**(3), 217–228.
- 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.

- Brancaccio, M., Guazzone, S., Menini, N., Sibona, E., Hirsch, E., DeAndrea, M., Rocchi, M., Altruda, F., Tarone, G., and Silengo, L. (1999). Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.*, **274**(41), 29282–29288.
- Bridges, L. R., Coulton, G. R., Howard, G., Moss, J., and Mason, R. M. (1992). The neuromuscular basis of hereditary kyphoscoliosis in the mouse. *Muscle Nerve*, **15**(2), 172–179.
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, **234**(2), 177–186.
- Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P. (2002). The Nck family of adapter proteins: Regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal.*, **14**(9), 723–731.
- Bushby, K. M. (1999). The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum. Mol Genet.*, **8**(10), 1875–1882.
- Byers, T. J., Kunkel, L. M., and Watkins, S. C. (1991). The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol*, **115**(2), 411–421.
- Campellone, K. G., Rankin, S., Pawson, T., Kirschner, M. W., Tipper, D. J., and Leong, J. M. (2004). Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. *J Cell Biol*, **164**(3), 407–416.
- Carlsson, L. and Thornell, L. E. (2001). Desmin-related myopathies in mice and man. *Acta Physiol Scand.*, **171**(3), 341–348.
- Carragher, N. O., Levkau, B., Ross, R., and Raines, E. W. (1999). Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin. *J Cell Biol.*, **147**(3), 619–630.
- Carragher, N. O., Fincham, V. J., Riley, D., and Frame, M. C. (2001). Cleavage of focal adhesion kinase by different proteases during Src-regulated transformation and apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. *J. Biol. Chem.*, **276**(6), 4270–4275.
- Carragher, N. O., Westhoff, M. A., Fincham, V. J., Schaller, M. D., and Frame, M. C. (2003). A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42-ERK and Src. *Curr. Biol.*, **13**(16), 1442–1450.
- Carroll, S. L., Herrera, A. H., and Horowitz, R. (2001). Targeting and functional role of N-RAP, a nebulin-related LIM protein, during myofibril assembly in cultured chick cardiomyocytes. *J. Cell Sci.*, **114**(23), 4229–4238.
- Charge, S. B. and Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.*, **84**(1), 209–238.
- Cheitlin, M. D., Armstrong, W. F., Aurigemma, G. P., Beller, G. A., Bierman, F. Z., Davis, J. L., Douglas, P. S., Faxon, D. P., Gillam, L. D., Kimball, T. R., Kussmaul, W. G., Pearlman, A. S.,

- Philbrick, J. T., Rakowski, H., Thys, D. M., Antman, E. M., Smith, S. C., Alpert, J. S., Gregoratos, G., Anderson, J. L., Hiratzka, L. F., Faxon, D. P., Hunt, S. A., Fuster, V., Jacobs, A. K., Gibbons, R. J., and Russell, R. O. (2003). ACC/AHA/ASE 2003 guideline update for the clinical application of echocardiography: summary article. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to update the 1997 guidelines for the clinical application of echocardiography). *J Am. Soc. Echocardiogr.*, **16**(10), 1091–1110.
- Chen, M., She, H., Davis, E. M., Spicer, C. M., Kim, L., Ren, R., Beau, M. M. L., and Li, W. (1998). Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity. *J Biol. Chem.*, **273**(39), 25171–25178.
- Chiang, S. H., Baumann, C. A., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Watson, R. T., Neudauer, C. L., Macara, I. G., Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. (2001). Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, **410**(6831), 944–948.
- Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C., and Gregorio, C. C. (2002a). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **18**, 637–706.
- Clark, P., Dunn, G. A., Knibbs, A., and Peckham, M. (2002b). Alignment of myoblasts on ultrafine gratings inhibits fusion in vitro. *Int. J Biochem Cell Biol.*, **34**(7), 816–825.
- Claycomb, W. C. and Lanson, N. A. (1987). Proto-oncogene expression in proliferating and differentiating cardiac and skeletal muscle. *Biochem J*, **247**(3), 701–706.
- Clontech (2000). *Yeast Protocols Handbook*. Clontech Laboratories, Palo Alto.
- Cowan, C. A. and Henkemeyer, M. (2001). The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature*, **413**(6852), 174–179.
- Crilley, J. G., Boehm, E. A., Blair, E., Rajagopalan, B., Blamire, A. M., Styles, P., McKenna, W. J., Ostman-Smith, I., Clarke, K., and Watkins, H. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am. Coll. Cardiol.*, **41**(10), 1776–1782.
- Critchley, D. R. (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**(1), 133–139.
- Danowski, B. A., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J. M., and Sanger, J. W. (1992). Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J. Cell Biol.*, **118**(6), 1411–1420.
- Davis, R. J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.*, **268**(20), 14553–14556.

- Doolittle, R. F. (1995). The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 287–314.
- Dubreuil, R. R. and Wang, P. (2000). Genetic analysis of the requirements for  $\alpha$ -actinin function. *J Muscle Res. Cell Motil.*, **21**(7), 705–713.
- Ehler, E., Horowitz, R., Zuppinger, C., Price, R. L., Perriard, E., Leu, M., Caroni, P., Sussman, M., Eppenberger, H. M., and Perriard, J. C. (2001). Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J. Cell Biol.*, **153**(4), 763–772.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**(6836), 494–498.
- Elliott, P. and McKenna, W. J. (2004). Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*, **363**(9424), 1881–1891.
- Erpel, T., Superti-Furga, G., and Courtneidge, S. A. (1995). Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions. *EMBO J*, **14**(5), 963–975.
- Ervasti, J. M. (2003). Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem.*, **278**(16), 13591–13594.
- Falcone, G., Ciuffini, L., Gauzzi, M. C., Provenzano, C., Strano, S., Gallo, R., Castellani, L., and Alema, S. (2003). v-Src inhibits myogenic differentiation by interfering with the regulatory network of muscle-specific transcriptional activators at multiple levels. *Oncogene*, **22**(51), 8302–8315.
- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**(6230), 245–246.
- Flick, M. J. and Konieczny, S. F. (2000). The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of betaI-spectrin. *J. Cell Sci.*, **113**(9), 1553–1564.
- Freeman, K., Colon-Rivera, C., Olsson, M. C., Moore, R. L., Weinberger, H. D., Grupp, I. L., Vikstrom, K. L., Iaccarino, G., Koch, W. J., and Leinwand, L. A. (2001). Progression from hypertrophic to dilated cardiomyopathy in mice that express a mutant myosin transgene. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol.*, **280**(1), H151–H159.
- Freshney, R. I. (2000). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*. John Wiley and Sons, New York.
- Frischmeyer, P. A. and Dietz, H. C. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol Genet.*, **8**(10), 1893–1900.

- 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.
- Fürst, D. O., Osborn, M., and Weber, K. (1989). Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *J Cell Biol*, **109**(2), 517–527.
- 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.
- Ganote, C. E. and Heide, R. S. V. (1987). Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study. *Am. J Pathol.*, **129**(2), 327–344.
- Geier, C., Perrot, A., Özcelik, C., Binner, P., Counsell, D., Hoffmann, K., Pilz, B., Martiniak, Y., Gehmlich, K., Van der Ven, P. F., Fürst, D. O., Vornwald, A., Von Hodenberg, E., Nürnberg, P., Scheffold, T., Dietz, R., and Osterziel, K. J. (2003). Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, **107**(10), 1390–1395.
- Geiger, B. and Bershadsky, A. (2002). Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*, **110**(2), 139–142.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol Cell Biol*, **2**(11), 793–805.
- Goldfarb, L. G., Vicart, P., Goebel, H. H., and Dalakas, M. C. (2004). Desmin myopathy. *Brain*, **127**(4), 723–734.
- Grove, B. K., Kurer, V., Lehner, C., Doetschman, T. C., Perriard, J. C., and Eppenberger, H. M. (1984). A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J Cell Biol.*, **98**(2), 518–524.
- Grubbs, F. E. (1969). Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, **11**, 1–21.
- Hagel, M., George, E. L., Kim, A., Tamimi, R., Opitz, S. L., Turner, C. E., Imamoto, A., and Thomas, S. M. (2002). The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol. Cell Biol.*, **22**(3), 901–915.
- Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C., and Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*, **379**(6560), 91–96.

- Harper, B. D., Beckerle, M. C., and Pomies, P. (2000). Fine mapping of the  $\alpha$ -actinin binding site within cysteine-rich protein. *Biochem J*, **350**(1), 269–274.
- Hayashi, Y. K., Chou, F. L., Engvall, E., Ogawa, M., Matsuda, C., Hirabayashi, S., Yokochi, K., Ziober, B. L., Kramer, R. H., Kaufman, S. J., Ozawa, E., Goto, Y., Nonaka, I., Tsukahara, T., Wang, J. Z., Hoffman, E. P., and Arahata, K. (1998). Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat. Genet.*, **19**(1), 94–97.
- Hemler, M. E. (1998). Integrin associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol*, **10**(5), 578–585.
- Hengen, P. H. (1997). Methods and reagents: False positives from the yeast two-hybrid system. *Trends in Biochemical Sciences*, **22**(1), 33–34.
- Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., and Parsons, J. T. (1995). Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol. Cell*, **6**(6), 637–647.
- Hinz, B. and Gabbiani, G. (2003). Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**(5), 538–546.
- Holt, M. R., Critchley, D. R., and Brindle, N. P. (1998). The focal adhesion phosphoprotein VASP. *Int. J Biochem Cell Biol*, **30**(3), 307–311.
- Hughes, S. E. (2004). The pathology of hypertrophic cardiomyopathy. *Histopathology*, **44**(5), 412–427.
- Huxley, A. F. and Niedergerke, R. (1954). Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, **173**(4412), 971–973.
- 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.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, **377**(6549), 539–544.
- JeBailey, L., Rudich, A., Huang, X., Ciano-Oliveira, C. D., Kapus, A., and Klip, A. (2004). Skeletal muscle cells and adipocytes differ in their reliance on TC10 and rac for insulin-induced actin remodeling. *Mol Endocrinol*, **18**(2), 359–372.
- Kay, B. K., Williamson, M. P., and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J*, **14**(2), 231–241.
- Kempa, S. (2001). *Identifizierung und Charakterisierung der Wechselwirkungen von spezifischen Bindungspartnern des M-Bandenproteins Myomesin*. Diplomarbeit, Universität Potsdam.

- Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**(5517), 495–497.
- Kimura, A., Baumann, C. A., Chiang, S. H., and Saltiel, A. R. (2001). The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci*, **98**(16), 9098–9103.
- Kioka, N., Sakata, S., Kawauchi, T., Amachi, T., Akiyama, S. K., Okazaki, K., Yaen, C., Yamada, K. M., and Aota, S. (1999). Vinexin: A novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.*, **144**(1), 59–69.
- Kioka, N., Ueda, K., and Amachi, T. (2002). Vinexin, CAP/ponsin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction. *Cell Struct. Funct.*, **27**(1), 1–7.
- Knöll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H. M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M. L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., McKenna, W., Yokoyama, M., Schork, N. J., Omens, J. H., McCulloch, A. D., Kimura, A., Gregorio, C. C., Poller, W., Schaper, J., Schultheiss, H. P., and Chien, K. R. (2002). The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a z-disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, **111**(7), 943–955.
- Kong, Y., Flick, M. J., Kudla, A. J., and Konieczny, S. F. (1997). Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol. Cell Biol.*, **17**(8), 4750–4760.
- Kreis, T. E. and Birchmeier, W. (1980). Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell*, **22**(2), 555–561.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(259), 680–685.
- Lange, S., Auerbach, D., McLoughlin, P., Perriard, E., Schafer, B. W., Perriard, J. C., and Ehler, E. (2002). Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci*, **115**(24), 4925–4936.
- Lebre, A. S., Jamot, L., Takahashi, J., Spassky, N., Leprince, C., Ravise, N., Zander, C., Fujigasaki, H., Kussel-Andermann, P., Duyckaerts, C., Camonis, J. H., and Brice, A. (2001). Ataxin-7 interacts with a Cbl-associated protein that it recruits into neuronal intranuclear inclusions. *Hum. Mol Genet.*, **10**(11), 1201–1213.
- Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Moller, N. P., and Ullrich, A. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci*, **93**(9), 4355–4359.
- Lee, C. H., Li, W., Nishimura, R., Zhou, M., Batzer, A. G., Myers, M. G., White, M. F., Schlessinger, J., and Skolnik, E. Y. (1993). Nck associates with the SH2 domain-docking protein IRS-1 in insulin-stimulated cells. *Proc Natl Acad Sci*, **90**(24), 11713–11717.



- Leonhardt, H. (1990). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Li, W., Fan, J., and Woodley, D. T. (2001). Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene*, **20**(44), 6403–6417.
- Lin, W. H., Huang, C. J., Liu, M. W., Chang, H. M., Chen, Y. J., Tai, T. Y., and Chuang, L. M. (2001a). Cloning, mapping, and characterization of the human sorbin and SH3 domain containing 1 (SORBS1) gene: a protein associated with c-Abl during insulin signaling in the hepatoma cell line Hep3B. *Genomics*, **74**(1), 12–20.
- Lin, W. H., Chiu, K. C., Chang, H. M., Lee, K. C., Tai, T. Y., and Chuang, L. M. (2001b). Molecular scanning of the human sorbin and SH3-domain-containing-1 (SORBS1) gene: positive association of the T228A polymorphism with obesity and type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.*, **10**(17), 1753–1760.
- Louis, H. A., Pino, J. D., Schmeichel, K. L., Pomies, 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.
- Lu, H., Shah, P., Ennis, D., Shinder, G., Sap, J., Le-Tien, H., and Fantus, I. G. (2002). The differentiation of skeletal muscle cells involves a protein-tyrosine phosphatase- $\alpha$ -mediated c-Src signaling pathway. *J Biol. Chem.*, **277**(48), 46687–46695.
- Lymn, R. W. and Taylor, E. W. (1971). Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry*, **10**(25), 4617–4624.
- Macias, M. J., Wiesner, S., and Sudol, M. (2002). WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett.*, **513**(1), 30–37.
- Mancini, D. M., Beniaminovitz, A., Levin, H., Catanese, K., Flannery, M., DiTullio, M., Savin, S., Cordisco, M. E., Rose, E., and Oz, M. (1998). Low incidence of myocardial recovery after left ventricular assist device implantation in patients with chronic heart failure. *Circulation*, **98**(22), 2383–2389.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A., and Takai, Y. (1999). Ponsin/SH3P12: an I-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J. Cell Biol.*, **144**(5), 1001–1017.
- Marechal, G., Beckers-Bleukx, G., Berquin, A., and Coulton, G. (1996). Isoforms of myosin in growing muscles of ky (kyphoscoliotic) mice. *Eur. J. Biochem.*, **241**(3), 916–922.
- Marian, A. J. (2000). Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*, **355**(9197), 58–60.

- Maron, B. J., Gardin, J. M., Flack, J. M., Gidding, S. S., Kurosaki, T. T., and Bild, D. E. (1995). Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation*, **92**(4), 785–789.
- Mason, R. M. and Palfrey, A. J. (1984). Intervertebral disc degeneration in adult mice with hereditary kyphoscoliosis. *J Orthop. Res.*, **2**(4), 333–338.
- Masuda, T., Fujimaki, N., Ozawa, E., and Ishikawa, H. (1992). Confocal laser microscopy of dystrophin localization in guinea pig skeletal muscle fibers. *J Cell Biol*, **119**(3), 543–548.
- Mayans, O., Van der Ven, P. F., Wilm, M., Mues, A., Young, P., Fürst, D. O., Wilmanns, M., and Gautel, M. (1998). Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*, **395**(6705), 863–869.
- Mayans, O., Wuerges, J., Canela, S., Gautel, M., and Wilmanns, M. (2001). Structural evidence for a possible role of reversible disulphide bridge formation in the elasticity of the muscle protein titin. *Structure*, **9**(4), 331–340.
- Mayer, B. J., Jackson, P. K., and Baltimore, D. (1991). The noncatalytic Src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc Natl Acad Sci*, **88**(2), 627–631.
- Mayer, U. (2003). Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *J Biol Chem.*, **278**(17), 14587–14590.
- Mayer, U., Saher, G., Fässler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., Von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E., and Von der Mark, K. (1997). Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat. Genet.*, **17**(3), 318–323.
- Michelsen, J. W., Schmeichel, K. L., Beckerle, M. C., and Winge, D. R. (1993). The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc Natl Acad Sci*, **90**(10), 4404–4408.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Miller, M. K., Granzier, H., Ehler, E., and Gregorio, C. C. (2004). The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends Cell Biol*, **14**(3), 119–126.
- Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F. D., Lisanti, M. P., and Zara, F. (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.*, **18**(4), 365–368.
- Mitsushima, M., Suwa, A., Amachi, T., Ueda, K., and Kioka, N. (2004). Extracellular signal-regulated kinase activated by epidermal growth factor and cell adhesion interacts with and phosphorylates vinexin. *J Biol. Chem.*, **279**(33), 34570–34577.

- Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., and Kunkel, L. M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, **323**(6089), 646–650.
- Musacchio, A. (2002). How SH3 domains recognize proline. *Adv. Protein Chem.*, **61**, 211–268.
- Nigro, V. (2003). Molecular bases of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Acta Myol.*, **22**(2), 35–42.
- Nikolopoulos, S. N. and Turner, C. E. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J. Biol. Chem.*, **276**(26), 23499–23505.
- 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., Gautel, M., Weber, K., and Fürst, D. O. (1997). Molecular structure of the sarcomeric M-band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO J.*, **16**(2), 211–220.
- O’Farrell, P. Z., Goodman, H. M., and O’Farrell, P. H. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, **12**(4), 1133–1141.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption-coefficient of a protein. *Protein Science*, **4**(11), 2411–2423.
- Pacholsky, D. (2003). *Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte während der Muskelentwicklung*. Dissertation, Universität Potsdam.
- Pardo, J. V., Siliciano, J. D., and Craig, S. W. (1983). A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements (“costameres”) mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci*, **80**(4), 1008–1012.
- Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, **116**(8), 1409–1416.
- Perez-Alvarado, G. C., Miles, C., Michelsen, J. W., Louis, H. A., Winge, D. R., Beckerle, M. C., and Summers, M. F. (1994). Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. *Nat. Struct. Biol.*, **1**(6), 388–398.
- Perriard, J. C., Hirschy, A., and Ehler, E. (2003). Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc. Med.*, **13**(1), 30–38.
- Rao, J. S., Beach, R. L., and Festoff, B. W. (1985). Extracellular matrix (ECM) synthesis in muscle cell cultures: quantitative and qualitative studies during myogenesis. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **130**(1), 440–446.

- Renfranz, P. J. and Beckerle, M. C. (2002). Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Curr. Opin. Cell Biol*, **14**(1), 88–103.
- Ribon, V., Printen, J. A., Hoffman, N. G., Kay, B. K., and Saltiel, A. R. (1998a). A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol.*, **18**(2), 872–879.
- Ribon, V., Herrera, R., Kay, B. K., and Saltiel, A. R. (1998b). A role for CAP, a novel, multi-functional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *J. Biol. Chem.*, **273**(7), 4073–4080.
- Rupp, P. A. and Little, C. D. (2001). Integrins in vascular development. *Circ. Res.*, **89**(7), 566–572.
- Sachs, L. (1984). *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag, Berlin.
- Salgia, R., Li, J. L., Lo, S. H., Brunkhorst, B., Kansas, G. S., Sobhany, E. S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T., Tantravahi, R., Chen, L. B., and Griffin, J. D. (1995). Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J. Biol. Chem.*, **270**(10), 5039–5047.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sangiorgi, M. (2003). Clinical and epidemiological aspects of cardiomyopathies: a critical review of current knowledge. *Eur J Intern. Med.*, **14**(1), 5–17.
- Sarikas, A., Carrier, L., Schenke, C., Eschenhagen, T., and Zolk, O. (2004). Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway by mutant cardiac myosin binding protein C. *Eur J Cell Biol.*, **83**(Suppl. 54), 99. Posterbeitrag anlässlich der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie.
- Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B., and Parsons, J. T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci*, **89**(11), 5192–5196.
- Schaller, M. D., Borgman, C. A., and Parsons, J. T. (1993). Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol Cell Biol.*, **13**(2), 785–791.
- Schägger, H. and Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 368–379.
- Schmeichel, K. L. and Beckerle, M. C. (1997). Molecular dissection of a LIM domain. *Mol Biol. Cell*, **8**(2), 219–230.

- Schmidt, A. and Hall, M. N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**, 305–338.
- Schneider, A. G., Sultan, K. R., and Pette, D. (1999). Muscle LIM protein: expressed in slow muscle and induced in fast muscle by enhanced contractile activity. *Am. J Physiol.*, **276**(4), C900–C906.
- Schröder, R., Fürst, D. O., Klasen, C., Reimann, J., Herrmann, H., and Van der Ven, P. F. (2000). Association of plectin with Z-discs is a prerequisite for the formation of the intermyofibrillar desmin cytoskeleton. *Lab Invest.*, **80**(4), 455–464.
- Schröder, R., Pacholsky, D., Reimann, J., Matten, J., Wiche, G., Fürst, D. O., and Van der Ven, P. F. (2002). Primary longitudinal adhesion structures: plectin-containing precursors of costameres in differentiating human skeletal muscle cells. *Histochem. Cell Biol.*, **118**(4), 301–310.
- Seidman, J. G. and Seidman, C. (2001). The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*, **104**(4), 557–567.
- Sharp, W. W., Simpson, D. G., Borg, T. K., Samarel, A. M., and Terracio, L. (1997). Mechanical forces regulate focal adhesion and costamere assembly in cardiac myocytes. *Am. J Physiol.*, **273**(2), H546–H556.
- Shen, Y., Schneider, G., Cloutier, J. F., Veillette, A., and Schaller, M. D. (1998). Direct association of protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST with paxillin. *J. Biol. Chem.*, **273**(11), 6474–6481.
- Small, J. V., Zobeley, S., Rinnerthaler, G., and Faulstich, H. (1988). Coumarin-phalloidin: a new actin probe permitting triple immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton. *J Cell Sci.*, **89**(1), 21–24.
- Small, J. V., Fürst, D. O., and Thornell, L. E. (1992). The cytoskeletal lattice of muscle cells. *Eur J Biochem.*, **208**(3), 559–572.
- Spirito, P., Seidman, C. E., McKenna, W. J., and Maron, B. J. (1997). The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl. J Med.*, **336**(11), 775–785.
- Steenbergen, C., Hill, M. L., and Jennings, R. B. (1987). Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circ. Res.*, **60**(4), 478–486.
- 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.
- Stupack, D. G. and Cheresch, D. A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci.*, **115**(19), 3729–3738.

- Sussman, M. A., Welch, S., Cambon, N., Klevitsky, R., Hewett, T. E., Price, R., Witt, S. A., and Kimball, T. R. (1998). Myofibril degeneration caused by tropomodulin overexpression leads to dilated cardiomyopathy in juvenile mice. *J Clin. Invest*, **101**(1), 51–61.
- Swadison, S. and Mayne, R. (1992). Formation of highly organized skeletal muscle fibers in vitro. Comparison with muscle development in vivo. *J Cell Sci*, **102**(3), 643–652.
- Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H. P., Seidman, J. G., and Seidman, C. E. (1994). Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell*, **77**(5), 701–712.
- Thirone, A. C., Carvalheira, J. B., Hirata, A. E., Velloso, L. A., and Saad, M. J. (2004). Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. *Endocrinology*, **145**(1), 281–293.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**(22), 4673–4680.
- 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 sarco-glycan interacting protein. *J Cell Biol*, **148**(1), 115–126.
- Tortorella, L. L., Lin, C. B., and Pilch, P. F. (2003). ERK6 is expressed in a developmentally regulated manner in rodent skeletal muscle. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **306**(1), 163–168.
- Towbin, J. A. (1998). The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr. Opin. Cell Biol*, **10**(1), 131–139.
- Toyo-Oka, T., Kawada, T., Nakata, J., Xie, H., Urabe, M., Masui, F., Ebisawa, T., Tezuka, A., Iwasawa, K., Nakajima, T., Uehara, Y., Kumagai, H., Kostin, S., Schaper, J., Nakazawa, M., and Ozawa, K. (2004). Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci*, **101**(19), 7381–7385.
- Tu, Y., Li, F., and Wu, C. (1998). Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways. *Mol Biol. Cell*, **9**(12), 3367–3382.
- Tu, Y., Li, F., Goicoechea, S., and Wu, C. (1999). The LIM-Only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(3), 2425–2434.
- Tu, Y., Liang, L., Frank, S. J., and Wu, C. (2001). Src homology 3 domain-dependent interaction of Nck-2 with insulin receptor substrate-1. *Biochem J*, **354**(2), 315–322.

- Tumbarello, D. A., Brown, M. C., and Turner, C. E. (2002). The paxillin LD motifs. *FEBS Lett.*, **513**(1), 114–118.
- Turner, C. E. (2000). Paxillin interactions. *J Cell Sci*, **113**(23), 4139–4140.
- Turner, C. E. and Miller, J. T. (1994). Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125FAK-binding region. *J Cell Sci*, **107**(6), 1583–1591.
- Turner, C. E., Glenney, J. R., and Burridge, K. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.*, **111**(3), 1059–1068.
- Van der Flier, A., Gaspar, A. C., Thorsteinsdottir, S., Baudoin, C., Groeneveld, E., Mummery, C. L., and Sonnenberg, A. (1997). Spatial and temporal expression of the  $\beta$ 1D-integrin during mouse development. *Dev. Dyn.*, **210**(4), 472–486.
- Van der Loop, F. T., Van der Ven, P. F., Fürst, D. O., Gautel, M., Van Eys, G. J., and Ramaekers, F. C. (1996). Integration of titin into the sarcomeres of cultured differentiating human skeletal muscle cells. *Eur J Cell Biol.*, **69**(4), 301–307.
- Van der Ven, P. F. (2001). Skeletal muscle. In M. R. Koller, B. O. Palsson, and J. R. W. Masters, editors, *Human Cell Culture Vol V*, chapter 5, 65–101. Kluwer Academic Publishers.
- Van der Ven, P. F., Schaart, G., Jap, P. H., Sengers, R. C., Stadhouders, A. M., and Ramaekers, F. C. (1992). Differentiation of human skeletal muscle cells in culture: maturation as indicated by titin and desmin striation. *Cell Tissue Res.*, **270**(1), 189–198.
- Van der Ven, P. F., Schaart, G., Croes, H. J., Jap, P. H., Ginsel, L. A., and Ramaekers, F. C. (1993). Titin aggregates associated with intermediate filaments align along stress fiber-like structures during human skeletal muscle cell differentiation. *J. Cell Sci.*, **106**(3), 749–759.
- 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.
- Vatta, M., Stetson, S. J., Jimenez, S., Entman, M. L., Noon, G. P., Bowles, N. E., Towbin, J. A., and Torre-Amione, G. (2004). Molecular normalization of dystrophin in the failing left and right ventricle of patients treated with either pulsatile or continuous flow-type ventricular assist devices. *J Am. Coll. Cardiol.*, **43**(5), 811–817.
- 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.
- Wallace, C. K., Koerner, M. M., Thohan, V., Loebe, M., Lafuente, J., Noon, G. P., and Torre-Amione, G. (2004). The response of the failing heart to chronic mechanical unloading. *Curr. Opin. Cardiol.*, **19**(3), 270–277.

- Wang, X., Osinska, H., Dorn, G. W., Nieman, M., Lorenz, J. N., Gerdes, A. M., Witt, S., Kimball, T., Gulick, J., and Robbins, J. (2001). Mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Circulation*, **103**(19), 2402–2407.
- 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.
- Weng, Z., Taylor, J. A., Turner, C. E., Brugge, J. S., and Seidel-Dugan, C. (1993). Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **268**(20), 14956–14963.
- Willmann, R., Kusch, J., Sultan, K. R., Schneider, A. G., and Pette, D. (2001). Muscle LIM protein is upregulated in fast skeletal muscle during transition toward slower phenotypes. *Am. J Physiol Cell Physiol*, **280**(2), C273–C279.
- World Health Organization (1996). Report of the 1995 world health organization/international society and federation of cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*, **93**(5), 841–842.
- 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.
- Zachary, I. (1997). Focal adhesion kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**(7), 929–934.
- Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci*, **116**(22), 4605–4613.
- Zajchowski, L. D. and Robbins, S. M. (2002). Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem*, **269**(3), 737–752.
- Zamir, E. and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, **114**(20), 3583–3590.
- Zamir, E., Katz, B. Z., Aota, S., Yamada, K. M., Geiger, B., and Kam, Z. (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, **112**(11), 1655–1669.
- Zhang, M., Kimura, A., and Saltiel, A. R. (2003). Cloning and characterization of Cbl-associated protein splicing isoforms. *Mol. Med.*, **9**(1–2), 18–25.
- Zheng, X. M., Wang, Y., and Pallen, C. J. (1992). Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature*, **359**(6393), 336–339.
- Zolk, O., Caroni, P., and Böhm, M. (2000). Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation*, **101**(23), 2674–2677.



# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Aminotriazol	ESI	Elektrospray-Ionisierung
β-ME	β-Mercaptoethanol	EST	expressed sequence tag (engl.)
ADP	Adenosindiphosphat	Ex	Exon
ATP	Adenosintriphosphat	FAK	focal adhesion kinase (engl.)
BP	Bandpassfilter	FCS	Fötale Kälberserum
BSA	Rinderserumalbumin	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
cDNA	kompletäre DNA	FRNK	FAK-related non-kinase (engl.)
Ci	Curie	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
CPITC	Coumarin-phenyl-isothiocyanat	GFP	green fluorescent protein (engl.)
CRP	cysteine rich protein (engl.)	GSH	Glutathion
Cy2	Carbocyanin	GST	Glutathion-S-Transferase
Cy3	Indocarbocyanin	GuHCl	Guanidin-Hydrochlorid
DCM	dilatative Kardiomyopathie	HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure	His6	Hexa-Histidin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (engl.)	HPLC	Hochleistungschromatographie
DMF	N,N-Dimethylformamid	HRPO	Meerrettich-Peroxidase
DMSO	Dimethylsulfoxid	HskM	humane Skelettmuskel Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ICP-AES	Induktiv-gekoppeltes-Plasma Atom-Emissions-Spektroskopie
DOB	drop out base (engl.)	IF	Immunfluoreszenz
DTT	Dithiothreitol	Ig	Immunglobulin
ECACC	European collection of animal cell cultures (engl.)	ILK	integrin linked kinase (engl.)
ECL	enhanced chemiluminescence (engl.)	IP	Immunpräzipitation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure	IRS	insulin receptor substrate (engl.)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (engl.)	kb	Kilobasenpaare
		kD	Kilodalton
		Ktr	Kontrolle
		LGMD	Gliedergürtelmuskeldystrophie

LVAD	left ventricular assist device (engl.)	PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
LP	Langpassfilter	PBS	phosphate buffered saline (engl.)
M	mol/l	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
mAB	monoklonaler Antikörper	PEG	Polyethylenglycol
MALDI-TOF	matrix-assisted-laser-desorption- ionization time-of-flight (engl.)	PLAS	primary longitudinal adhesion sites (engl.)
MAPK	mitogen-activated protein kinase (engl.)	PRR	Prolin-reiche Region
MLP	muscle LIM protein (engl.)	Ps	Ponsin
mRNA	messenger RNA (engl.)	Pxn	Paxillin
NC	Nitrozellulose	RNA	Ribonukleinsäure
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren	rpm	Umdrehungen pro Minute
NEPHGE	non-equilibrium-pH-gradient electrophoresis (engl.)	RT	Raumtemperatur
NGS	normales Ziegen Serum	RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
NLS	Kernlokalisationssequenz	SDS	Natriumdodecylsulfat
NP-40	Nonidet P-40	SH3	Src-Homologie 3
NTA	Nitritotriessigsäure	SkM	Skelettmuskel
N-RAP	nebulin-related anchoring protein (engl.)	SoHo	Sorbin-Homologie-Region
NRC	neonatale Rattenkardiomyozyten	SoV	Natriumorthovanadat
NYHA	New York Heart Association (engl.)	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
OD	optische Dichte	TXR	Texas-Rot
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galakto- pyranosid	U	unit (engl.)
PAA	Polyacrylamid	ÜNK	Übernachtkultur
		UTR	untranslatierte Region
		WB	Western Blot
		WT	Wildtyp
		X-Gal	5-Brom-4-Chlor-indoxyl- $\beta$ -D- galaktosid
		Y2H	Hefe-Doppel-Hybrid

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau des Sarkomers . . . . .	2
1.2	Das Actin-Zytoskelett von Nichtmuskelzellen . . . . .	5
1.3	Schematischer Aufbau von Fokalkontakten . . . . .	6
1.4	Lokalisation von Costameren im Muskel . . . . .	8
1.5	Schematische Darstellung der Glanzstreifen . . . . .	9
1.6	Morphologische Veränderungen des Herzens bei HCM und DCM . . . . .	12
1.7	Schematische Darstellung des Proteins Paxillin . . . . .	15
1.8	Schematische Darstellung des Proteins MLP . . . . .	16
3.1	Zeitliche Expressionsmuster von Fokalkontakt-Komponenten während der Differenzierung von HSkM-Zellen. . . . .	43
3.2	Lokalisation von Costamer-Markern und FAK in differenzierenden HSkM-Zellen und adultem Gewebe . . . . .	45
3.3	Eingrenzung der Paxillin-Bindungsstelle im Carboxyterminus des Ponsins . . . . .	49
3.4	Bestätigung der Paxillin-Ponsin-Interaktion . . . . .	51
3.5	Spezifität der Paxillin-Ponsin-Interaktion . . . . .	51
3.6	Kompetition von FRNK und Ponsin um Paxillin . . . . .	53
3.7	Klonierungsschema . . . . .	55
3.8	Genomische Organisation des Ponsins . . . . .	56
3.9	Expression der Exone 30 und 31 in verschiedenen Muskel-Geweben . . . . .	57
3.10	Expression endogenen Ponsins in Muskelextrakten . . . . .	59
3.11	Expression von Ponsin im Myokard von DCM-Patienten . . . . .	60
3.12	Lokalisation von Ponsin in adulten quergestreiften Muskelgeweben der Ratte . . . . .	63
3.13	Lokalisation von Ponsin und Paxillin in differenzierenden HSkM-Zellen . . . . .	64
3.14	Expression der Skelettmuskel-spezifischen Insertion in HSkM-Zellen . . . . .	66
3.15	Transfektion von Ponsin, Paxillin und FAK in PtK2-Zellen . . . . .	68
3.16	Transfektion carboxyterminaler Ponsin-Konstrukte in PtK2-Zellen . . . . .	71
3.17	Transfektion amino- und carboxyterminaler Konstrukte sowie vollständigen Ponsins in PtK2-Zellen . . . . .	74
3.18	Überexpression des vollständigen Ponsins in C2C12-Myotuben . . . . .	77
3.19	Expression von Ponsin-GFP-Fusionsprotein in neonatalen Rattenkardiomyozyten . . . . .	78

3.20	Aminosäuresequenz der Skelettmuskel-spezifischen Insertion . . . . .	79
3.21	SP- und TP-Motive in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion . . . . .	80
3.22	<i>In vitro</i> Phosphorylierung rekombinanter Ponsin-Proteine . . . . .	81
3.23	<i>In vitro</i> Phosphorylierung der Insertion durch HSkM-Zellextrakte . . . . .	82
3.24	Zweidimensionale Gelelektrophorese von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Ponsin-Protein . . . . .	83
3.25	Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in der Skelettmuskel-spezifischen Insertion . . . . .	85
3.26	Gezielte Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente mit Nck2 und Ponsin . . . . .	87
3.27	Transfektion von Nck2 und Ponsin in PtK2-Zellen . . . . .	89
3.28	Bindung von Nck2 an die Insertion im Ponsin . . . . .	90
3.29	Transfektion von MLP-Proteinen in PtK2-Zellen . . . . .	93
3.30	Transfektion von MLP-Proteinen in Kardiomyozyten . . . . .	94
3.31	Überprüfung der CRP/MLP-Proteine auf $\alpha$ -Actinin Bindung . . . . .	95
3.32	Zinkbindungskapazität von MLP WT und C58G . . . . .	96
3.33	Proteasebehandlung von Wildtyp und mutiertem MLP . . . . .	97
3.34	Gezielte Hefe-Doppel-Hybrid-Experimente mit MLP und $\alpha$ -Actinin . . . . .	98
3.35	Konstrukte für biochemische Bindungsversuche . . . . .	99
3.36	Dot blot-Overlay-Experimente . . . . .	100
3.37	Koimmunpräzipitationsexperimente . . . . .	101
3.38	Sequenzalignment von CRP1, CRP2 und MLP . . . . .	102
3.39	Testung verschiedener Kulturüberstände im Westernblot . . . . .	103
3.40	Charakterisierung des MLP-Antikörpers 79D2 . . . . .	104
3.41	Kreuzreaktivität des mAB 79D2 mit nukleären Proteinen . . . . .	105
3.42	MLP-Expression im Myokard von DCM- und HCM-Patienten . . . . .	107
3.43	Veränderte MLP-Expression in Skelettmuskelproben der <i>ky</i> -Maus . . . . .	109
B.1	Schematische Darstellung verwendeter FAK-, Paxillin- und Ponsin-Konstrukte . . . . .	XXIII
C.1	Sequenz des humanen $\alpha$ -Actinin 2 . . . . .	XXX
C.2	Sequenz der humanen FAK . . . . .	XXXII
C.3	Sequenz des humanen MLP . . . . .	XXXIV
C.4	Sequenz des humanen Nck2 . . . . .	XXXV
C.5	Sequenz des humanen N-RAP . . . . .	XXXVI
C.6	Sequenz des humanen Paxillins . . . . .	XXXVIII
C.7	Sequenz des humanen Ponsins . . . . .	XXXIX
E.1	Vektorkarte pET23aEEF . . . . .	XLV
E.2	Vektorkarte pET23aT7 . . . . .	XLVI
E.3	Vektorkarte pLexPd . . . . .	XLVII
E.4	Vektorkarte pMypT7 . . . . .	XLVIII
E.5	Vektorkarte pMypG . . . . .	XLIX

# Tabellenverzeichnis

1.1	Charakteristika verschiedener Typen von Fokalkontakten . . . . .	7
1.2	Identifizierte Krankheitsgene der HCM und DCM . . . . .	13
2.1	Geräte . . . . .	18
2.2	Eigenschaften der Bakterien- und Hefe-Stämme . . . . .	19
2.3	Zelllinien und Primärkulturen . . . . .	20
2.4	Eigenschaften der verwendeten Plasmide . . . . .	20
2.5	cDNA-Bibliotheken . . . . .	21
2.6	Kulturmedien für die Molekularbiologie . . . . .	21
2.7	Kulturmedien für die Zellkultur . . . . .	21
2.8	Antibiotika . . . . .	22
3.1	Alternativ gespleißte Exone in klonierten Ponsin-cDNAs . . . . .	57
3.2	Transfektion carboxyterminaler Ponsin-Konstrukte in PtK2-Zellen . . . . .	70
3.3	Transfektion amino- und carboxyterminaler Konstrukte sowie des vollständigen Ponsins in PtK2-Zellen . . . . .	73
B.1	Primäre Antikörper . . . . .	XXIV
B.2	Sekundäre Antikörper . . . . .	XXV
B.3	Filtersätze des verwendeten Photomikroskops . . . . .	XXV
B.4	Identifizierte Hefe-Doppel-Hybrid-Klone . . . . .	XXVI
B.5	Expression von $\alpha$ -Actinin, MLP und Ponsin in Myokardproben . . . . .	XXVII
B.6	Datenbankeinträge für die Skelettmuskel-spezifische Insertion des Ponsins . . . . .	XXVIII
B.7	Datenbankeinträge für Proteine, die Homologien zu MLP aufweisen . . . . .	XXVIII
D.1	Oligonukleotide . . . . .	XLII

# **Anhang B**

## **Ergänzende Tabellen und Abbildungen**

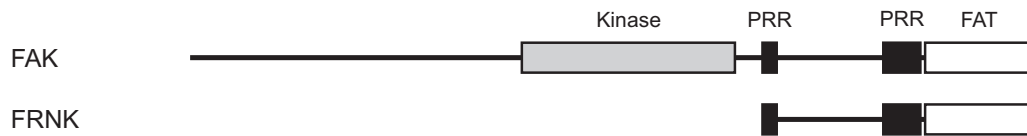
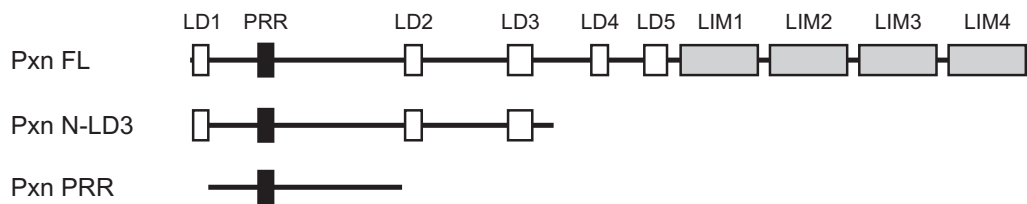
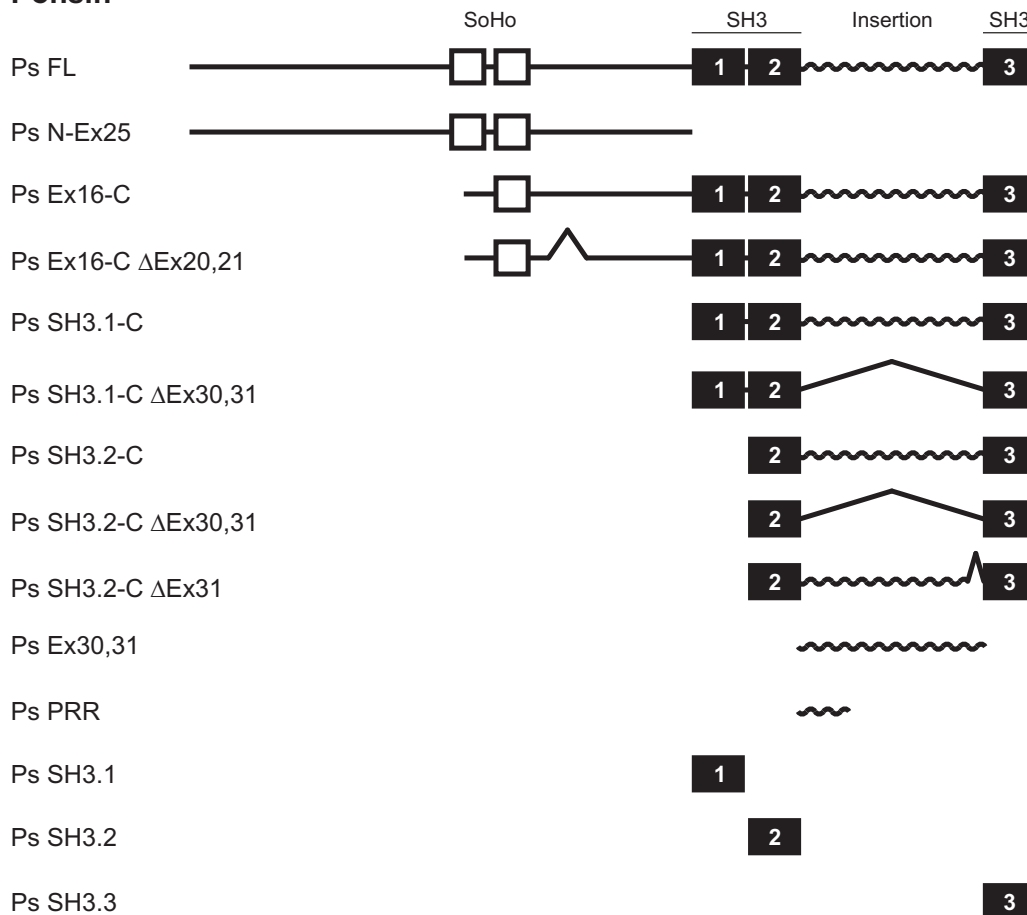
**FAK****Paxillin****Ponsin**

Abbildung B.1: Schematische Darstellung verwendeter FAK-, Paxillin- und Ponsin-Konstrukte. In der FAK sind die Lage der Kinase-Domäne (Kinase, graue Box), der Prolin-reichen Regionen (PRR, schwarze Boxen) und der *focal adhesion targeting sequence* (FAT, weiße Box) gekennzeichnet. Im Paxillin sind die LD-Motive (LD1–5, weiße Boxen), die Prolin-reiche Region (PRR, schwarze Box) und die LIM-Domänen (LIM1–4, graue Boxen) dargestellt. Im Ponsin sind die Lage der Sorbin-Homologie-Region (SoHo, weiße Boxen), der drei SH3-Domänen (schwarze Boxen) und der Insertion (Wellenlinie) angegeben.

Tabelle B.1: Primäre Antikörper

Name	Epitop	Typ	Anwendungsgebiete	Herkunft
653	$\alpha$ -Actinin (SkM)	Kaninchen	WB, IP, IF	Van der Ven <i>et al.</i> (2000)
79D2	MLP	Maus IgG2a	WB, IP	diese Arbeit
$\beta$ 1D	Integrin ( $\beta$ 1D UE)	Maus IgG2a	IF	Van der Flier <i>et al.</i> (1997)
B4	Myomesin	Maus IgG1	WB	Grove <i>et al.</i> (1984)
BM75.2	$\alpha$ -Actinin	Maus IgM	IF	Sigma (#A5044)
C5H	GAPDH	Maus IgG1	WB	Ambion (#4300)
Cav1 #2297	Caveolin 1	Maus IgG1	IF	BD Biosciences (#610406)
Cav2 #65	Caveolin 2	Maus IgG1	IF	BD Biosciences (#610684)
Cav3 #26	Caveolin 3	Maus IgG1	IF	BD Biosciences (#610420)
C-HC #23	Clathrin HC	Maus IgG1	IF	BD Biosciences (#610499)
EA53	$\alpha$ -Actinin (SkM)	Maus IgG1	WB, IP, IF	Sigma (#A7811)
FAK#77	FAK	Maus IgG1	IF	BD Biosciences (#610087)
Flot1 #18	Flotillin 1	Maus IgG1	IF	BD Biosciences (#610820)
Flot2 #18	Flotillin 2	Maus IgG1	IF	BD Biosciences (#610383)
GST	GST-Tag	Kaninchen	WB	Sigma (#G7781)
m8	Titin (M-Bande)	Kaninchen	IF	Obermann <i>et al.</i> (1996)
Pxn#349	Paxillin	Maus IgG1	IF	BD Biosciences (#610051)
Ponsin	Aminoterminus	Kaninchen	WB, IF	Upstate (#06-994)
Ponsin	Carboxyterminus	Maus (polyklonal)	WB, IF	diese Arbeit
PY20	Phospho-Tyrosin	Maus IgG2b	IF	BD Biosciences (#610000)
Rab4 #7	Rab4	Maus IgG1	IF	BD Biosciences (#610888)
T7	T7-Tag	Maus IgG2b	WB, IP, IF	Novagen (#69522)
T12	Titin (Z-Scheibe)	Maus IgG1	IF	Fürst <i>et al.</i> (1988)
Tensin #5	Tensin	Maus IgG2b	IF	BD Biosciences (#610064)
Vin11.5	Vinculin	Maus IgG1	IF	Sigma (#V4505)
YL1/2	EEF-Tag	Ratte mAB	WB	Wehland <i>et al.</i> (1983)



Tabelle B.2: Sekundäre Antikörper

<b>Name</b>	<b>Donor</b>	<b>gegen</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Herkunft</b>
GAM-PO	Ziege	Maus	HRPO	Dianova (#115-035-068)
GAM-PO	Ziege	Maus IgG (schwere Kette)	HRPO	Dianova (#115-035-164)
GArat-PO	Ziege	Ratte	HRPO	Dianova (#112-035-143)
GAR-PO	Ziege	Kaninchen Ig	HRPO	Dianova (#111-035-045)
GAM-G-488	Ziege	Maus IgG	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (#A11001)
GAM-G-Cy3	Ziege	Maus IgG	Cy3	Dianova (#115-166-072)
GAM-G1-488	Ziege	Maus IgG1	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (#A21121)
GAM-G1-TXR	Ziege	Maus IgG1	TXR	Dianova (#115-166-072)
GAM-G2a-594	Ziege	Maus IgG2a	Alexa Fluor 594	Molecular Probes (#A21135)
GAM-G2b-594	Ziege	Maus IgG2b	Alexa Fluor 594	Molecular Probes (#A21145)
GAM-M-TXR	Ziege	Maus IgM	TXR	Dianova (#115-075-075)
GAR-Cy2	Ziege	Kaninchen	Cy2	Dianova (#111-225-045)
GAR-Cy3	Ziege	Kaninchen	Cy3	Dianova (#111-165-045)
GAR-TXR	Ziege	Kaninchen	TXR	Dianova (#111-075-045)

Tabelle B.3: Filtersätze des verwendeten Photomikroskops

<b>Set</b>	<b>Anregung</b>	<b>Emission</b>	<b>BP</b>	<b>FT</b>	<b>LP</b>	<b>angeregte Farbstoff-Konjugate</b>
01	UV	„blau“	365/12	395	397	CPITC-Phalloidin
09	blau	„grün“	450-490	510	515	Cy2, FITC, GFP, Alexa-Fluor 488
15	grün	„rot“	546/12	580	590	Cy3, TXR, Alexa-Fluor 594

Tabelle B.4: Identifizierte Hefe-Doppel-Hybrid-Klone. Angegeben sind die Klon-Nummer, die Länge des Inserts, der Name des kodierten Proteins und der Datenbankeintrag (*accession number*).

<b>Klon</b>	<b>Länge /kb</b>	<b>Name</b>	<b>Datenbankeintrag</b>
107	4,0	Ponsin	AF 136381
125	4,0	Ponsin	AF 136381
35	2,2	Vinexin beta	NM 005775
146	1,5	genomische Sequenz	AC 005588
140	0,6	mitochondriale Sequenz	AF 382013
206	2,0	SECIS binding protein	NM 024077
158	1,7	SMARCD1	XM 03550
9	1,5	STIP1 homology	XM 083939
79	1,4	STIP1 homology	
102	1,5	STIP1 homology	
162	1,5	STIP1 homology	
164	1,5	STIP1 homology	
165	2,0	STIP1 homology	
266	1,4	STIP1 homology	
217	1,7	Tropomyosin	XM 036829
1	1,2	zinc finger protein 145	NM 006006
38	2,0	zinc finger protein 145	
78	1,0	zinc finger protein 145	
92	1,6	zinc finger protein 145	
115	1,1	zinc finger protein 145	
149	2,0	zinc finger protein 145	
171	2,0	zinc finger protein 145	
200	3,0	zinc finger protein 145	

Tabelle B.5: Expression von  $\alpha$ -Actinin, MLP und Ponsin in Myokardproben. Für die einzelnen Myokardproben sind Angaben zu Alter und Geschlecht der Spender aufgelistet, zusätzlich sind der Ort der Probennahme und die normierten densitometrischen Werte der dazugehörigen Banden relativ zu  $\alpha$ -Actinin angegeben. \* statistischer Ausreißer. Probenherkunft: NF1–NF7 und HCM1–7: Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen (Bad Oeynhausen); HOCM1–10: Humboldt-Universität Berlin; 228–1875: Deutsches Herzzentrum Berlin.

	<b>Bahn</b>	<b>Kollektiv</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Probe</b>	<b>MLP</b>	<b>Ponsin</b>
Blot 1	1	Ktr(1)	NF1	18	w	Septum	72,3	25,4
	2	Ktr(1)	NF2	61	m	Septum	118,5	92,2
	3	Ktr(1)	NF5	43	m	Septum	69,5	112,2
	4	Ktr(1)	NF7	5	w	Septum	128,6	210,5
	5	Ktr(1)	604	25	m	Septum	101,8	88,9
	6	Ktr(1)	1106	57	w	Septum	109,3	70,9
	7	DCM	228	52	m	LVVW	87,0	14,4
	8	DCM	1222	46	m	LVVW	39,8	60,1
	9	DCM	1155	33	m	LVVW	158,5*	49,5
	10	DCM	1304	56	m	Septum	26,6	14,8
	11	DCM	1706	49	m	LVVW	47,6	14,7
	12	DCM	1875	65	w	LVHW	52,4	18,6
Blot 2	1	Ktr(2)	NF1	18	w	Septum	45,1	
	2	Ktr(2)	NF2	61	m	Septum	120,4	
	3	Ktr(2)	NF3	40	w	Septum	141,6	
	4	Ktr(2)	NF5	43	m	Septum	51,3	
	5	Ktr(2)	NF7	5	w	Septum	141,6	
	6	HCM(1)	HCM1	72	w	Septum	127,8	
	7	HCM(1)	HCM2	42	m	Septum	118,1	
	8	HCM(1)	HCM3	59	m	Septum	135,4	
	9	HCM(1)	HCM4	53	m	Septum	133,5	
	10	HCM(1)	HCM5	36	m	Septum	129,7	
	11	HCM(1)	HCM6	66	m	Septum	121,7	
	12	HCM(1)	HCM7	73	m	Septum	85,2	
Blot 3	1	HCM(2)	HOCM 1	43	m	Septum	58,7	
	2	HCM(2)	HOCM 2	58	m	Septum	102,0	
	3	HCM(2)	HOCM 3	69	w	Septum	156,3	
	4	HCM(2)	HOCM 4	65	w	Septum	98,5	
	5	HCM(2)	HOCM 5	24	w	Septum	86,8	
	6	HCM(2)	HOCM 6	68	w	Septum	43,0	
	7	HCM(2)	HOCM 7	85	w	Septum	48,2	
	8	HCM(2)	HOCM 8	30	m	Septum	88,0	
	9	HCM(2)	HOCM 9	71	m	Septum	125,2	
	10	HCM(2)	HOCM10	70	w	Septum	98,4	

Tabelle B.6: Datenbankeinträge für die Skelettmuskel-spezifische Insertion des Ponsins. Angegeben sind der Datenbankeintrag, Typ des Eintrags, Spezies und die entsprechenden Aminosäuren der Insertion im Ponsin.

<b>Datenbankeintrag</b>	<b>Typ</b>	<b>Spezies</b>	<b>Aminosäuren</b>
AL 832353	EST	<i>Homo sapiens</i> (SkM)	1–278
AF 356525	mRNA	<i>Homo sapiens</i> (SkM)	1–258
AF 356526	mRNA	<i>Homo sapiens</i> (SkM)	1–258
AF 356527	mRNA	<i>Homo sapiens</i> (SkM)	259–278
AL 158165	genomisch	<i>Homo sapiens</i>	1–278
NT 039692	genomisch	<i>Mus musculus</i>	1–258
XP 347199	genomisch	<i>Rattus norvegicus</i>	1–258
BU 750718	EST	<i>Canis familiaris</i>	1–101
CF 407472	EST	<i>Canis familiaris</i>	232–278
CF 407473	EST	<i>Canis familiaris</i>	74–278
CD 591496	EST	<i>Danio rerio</i>	208–278

Tabelle B.7: Datenbankeinträge für Proteine, die in kurzen Abschnitten Homologien zu MLP aufweisen.

<b>Name</b>	<b>Datenbankeintrag</b>	<b>Größe /kD</b>	<b>Aminosäuren im MLP</b>
Elf-1	P32519	67,5	188–194
AICAR-Formyltransferase	AAA97405	64,5	170–175, 191–194
myelin gene expression factor 2	AAD43038	58,7	180–186

# Anhang C

## Nuklein- und Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine

Verwendete Datenbankeinträge:

$\alpha$ -Actinin 2	NM 86406
FAK	NM 153831
MLP	NM 003476
Nck2	NM 003581
N-RAP	NM 198060
Paxillin	NM 86406
Ponsin	in Vorbereitung

1	<u>M N Q I E P G V Q Y N Y V Y D E D E Y M</u>	20	ABD
1	atgaaccagatagagccccggcgtgcagtacaactacgtgtacgcagggatgagtacatg	60	
21	I Q E E E W D R D L L L D P A W E K Q Q	40	
61	atccaggaggaggagtgggaccgcgacctgctcctggaccagcctgggagaagcagcag	120	
41	R K T F T A W C N S H L R K A G T Q I E	60	
121	aggaagaccttcactgcctggtgtaactcccacctaaaggaagccggcaccagattgag	180	
61	N I E E D F R N G L K L M L L L E V I S	80	
181	aacatcgaggaagacttcaggaatggccttaagctcatgctgcttttggaaagtcatctca	240	
81	<u>G E R L P K P D R G K M R F H K I A N V</u>	100	
241	ggggaagcctgccaaacctgaccggggaaaaatgCGgtccacaaaattgctaagtgc	300	
101	<u>N K A L D Y I A S K G V K L V S I G A E</u>	120	
301	aacaaagctttggattacatagccagcaaggggtgaaactggtgtccatcggcgctgaa	360	
121	<u>E I V D G N V K M T L G M I W T I I L R</u>	140	
361	gaaattggtgatggcaatgtgaaaatgaccctgggtatgatctggacctcatccttcgc	420	
141	<u>F A I Q D I S V E E T S A K E G L L L W</u>	160	
421	tttgctattcaggatatttcggttgaagaaacatctgccaaagaaggtctgctgctttgg	480	
161	<u>C Q R K T A P Y R N V N I Q N F H T S W</u>	180	
481	tgtcagaggaaaactgctccttatagaaaatgtgaacattcagaactccatactagctgg	540	
181	<u>K D G L G L C A L I H R H R P D L I D Y</u>	200	
541	aaagatggccttggactctgtgccctcatccaccgcacccggcctgacctcattgactac	600	
201	<u>S K L N K D D P I G N I N L A M E I A E</u>	220	
601	tcaaaacttaacaaggatgaccccataggaatattaacctggccatggaatcgctgag	660	
221	<u>K H L D I P K M L D A E D I V N T P K P</u>	240	
661	aagcacctggatattcctaaaaatgttggatgctgaagacatcgtgaacaccctaaacc	720	
241	<u>D E R A I M T Y V S C F Y H A F A G A E</u>	260	
721	gatgaaagagccatcatgacgtacgtctcttctaccacgcttttgCGggcgcgag	780	
261	Q A E T A A N R I C K V L A V N Q E N E	280	
781	caggccgagacagcggttaacaggatgtaaggttcttctgctgtgatcaagagaatgag	840	
281	<b>R L M E E Y E R L A S E L L E W I R R T</b>	300	SLR1
841	aggctgatggaagaatagagaggctagcgagtgagcttttggaaatggattcgtcgacag	900	
301	<b>I P W L E N R T P E K T M Q A M Q K K L</b>	320	
901	atccccctggctggagaaccggactcccgagaagaccatgcaagccatgcagaagaagctg	960	
321	<b>E D F R D Y R R K H K P P K V Q E K C Q</b>	340	
961	gaggacttccggattaccgcggaagcacaagccaccaaggtgcaggagaaatgccag	1020	
341	<b>L E I N F N T L Q T K L R I S N R P A F</b>	360	
1021	ctggagatcaactcaaacgctgcagaccaagctgCGggtcagcaaccgtcctgccttc	1080	
361	<b>M P S E G K M V S D I A G A W Q R L E Q</b>	380	
1081	atgcctccgagggcaagatggtgtcggatattgctggtgctggcagaggctggagcag	1140	
381	<b>A E K G Y E E W L L N E I R R L E R L E</b>	400	
1141	gctgagaagggttacgaggagtgttctcaatgagattcggagactggagcgtttggaa	1200	
401	<b>H L A E K F R Q K A S T H E T W A Y G K</b>	420	SLR2
1201	cacctggctgagaagttcaggcagaaggcctcaacgcacgagacttggccttatggcaaa	1260	
421	<b>E Q I L L Q K D Y E S A S L T E V R A L</b>	440	
1261	gagcagatccttctgcagaaggattacgagtcggcgtcgctgacagaggtgCGggctctg	1320	
441	<b>L R K H E A F E S D L A A H Q D R V E Q</b>	460	
1321	ctgCGgaagcagagggcgttcgagagcactggcagcgcaccaggaaccgctggagcag	1380	
461	<b>I A A I A Q E L N E L D Y H D A V N V N</b>	480	
1381	atcgagccatcgcgagagctcaatgaaactggactatcacgacgctgtgaaatgcaat	1440	
481	<b>D R C Q K I C D Q W D R L G T L T Q K R</b>	500	
1441	gatcgggtgccagaaaattgtgaccagtgggaccgactgggaacgcttactcagaagag	1500	

Abbildung C.1: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des humanen  $\alpha$ -Actinin 2. Die Actin-bindende Domäne (ABD) und die Calmodulin-artige Domäne (CaM) sind unterstrichen, die vier *Spectrin-like repeats* (SLR1–4) durch kursive Fettschrift gekennzeichnet.

501	<b>R E A L E R M E K L L E T I D Q L H L E</b>	520	SLR3
1501	agagaagccctagagagaatggagaattgctagaaccattgatcagcttcacctggag	1560	
521	<b>F A K R A A P F N N W M E G A M E D L Q</b>	540	
1561	tttgccaagagggctgctcctttcaacaattggatggagggcgctatggaggatctgcaa	1620	
541	<b>D M F I V H S I E E I Q S L I T A H E Q</b>	560	
1621	gatatgttcattgtccacagcattgaggagatccagagtctgatcactgcgcatgagcag	1680	
561	<b>F K A T L P E A D G E R Q S I M A I Q N</b>	580	
1681	ttcaaggccacgctgccggaggcgacggagagcggcagtcacatcatggccatccagaac	1740	
581	<b>E V E K V I Q S Y N I R I S S S N P Y S</b>	600	
1741	gaggtggagaaggatcagagctacaacatcagaatcagctcaagcaaccctgacacg	1800	
601	<b>T V T M D E L R T K W D K V K Q L V P I</b>	620	
1801	actgtcaccatggatgagctccggaccaagtgggacaaggatgaagcaactcgtgcccatc	1860	
621	<b>R D Q S L Q E E L A R Q H A N E R L R R</b>	640	SLR4
1861	cgcgatcaatccctgcaggaggctgctcgcagcatgctaacgagcgtctgaggcgc	1920	
641	<b>Q F A A Q A N A I G P W I Q N K M E E I</b>	660	
1921	cagtttgctgccaagccaatgccattggccctggatccagaacaagatggaggagatt	1980	
661	<b>A R S S I Q I T G A L E D Q M N Q L K Q</b>	680	
1981	gccccggagctccatccagatcacaggagccctggaagccagatgaaccagctgaagcag	2040	
681	<b>Y E H N I I N Y K N N I D K L E G D H Q</b>	700	
2041	tatgagcacaacatcatcaactataagaacaacatcgacaagctggaggagaccatcag	2100	
701	<b>L I Q E A L V F D N K H T N Y T M E H I</b>	720	
2101	ctcatccaggaggccctgtctttgacaacaagcacgaaactacacgatggagcacatt	2160	
721	<b>R V G W E L L L T T I A R T I N E V E T</b>	740	
2161	cgtgttgatgggagctgctgctgacaaccatcgccagaaccatcaatgaggtggagact	2220	
741	<u>Q I L T R D A K G I T Q E Q M N E F R A</u>	760	CaM
2221	cagatccctgacgagagatgcaagggcatcaccaggagcagatgaatgagttcagagcc	2280	
761	<u>S F N H F D R R K N G L M D H E D F R A</u>	780	
2281	tccttcaaccactttgacagggaagaatggcctgatggatcatgagatttcagagcc	2340	
781	<u>C L I S M G Y D L G E A E F A R I M T L</u>	800	
2341	tgccctgatttccatgggttatgacctgggtgaagccgaatttgcccgcattatgacctg	2400	
801	<u>V D P N G Q G T V T F Q S F I D F M T R</u>	820	
2401	gtagatcccaacgggcaaggcaccgtcaccttccaatcctcatgacttcatgactaga	2460	
821	<u>E T A D T D T A E Q V I A S F R I L A S</u>	840	
2461	gagacggctgacaccgacactgccgagcaggtcatcgctccttccggatcctggcttct	2520	
841	<u>D K P Y I L A E E L R R E L P P D Q A Q</u>	860	
2521	gataagccatacatcctggcgaggagctgctcgggagctgccccggatcagggcccag	2580	
861	<u>Y C I K R M P A Y S G P G S V P G A L D</u>	880	
2581	tactgcatcaagaggatgccccctactcgggcccagcagtgctgctggtgcaactggat	2640	
881	<u>Y A A F S S A L Y G E S D L *</u>	894	
2641	tacgtcggttctcttccgcactctacggggagagcagatctgtgatgctgagcttctgta	2700	

2701 ATCACTCATCCCATCAGAAATGCAATAAAAGCGGAAGTCACAGTTTGTTCCTGGAAACTTTGACAAGCTTTATTAAGTTGAGAGAGAGAGAGGGGGAAAA 5500  
 2801 AAAAAAAGCCCTTCGTAGTTCAAGTAATTCAGCAATATAACACGGCTAAAATGAAGTTTTACAGTATATGACATAGTGGCTTCATAAATAGGTTAT 5600  
 2901 TTCAGGTTTTAGCAAAATGTAATGAATATCAGTTGATTTCTTTGATTAACAGAACAAATATCTGAGTATAGGAATTAGGAGGATCTAGGGAC 5700  
 3001 AGAAGGAAGTGAATAATGTGAATAATCAAAATACCCAAAGATTTAAGACCGGGGGAAAAAACCAAAATGGTAATAAAGGTTGCTATTTGTAATA 5800  
 3101 ATTTCAITTAATCTAATAATGCTTATGTGATTTGGCCCTAGGGGAGTATATTTGGGATCTTAATGTTTTATTTTCATGCTTATCCAAAGATTACTATTGTA 5900  
 3201 TCTCAATGAACCTAATAATTTGTGAGATGGAACGCGGGGATTAAGAGACTACCCAAAGATTTTGGCACTTACAATTTTAAATAGTTTATGTCA 6000  
 3301 TCTCTCATTAATTTAGGGCTGGATGGTCACTCAGTCAGTGATTTTTGATGCTTCTCTTATCCTCCAGAATAGAGACCTAAGGACACGTGGAAGTCACT 6100  
 3401 TTAATGCCAGAGAGAGGATGCAATCACTAGGTGAAATGAGTTTTTAGGATTTATTTGATTCAGGTTCCCATGCTTTTTGTTAGAGCTTATTAAT 6200  
 3501 ACAGGTTCTCAGAGATGACCACATAAAGTCTCTGTTTATAAATAAGCAGGTTCTGTAAGTACTGACTGGTTCATCACAGGCAAGTCAGAAACAGT 6300  
 3601 ATCCTCTAGCTTCCAGTCAGGACTTCTTATGCTTACTGTTTATGACCGGTTAAGGAGAGCCAGAGTTAGAGTAGGAGAGGACTAATCTCAGCAG 6400  
 3701 CAGTGGAGTGAGTTCTTCTTTCCGGAAGCTTACATATGTTTTGTTAGTAGGAACTACTAGATTTTACGCTAGTGTGCGGTTGTTGCTCACCCT 6500  
 3801 GGGATTGGACAGTCTATCCTAACAGTCCATCTCTGGTCTGTGCTAAAGCCCTGCTCCATGACACAGGATGCTACATGCACTCCTGCTAGCATTCT 6600  
 3901 TGATCTGTTGAATGTTCAATCTTCTTTTGGCTATACGCTGTAGGCTATAATTCOCCCTGTTTTCCATCTTGTGACAGCTTGTAGAGAATAAAGC 6700  
 4001 AGGAATC 6708

Abbildung C.1 (Fortsetzung)

1	M A A A Y L D P N L N H T P N S S T K T	20	
1	atggcagctgcttaccttgaccccaacttgaatcacacccaaattcgagtactaagact	60	
21	H L G T G M E R S P G A M E R V L K V F	40	
61	cacctgggtactggatggaacgttctctgggtgcaatggagcagattaaagttcttt	120	
41	H Y F E S N S E P T T W A S I I R H G D	60	
121	cattattttgaaagcaatagtgagccaaccactgggocagattatcagggcatggagat	180	
61	A T D V R G I I Q K I V D S H K V K H V	80	
181	gctactgatgcaggggcatcattcagaagatagtgagcagtcacaaagtaaagcatgtg	240	
81	A C Y G F R L S H L R S E E V H W L H V	100	
241	gcctgctatggattccgcctcagtcacctgctgagaggggtcactggcttcacgtg	300	
101	D M G V S S V R E K Y E L A H P P E E W	120	
301	gatatgggctctccagtgtaggggagaagtatgagcttgctcaccacagaggagtg	360	
121	K Y E L R I R Y L P K G F L N Q F T E D	140	
361	aaatgatgaattgagaattcgttatttgccaaaagatttctaaccagttactgaagat	420	
141	K P T L N F F Y Q Q V K S D Y M L E I A	160	
421	aagccaactttgaatttctctatcaacaggtgaagagcagattatattgttagagatagct	480	
161	D Q V D Q E I A L K L G C L E I R R S Y	180	
481	gatcaagtgaccagaaattgctttgaagttgggtgtctagaaatcagggcatcatac	540	
181	W E M R G N A L E K K S N Y E V L E K D	200	
541	tgggagatcgccgggcaatgcactagaaaagaagtctaactatgaagtattagaaaaagat	600	
201	V G L K R F F P K S L L D S V K A K T L	220	
601	gttggtttaaagcatttttcttaagagtttactggattctgtcaaggccaaacacta	660	
221	R K L I Q Q T F R Q F A N L N R E E S I	240	
661	agaaaactgatccaacaacatttagacaatttgccaaccttaatagagaagaagatt	720	
241	L K F F E I L S P V Y R F D K E C F K C	260	
721	ctgaaattctttgagatcctgtctccagttctacagatttgataaggaatgcttcaagtg	780	
261	A L G S S W I I S V E L A I G P E E G I	280	
781	gctcttgggtcaagctggattatctcagtggaactggcaatcgcccaagaagaaggaatc	840	
281	S Y L T D K G C N P T H L A D F T Q V Q	300	
841	agttacctaacggacaaggctgcaatccacacatcttctgctgacttcaactcaagtgcaa	900	
301	T I Q Y S N S E D K D R K G M L Q L K I	320	
901	accattcagtttcaaacagtgaaagacaaggacagaaaaggaatgtacaactaaaaata	960	
321	A G A P E P L T V T A P S L T I A E N M	340	
961	gcaggtgcaccgcctctgacagtgacggcaccatccctaaccattgctggagaatag	1020	
341	A D L I D G Y C R L V N G T S Q S F I I	360	
1021	gctgacctaatagatgggtactgccggctggtgaatggaacctgcagtcatttatcacc	1080	
361	R P Q K E G E R A L P S I P K L A N S E	380	
1081	agacctcagaaagaagtgaaacgggctttgcatcaataccaaagtggccaaacagcgaa	1140	
381	K Q G M R T H A V S V S E T D D Y A E I	400	
1141	aagcaaggcatcgcgacacacgcctctctgtgtcagaaacagatgattatgctgagatt	1200	
401	I D E E D T Y T M P S T <b>R D Y E I Q R E</b>	420	Kinase
1201	atagatgaagaagatacttacaccatgccctcaaccagggattatgagattcaaaagaaa	1260	Domäne
421	<b>R I E L G R C I G E G Q F G D V H Q G I</b>	440	
1261	agaatagaacttggacgatgtattggagaaggccaatttggagatgtacatcaaggcatt	1320	
441	<b>Y M S P E N P A L A V A I K T C K N C T</b>	460	
1321	tatatgagtcagagaatccagcttggcggttgcaatataaacatgtaaaactgtact	1380	
461	<b>S D S V R E K F L Q E A L T M R Q F D H</b>	480	
1381	tccgacagcgtgagagagaaaatttctcaagaagccttaacaatgcgtcagtttgacct	1440	
481	<b>P H I V K L I G V I T E N P V W I I M E</b>	500	
1441	cctcatattgtgaagctgattggagtcacacagagaatcctgtctggataatcatggag	1500	
501	<b>L C T L G E L R S F L Q V R K Y S L D L</b>	520	
1501	ctgtgcacacttggagagctgaggtcatttttgcaagtaaggaaatacagtttggatcta	1560	
521	<b>A S L I L Y A Y Q L S T A L A Y L E S K</b>	540	
1561	gcatcttgcactgtatgcctatcagcttagtacagctcttgcatatctagagagcaaa	1620	
541	<b>R F V H R D I A A R N V L V S S N D C V</b>	560	
1621	agatttgtaacagggacattgctgctoggaatgtctgggtgctcctcaaatgattgtgta	1680	

Abbildung C.2: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der humanen FAK. Die Kinase-Domäne und die *focal adhesion targeting sequence* (FAT) sind durch kursive Fettschrift gekennzeichnet, der Beginn der Spleiß-Isoform FRNK ist ebenfalls gekennzeichnet.



561	<b>K L G D F G L S R Y M E D S T Y Y K A S</b>	580
1681	aaattaggagactttggattatcccgatatatggaagatagtagtactactacaaagcttcc	1740
581	<b>K G K L P I K W M A P E S I N F R R R F T</b>	600
1741	aaagaaaaattgcctataaatggatggctccagagtcaatcaatcttcgacgttttacc	1800
601	<b>S A S D V W M F G V C M W E I L M H G V</b>	620
1801	tcagctagtacgtatggatgtttgggtgtgtatgtgggagatactgatgcatggtgtg	1860
621	<b>K P F Q G V K N N D V I G R I E N G E R</b>	640
1861	aagcctttcaaggagtgaagaacaatgatgtaacggctgaattgaaaatggggaaaga	1920
641	<b>L P M P P N C P P T L Y S L M T K C W A</b>	660
1921	ttaccaatgcctccaaattgtcctcctaccctctacagccttatgacgaaatgctggggc	1980
661	<b>Y D P S R R P R F T E L K A Q L S T I L</b>	680
1981	tatgacccagcagcggccaggtttactgaactaaagctcagctcagcacaatcctg	2040
681	E E E K A Q Q E E R M R   M E S R R Q A T	700
2041	gaggaagagaaggctcagcaagaagagcgcagatgaggatggagtcagcaagaagcaggccaca	2100
701	V S W D S G G S D E A P P K P S R P G Y	720
2101	gtgtcctgggactccggaggtctgatgaagcaccgccaagccagcagaccgggttat	2160
721	P S P R S S E G F Y P S P Q H M V Q T N	740
2161	cccagtcagaggtccagcgaaggatttatcccagccacagcagcatggtacaaaccaat	2220
741	H Y Q V S G Y P G S H G I T A M A G S I	760
2221	catcaccaggtttctggctaccctggttcacatggaatcacagccatggctggcagcatc	2280
761	Y P G Q A S L L D Q T D S W N H R P Q E	780
2281	tatccaggtcaggcatctcttttgaccaaacagattcatggaatcatagacctcaggag	2340
781	I A M W Q P N V E D S T V L D L R G I G	800
2341	atagcaatgtggcagcccaatgtggaggactctacagattggacctgcgagggattggg	2400
801	Q V L P T H L M E E R L I R Q Q Q E M E	820
2401	caagtgttgcacaacctctgatggaagagcgtctaaccgacagcaacaggaaatggaa	2460
821	E D Q R W L E K E E R F L K P D V R L S	840
2461	gaagatcagcgtggctggaaaaagaggaaagatttctgaaacctgatgtgagactctct	2520
841	R G S I D R E D G S L Q G P I G N Q H I	860
2521	cgaggcagtttgacagggaggatggaagtctcagggtccgattgaaaccaacatata	2580
861	Y Q P V G K P D P A A P P K K P P R P G	880
2581	tatcagcctgtgggtaaacagatcctgcagctccaccaagaaaaccgctcgcctgga	2640
881	A P G H L G S L A S L S S P A D S Y N E	900
2641	gctcccggtcatctgggaagccttgccagcctcagcagcctgctgacagctacaacgag	2700
901	G V K L Q P Q E I S P P P T <b>A N L D R S</b>	920
2701	ggtgtcaagctcagccccagaaatcagccccctcctactgccaacctggaccggtcg	2760
921	<b>N D K V Y E N V T G L V K A V I E M S S</b>	940
2761	aatgataaagtgtagagaatgtgacggcctggtgaaagctgcatogagatgtccagt	2820
941	<b>K I Q P A P P E E Y V P M V K E V G L A</b>	960
2821	aaaatccagccagccccaccagaggatgtccctatgggtaaggaagtccgctgggcc	2880
961	<b>L R T L L A T V D E T I P L L P A S T H</b>	980
2881	ctgaggacattatggccactgtggatgagaccattcccctcctaccagccagcaccac	2940
981	<b>R E I E M A Q K L L N S D L G E L I N K</b>	1000
2941	cgagagattgagatggcagagaagctattgaactctgacctgggtgagctcatcaacaag	3000
1001	<b>M K L A Q Q Y V M T S L Q Q E Y K K Q M</b>	1020
3001	atgaaactggcccagcagatgtcatgaccagcctccagcaagagtacaaaagcaaatg	3060
1021	<b>L T A A H A L A V D A K N L L D V I D Q</b>	1040
3061	ctgactgctcctcagccccggctgtggatgccccaaacttactcgatgtcattgaccaa	3120
1041	<b>A R L K M L G Q T R P H *</b>	1052
3121	gcaagactgaaaatgcttgggcagacgagaccacacTGAGCCTCCCTTAGGAGCAGCTCT	3180
3181	TGCTACCCCTTTTGAAGATGTTCTCTAGCCTTCCACCAGCAGGAGGAAATACCTCTGTGCTCCAGTCGCCAGCACTTACAGCTCCAACCTTTTTTGA	3280
3281	TGACCATCTGGTTGAAAATCTTCTCATATAAGTTTAAACCACACTTTGATTTGGGTCATTTTTGGTTTTTTTTCATCATGATATTCAGAAAA	3380
3381	TCCAGGATCCAAATGTGGCTTTTTCTAAGAAATGAAAATATATGTAAGCTTTAAGCATCATGAGAAACAATTTATGTCACATTAAGATACGTTCTA	3480
3481	AGGGGGATGGCCAGGGGTGACATCTTAATTCCTAACTACCTTACCTGCTATAGTGAGAGAGAGAGCATGAGCCARAGAAATCCAGGAARCCAGAG	3580
3581	GCTGAGATCTTTTGTCTACCAAGATATATATCCAGCTGAAATTTTGTGTTGAGAACCCCTCAGTTGCATATGCTATCCACATTTAGAAA	3680
3681	GAATATAAAGCTATATTTGAGAGCTTGAGTTATTCAGAAAAACTACAGCCCTTTTGTCTACCTGCCCTTTTCTGCGTGGATATGTAAGCA	3780
3781	TTGGGTGGGAACTAGCTGTAGAACAACAATAAAAACTCATGCTCTTTTTCAGAGAAATATGTCGCAATTTTTGTAGCAATGTATTTCTCTGGAAAC	3880
3881	AGAAATGCTTTTACAGAGACCTCCAACTGCTATGAGGAGAGTTCCAGAACCATCCCTTTTCCATTTTATATAATTTAAGAAAGATTTAA	3980
3981	GCAAGTTGACTATTTACAGCCACTGGAGTAACTAAACCTTCTCTGATCTGCTCTCCAGAGAGATGAGCAAAACAGGAATTTGGTTCTTTTT	4080
4081	GATCCAGTACACCAATCCCTCTGTAATTTGAAAAAATATACCCCTCTTGTCTGTTGGGGATATAAATTTCTCAGAGAAATTAATGAA	4180
4181	CTGTACAGTACTTGTACCTATAAAAAAGGTGTACCAGTAAA	4223

Beginn FRNK

FAT

Abbildung C.2 (Fortsetzung)

1	<u>M P N W G G G A K C G A C E K T V Y H A</u>	20	LIM1
1	atgccaaactggggcggagcgcaaaaatgtggagcctgtgaaaagaccgtctaccatgca	60	
21	<u>E E I Q C N G R S F H K T C F H C M A C</u>	40	
61	gaagaaatccagtgcaatggaaggagtttccacaagcgtgtttccactgcatggcctgc	120	
41	<u>R K A L D S T T V A A H E S E I Y C K V</u>	60	
121	aggaaggctcttgacagcacgacagtcgcggtcatgagtcggagatctactgcaaggtg	180	
61	<u>C Y G R R Y G P K G I G Y G Q G A G C L</u>	80	
181	tgctatggggcgcagatatggcccaagggatcgggtatggacaaggcgtggctgtctc	240	
81	<u>S T D T G E H L G L Q F Q Q S P K P A R</u>	100	
241	agcacagacacgggcgagcatctcggcctgcagttccaacagtcaccaagccgycacgc	300	
101	<u>S V T T S N P S K F T A K F G E S E K C</u>	120	LIM2
301	tcagttaccaccagcaacccttccaaattcactgcgaagtttgagagtcggagaagtg	360	
121	<u>P R C G K S V Y A A E K V M G G G K P W</u>	140	
361	cctcgatgtggcaagtcagtcctatgctgctgagaaggttatgggaggtggcaagccttg	420	
141	<u>H K T C F R C A I C G K S L E S T N V T</u>	160	
421	cacaagacctgttccgctgtgccatctgtgggaagagtcggagtcacaaatgtcact	480	
161	<u>D K D G E L Y C K V C Y A K N F G P T G</u>	180	
481	gaaaagatggggaactttattgcaaagtttgctatgcaaaaattttggccccacgggt	540	
181	<u>I G F G G L T Q Q V E K K E *</u>	194	
541	attgggtttggaggccttacacaacaagtggaagaaagaaTGAAGAGGTGCGCGTTT	600	
601	ctcagatTTTTGGAGCCTAAACACTTGCCAAGTAATCCTGCACAGATCGATACCTTCCCAATAGCCTCTCCTTTGTAGTCGTACATTATGTGT	700	
701	tctcctcagaagtgatcaggtcttactgaatgtagaagaggccttgggaagaaattatgtaaagtttaactataacaaatgctttattattataa	800	
801	tgcttggaaatgggagaggcaataaataaatgttttagtctatctgtatggctctagatcttttctttgagatagaaatttcaaaaacataaagctag	900	
901	ttcaaaaacgagttgcagagcatataaataatttggatgtcaactgagaaaggagtgagaaggaagaacaatgcgcaaaaggaagcagctcttcagaa	1000	
1001	tctgtcagccaagtgtcttctagttactgctaattggagaagaaaacagggggtctgggagaaaatagagaacatgatagcaaatctaaaaggaatac	1100	
1101	aaaactaataaaatgtctgaagagttgatccctttgtcctatcgtggggcttggtaatgttacacatctcgtgaaaactcagaaatgacaataaagcgtg	1200	
1201	gcatttgcctctgtattataaatg	1224	

Abbildung C.3: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des humanen MLP. Die beiden LIM-Domänen sind unterstrichen, die im MLP C58G mutierte Aminosäure ist ebenfalls gekennzeichnet.

1	<u>M T E E V I V I A K W D Y T A Q Q D Q E</u>	20	SH3.1
1	atgacagaagaagttattgtgatagccaagtgggactacaccgccagcaggaccaggag	60	
21	<u>L D I K K V N E R L W L L D D S K T W W</u>	40	
61	ctggacatcaagaagtggaacgagcggtgtggttgctggacgactccaagacgtggtgg	120	
41	<u>R V R N A A N R T G Y V P S N Y V E R K</u>	60	
121	cgggtgaggaacgcgccaacaggacgggctatgtaccgtccaactacgtggagcggaag	180	
61	<u>N S L K K G S L V K N L K D T L G L G K</u>	80	
181	aacagcctgaagaagggctcctcgtgaagaacctgaaggacacactaggcctcggcaag	240	
81	<u>T R R K T S A R D A S P T P S T D A E Y</u>	100	
241	acgcgcaggaagaccagcgcggggatgctccccacgcccagcacggacgcccagtagt	300	
101	<u>P A N G S G A D R I Y D L N I P A F V K</u>	120	
301	cccgcaatggcagcgccgaccgcatctacgacctcaacatcccgcccttcgtcaag	360	
121	<u>F A Y V A E R E D E L S L V K G S R V T</u>	140	SH3.2
361	ttcgctatgtggccgagcgggaggatgagttgtccctggtgaaggggtcgcgctcacc	420	
141	<u>V M E K C S D G W W R G S Y N G Q I G W</u>	160	
421	gtcatggagaagtgacgagcggttggtggcggggcagctacaacgggcagatcggtgg	480	
161	<u>F P S N Y V L E E V D E A A A E S P S F</u>	180	
481	ttccctccaactacgtcttggaggaggtggacgaggcggctcggagtcaccaagcttc	540	
181	<u>L S L R K G A S L S N G Q G S R V L H V</u>	200	SH3.3
541	ctgagcctgcgaagggcgccctcgctgagcaatggccagggtcccgcgtgctgcatgtg	600	
201	<u>V Q T L Y P F S S V T E E E L N F E K G</u>	220	
601	gtccagacgtgtacccttcagctcagtcaccgaggaggagctcaacttcgagaagggg	660	
221	<u>E T M E V I E K P E N D P E W W K C K N</u>	240	
661	gagaccatggaggtgattgagaagccggagaacgacccccagtggtggaatgcaaaaa	720	
241	<u>A R G Q V G L V P K N Y V V V L S D G P</u>	260	
721	gccccgggacaggtggcctcgtccccaaaaactacgtggtggtcctcagtgacgggct	780	
261	<u>A L H P A H A P Q I S Y T G P S S S G R</u>	280	
781	gcccctgcaccctgcgcacgccccacagataagctacaccgggcccctcgtccagcggg	840	
281	<u>F A G R E W Y Y G N V T R H Q A Q C A L</u>	300	SH2
841	ttcgcgggcagagagtggtactacgggaacgtgacgcggcaccaggcgcagtgccctc	900	
301	<u>N E R G V E G D F L I R D S E S S P S D</u>	320	
901	aacgagcgggcggtggagggcgacttcctcattagggacagcgagtcctcgcccagc	960	
321	<u>F S V S L K A S G K N K H F K V Q L V D</u>	340	
961	ttctccgtgtcccttaaagcgtcagggagaacaaacacttcaaggtgcagctcgtgg	1020	
341	<u>N V Y C I G Q R R F H T M D E L V E H Y</u>	360	
1021	aatgtctactgcattgggcagcggcgcttccacacatggacgagctggtggaactac	1080	
361	<u>K K A P I F T S E H G E K L Y L V R A L</u>	380	
1081	aaaaaggcggccatcttcaccagcgcagcggggagaagctctacctcgtcagggccctg	1140	
381	Q *		
1141	cagTGACGGGCCCCGGCCCCACACTCGCCTCCCGGGCCCCACGGTGGAGCTGCCGCC	1200	
1201	GGCCTTGTGGCAGAGGCTCCTCCCGCGGGACGGCCCCGACGGCTTCTCTG	1251	

Abbildung C.4: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des humanen Nck2. Die drei SH3-Domänen sowie die SH2-Domäne sind unterstrichen.

1	<u>M N V Q P C S R C G Y G V Y P A E K I S</u>	21	LIM
1	atgaatgtgcagccctgttctaggtgtgggtatggggttttatcctgccgagaagatcagc	60	
21	<u>C I D Q I W H K A C F H C E V C K M M L</u>	41	
61	tgtagatagatcagatatggcataaaagcctgttttcactgtgaagttgcaagatgatgctg	120	
41	<u>S V N N F V S H Q K K P Y C H A H N P K</u>	61	
121	tctgttaataactttgtgagtcaccagaaaaagccgtactgtcacgcccataaccctaag	180	
61	<b>N N T F T S V Y H T P L N L N V R T F P</b>	80	
181	aacaacactttcaccagtgctatcacactccattaaatctaaatgtgaggacatttcca	240	
81	<b>E A I S G I H D Q E D G E Q C K S V F H</b>	100	
241	gaggccatcagtgggatccatgaccaagaagatggtaaacagtgtaaatcagtttttcac	300	
101	<b>W D M K S K D K E G A P N R Q P L A N E</b>	120	
301	tgggacatgaaatccaaggataaggaaggtgcacctaacaggcagccactggcaaatgag	360	
121	R A Y W T G Y G E G N A W C P G A L P D	140	aa120:
361	agagcctattggactggataggggaaggaatgcttgggtgccaggagctctgccagac	420	Beginn
141	P E I V R M V E A R K S L G E  E Y T E D	160	Nebulin-
421	cccgaattgtaaggatgggtgaggctcgaaagtctcttgggtgaggaatatacagaagac	480	like
161	Y E Q P R G K G S F P A M I T P A Y Q R	180	repeats
481	tatgagcaaccaggggcaaggggagctttccagccatgatcacacctgcttatcaaagg	540	
181	A K K A N Q L A S Q  V E Y K R G H D E R	200	
541	gccaaagaaaccaaccagctggccagccaagtgagataagagagggcatgatgaacgc	600	
201	I S R F S T V V D T P E L L R S K A G A	220	
601	atctccaggttctccacgggtggatactcctgagctgctacggagcaaggctggggca	660	
221	Q L Q S D  V R Y T E D Y E Q Q R G K G S	240	
661	cagcttcaaagtgatgtgagatacacagaggactatgaacaacaaagagggaaaggcagt	720	
241	F P A M I T P A Y Q I A K R A N E L A S	260	
721	ttcctgcatgatcacaccgcctatcagatagccaaaagagccaatgagctggcaagt	780	
261	D  V R Y H Q Q Y Q K E M R G M A G P A I	280	
781	gatgtgaggtagcatcaacaatatcaaaaagaaatgaggggaatggctgggtccagccatt	840	
281	G A E G I L T R E C A D Q Y G  Q G Y P E	300	
841	ggagctgagggcatcttgacaaggaatgtgcagaccaatatggccagggttaccggag	900	
301	E Y E E H R G K G S F P A M I T P A Y Q	320	
901	gagtaggagcacaggggaagggcagcttcccagctatgatcactccagcatatcag	960	
321	N A K K A H E L A S D  I K Y R Q D F N K	340	
961	aacgccaagaaagctcagcaactcgctagtgacataaaatacaggcaggacttcaataag	1020	
341	M K G A A H Y H S L P A Q D N L V L K Q	360	
1021	atgaaaggcgtgcacattatcactcgcttccagctcaagacaacttggttctcaaacag	1080	
361	A Q S V N K L V S E  V E Y K K D L E S S	380	
1081	gctcagagcgtaaacaaactcgtgagtgaggtggagtataagaaggatctgaaagtagt	1140	
381	R G H S I N Y C E T P Q F R N V S K I S	400	
1141	agaggtcacagtatcaactactgtgaaacacctcaattcaggaacgtgagcaagatctca	1200	
401	K F T S D  N K Y K E N Y Q N H M R G R Y	420	
1201	aaatttaccagtgataataataaagaaaactaccagaaccacatgagagggccgctat	1260	
421	E G V G M D R R T L H A M K V G S L A S	440	
1261	gaaggagttggtatggacagacgactctgcatgctatgaaagttggcagcctggcaagc	1320	
441	N  V A Y K A D Y K H D I V D Y N Y P A T	460	
1321	aacgttgctacaaagctgattataaacatgatattgtcgactacaactaccagccact	1380	

Abbildung C.5: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des humanen N-RAP. Die LIM-Domäne ist unterstrichen, der sich anschließende nichtmodulare Teil in kursiver Fettschrift dargestellt. Der Beginn der Nebulin-artigen *repeats* ist durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet, der Beginn der *superrepeats* (SR1–5) zusätzlich angegeben.

461	L T P S Y Q T A M K L V P L K D J A N Y R	480	S R 1	1121	A A L V H A K K A Q T L A S N I Q D Y K H	1140
1381	ctcagcctctccatcaaacagctatgaaactggctgcccctgaaagatgccaattatag	1440		3361	gcccctggtgcatgccaagaaggtccagaccctgcccagcatcaggactacaaaact	3420
481	Q S I D K L K Y S S V T D T P Q I V Q A	500		1141	P L P Q Y T S L A E D L R L S C A K K A	1160
1441	cagagcatcgcaagtgaagtcagctcgtgactgacccccacagattgttcaagcc	1500		3421	ccactgcccagctacctctctggcagagaagctgagctgagctgccaagaagct	3480
501	K I N A Q Q L S H I V N Y R A D Y E K N K	520		1161	H K L Q S E I N L Y R S D L N F M R G V A	1180
1501	aaaatcaatgccccagctgagctcatgtgaattaccgtgctgactatgagaaaaataa	1560		3481	cacaaatgcagagtgagaatttgcacggctcagaccctgaactttatcgaggtgttga	3540
521	L N Y T L P Q D V P Q L V K A K T N A K	540		1181	C V I P G T L E I E G R K K A S E L I S	1200
1561	ttgaattacacattgccccagatgttccctcagctggtgaagccaaaacaaatgccaaa	1620		3541	tgtgtcatccaagcagcttagagattgaagggaggaagaagactcgaactcatcag	3600
541	L F S E I V K Y K E G W E K T K G K G F E	560		1201	E I S K Y R Q H P H S F K Y T A V T D T F	1220
1621	ctcttcagtgaggttaagtataaagaagctgggagaagacaaaaggggaaagatttgag	1680		3601	gagagtaaatatcggcagcatccccctcattcaagtacacagctgtgacagacactccc	3660
561	M K L D A M S L L A A K A S G E L A S N	580		1221	N L L H A K F S N Q I T N E I R L Y K A A	1240
1681	atgaagctggatgcatctgctgctggcccaaacctctggggagctctgctagcaat	1740		3661	aacctcctcatgccaattcagcaaccagataaacagctgagccctctataaagcagct	3720
581	I K Y K E E V E K T K G K A M G T A D S	600		1241	G E D A R H E Y T M T L G L P E F I R A	1260
1741	attaataataaagaagatataaagaagcaaaagggcaagccatgggaacagccgactct	1800		3721	ggagaggtgcaagacagagatacaatgacctggctgcccaggttcatcccgagca	3780
601	R L L H S L Q I A K M S S E I V E Y K K G	620		1261	K T N A A N L S D I A R Y K E S W R N L R	1280
1801	aggctctgcaactcctcgagattgctaagaatgagcagtgaggttgaatataaagaagcc	1860		3781	aaaagaatgcaagcaacctgagtgacgcaagatacaaaagagctctggcgtaactctg	3840
621	F E E S K T R F H L P M D M V N I R H A	640		1281	A Q G Y K L T I E A L P F O A A R A S G	1300
1861	tttgaagagatgaagccggttccactgcccattgatatgtaaacatcagctagct	1920		3841	gctcaaggctacaagctgacaatagaagcctccccctcagagctgcccgggctctgga	3900
641	K K A Q T L A S D I L D Y R K K L H E Y T	660		1301	D I A S D I F L Y R H D F V K E R G K L I	1320
1921	aagaagcccaaacctcgccagctgacctgacacaggaagaaactgcatgaatacact	1980		3901	gatagccagctgatttctctacagacatgactttgtgaagagcaggggaaactcata	3960
661	V L P E D M K T Q W A K K A Y G L Q S E	680		1321	G P Q S V R D D P R I Q H C R R R M G Q L	1340
1981	gtgctgctgaagatagaagactcagtgagcccaagagcctatggctccagagcag	2040		3961	ggcctccagagtgtaagagacgccccggatccagcagctgcccggctgagccagctg	4020
681	I L Q Y K A D L A W M K G V G W L T E G S	700		1341	Q S E I L Q Y R R G A T S S Q A Q F H L P	1360
2041	ctgcaagcaagctgacctgacatgagggagtggtgctgacagagggggagt	2100		4021	cagagcagcttcaagtcagagggggggcgacagcagcaagccagcttcaactctgccc	4080
701	L N L E Q A K K A G Q L V S E I K N Y R Q	720	S R 2	1361	M D M V H L V H A K N A Q A L A S D I H D	1380
2101	ctcaactggaacagcaagaagctggagcctggctcagcgagaaaaactaccgagcag	2160		4081	atggacatggtgacctggtccatgccaagaatgcccagggctctggcagcagccagcag	4140
721	R V D E L K F T S V T D S S Q M E H A K	740		1381	Y R T Q Y H K F T A L P E D L K M A W A	1400
2161	agggtcagatgagctgaagtccaccagctgacagcagctcccaagtgagacagccaaag	2220		4141	tacagagacacagatatacaagttcacagcactgcccagcagctggaagtgagctggccc	4200
741	K S Q E L Q S G I V A Y K A G N E Q S V H	760		1401	K K A H A L Q S E I L R Y K S D L I G M K	1420
2221	aagagccagagctacagaagcgggtggccctacaagcaggaatgagcagctctgctccat	2280		4201	aagaagcccatgccctgcaagtgagctgctgctacaagtcagacagctgagcagcaag	4260
761	Q Y T I S K D E P L F L Q A R A N A A N	780		1421	G I G W L A L R S P Q M E S A K K A G E	1440
2281	cagataccatcagcaagcagcagctctctctcagcagccagcccaagctgctcaaat	2340		4261	ggcataggatggctggcgtgagatccccacagatggagagtgaaagaagctggagaa	4320
781	L S E I K L Y K S S W E N Q K A K G F E L	800		1441	L I S E I T K Y R K K P D S I K F T V V A	1460
2341	ctcagcaggaactgtataaagcagctgggaaaacagaaagcaaaaggggtttagctg	2400		4321	ctcatcagcagcaagtaacgtaaaaaaacagacagctatcaagttcaccacagtggtt	1480
801	R L D S L T F L A A K A K R D L A S E I V	820		1461	D S P D L V H A K N S Y M H C N E I R M Y	1480
2401	cgcttgatctctgacctctctggcagcaaacagcaggggacctggctagcagagtg	2460		4321	gactccccagacctggttcatgccaagacagctatagctgcaatgagcagctatgat	1440
821	K Y K E D Y E R S R G K L I G A K D V Q	840		1481	R S G D A E S L H R Y T L I P D H P D F	1500
2461	aagtacaagagagatagagagatcccaagctccatggggcaaaaagatgtacag	2520		4441	agactggagatgcagaatccctgcaagatacacacctgatccccagccatccagatctt	4500
841	G D S Q M S H S L Q M S K L Q S E I L E Y	860		1501	T R A R L N A L H L S D I K V Y R N S W E	1520
2521	ggagattcgaatgagcactcactgcaaatgccaagctcagagtgagctggagctac	2580		4501	accogagctcgcctcaatggcgtgcatctgagtgcaaaagctctacagaaactcctggag	4560
861	K K G F E D T K S Q C H V S L D M V H L	880		1521	Q T R A G S Y D F R P D A I P P Q T A R	1540
2581	aagaagggatcgagagaccaaactcccaatgccaagctctccctggagatggtccacctc	2640		4561	cagaccgggctggcagctatgactcagggcggatgccaactccctccagactgcccgg	4620
881	V H A R K A Q H L A T D I V G Y K T A E H	900		1541	A S R E I A S D I F R Y K E A F L R D R G	1560
2641	gtcagctcccgaaagctcagctattagccacagcagctagctacaagacagcggaaact	2700		4621	gcatctaggagatcgccagcagcttccgttacaagaagcttctctcgggacagcagc	4680
901	H F T A L P T D M K V E W A K K A Y G L	920		1561	L Q I G Y R S V D D D P R M K H F L N V	1580
2701	cactttacggcttccccacagacatgaagtggaatgggccaagaagcttatggctta	2760		4681	ctcagatcggggtaccgagctgctcagcagatgccccagagatgaagcttctccaaagct	4740
921	Q S D I N Q Y R A D V K W M K G M G W A	940		1581	G R L Q S D I N E Y K K D F A K S R S Q F	1600
2761	cagagtgataaccaatacagcagatggaagtggaatgaagcctggctggctggctgccc	2820		4741	ggcagctccagagtgacaatgagtaacaagaagcttggcaagagctggtccagctt	4800
941	T G S L N V E Q A K K A G E L I S E I R K	960	S R 3	1601	H S S T D Q P G L L Q A K R S Q Q L A S	1620
2821	accggctcattaaatggagcagcgaagaagcagagaaactcattagcagagaagaag	2880		4801	cacagcagcacaagaccagcccctctcagggccaagagagcagcagctggccagt	4860
961	Y R Q H P D A L K F T S I K D T P E M V	980		1621	D I V H Y R Q P L P Q P T C D P E Q L H	1640
2881	taccgtcagctccagatgcttgaagttaccagatataaagacactccggagatggtc	2940		4861	gatgtcactacagcagcccctgccccagcccactggaccggcagcagctgggctcc	4920
981	Q A R I S Y T Q A V D I R L Y R E Q G E N	1000		1641	R H A Q K A H Q L Q S D I V K Y K S D L N	1660
2941	cagccagaattagtataccaagcagctgagatagattatacagggaaacaaggaagaaac	3000		4921	agcagctcagaagggcccacagctgagatgagctcaagataaaatcagacttgaac	4980
1001	I K H H Y T P T A D L P E V L L A K L N	1020		1661	L T R G V G W T P P G S Y K V E M A R R	1680
3001	ataaagcatcattacacaccagctgctgacctccctgagctctcctggccaagctgaat	3060		4981	ctgaccagaggtgtgctggaccctcctggctctcctacaagtggaatggctcggcgg	5040
1021	A M N I S E I T R Y K E S W S K L R D G C	1040		1681	A A E L A N A R G L G L Q I G A Y R G A E	1700
3061	gccatgaatcagtgagcagcttataaagatcctggagcaaacctcgagatggtgyc	3120		5041	gctcgggaactggccaacgcaagggcctggctcctcagggagcttaccggggcgagaa	5100
1041	Y K L R L D A L P F Q A A K A S G E I I	1060		1701	A V E A G D H Q S G E V N P D A T E I L	1720
3121	tataaactgaggtggactccatccaagcagcaaaagctctctggtgaatcata	3180		5101	gcagtgagcctggagatcatcagagtgaggggagtgaaacccagatgccactgagatctg	5160
1061	S D I Y K Y K E A F E K M K G Q M L G S R	1080		1721	H V K K K K A L L L *	1730
3181	agtgattacaatacaagagccttgagaaaatgaagagcagatgctgggttcccgg	3240		5161	cacgtcaaaaagaagggccctgctgttggagcctgtccaccctgatctccagaggg	5220
1081	S L E D D I S L A H S V Y A T S L Q S D	1100		5221	CCAGAGAGAGCTTTTGTCCACAGACAGCTTCCAGAGCTTTTGTTCAGCAAGCTGCAATGCCACCAGCCACCCACAGCTTTCTTTATTA 5220	
3241	agcttgaagatgatatcagctcgacattcagtgatgagcactcactgagagtgat	3300		5221	ATATACTCTGACAGC 5227	
1101	I V N Y K K G F E H S K A Q F H L P L D M	1120				
3301	gtgaattacaagaagccttgaacactcaaaagccagcttccatctgcccgttggagatg	3360				

Abbildung C.5 (Fortsetzung)



1	M S S E C D G G p K A V M N G L A P G S	20	
1	atgagttctgaatgtgatggtggtCccaaagctgtgatgaatggcttggcacctggcagc	60	
21	N G Q D K <b>A T A D P L R A R S I S A V K</b>	40	Exon 3
61	aatgggcaagacaaaagcaactgccgacccttaecgcgcacgctctatctctgctgttaaa	120	
41	<b>I I P V K T V K N A S G L V L P T</b> D M D	60	
121	atcatctcctgtgaagacagtgaaaaacgcctcaggcctagtctcctcctacagacatggat	180	
61	P T K I C T G K G A V T L R A S S S Y R	80	
181	cctacaaaaatctgcactgggaaggagcggtagctctccggcctcgtcttctctacagg	240	
81	E T P S S S P A S P Q E T R Q H E S K P	100	
241	gaaaccccaagcagtagccctgcgagccctcagaaacccggcaacacgaaaagcaaacca	300	
101	<b>G L E P E P S S A D E W R L S S S A D A</b>	120	Exon 5
301	ggctctggagccagagccttctcagcagatgagtgaggccttctcctcagtgctgatgcc	360	
121	N G N A Q P S S L A A K G Y R S V H P N	140	
361	aatggaaatgccagccctcttctcactcgtgccaaggcctacagaagtgtgcatcccaac	420	
141	L P S D K S Q <b>D A T S S S A A Q P E V I</b>	160	Exon 7
421	cttctctctgacaagtcccaggatgccacttctcctcagtgagccagccggaggtaata	480	
161	<b>V V P L Y L V N T D R G Q E G T A R P P</b>	180	
481	gttgtccctctctactctggttaataactgacagagggaagaaggcactgccagacctcca	540	
181	<b>T P L G P L G C V P T I P A T A S A A S</b>	200	
541	acacctctggggcctcttggctgcgtccccacaatcccagcgcactgcctctgcccctca	600	
201	<b>P L T F P T L D D F I P P H L Q R W P H</b>	220	
601	cctctgaccttcccagactctagatgatttcattccccctcatctgcagaggtggcccccac	660	
221	<b>H S Q P A R A S G S F A P I S Q T P P S</b>	240	
661	cacagccagccagcccgcgcctctggctcctttgccccatttagccagacgccaccatcc	720	
241	<b>F S P P P P L V P P A P E D L R R V S E</b>	260	
721	ttctcaccaccacctccgctggtccctcctgccccggaggacctccgcagagtctcggag	780	
261	<b>P D L T G A V S S T</b> D S S P L L N E V S	280	
781	cctgacctcacgggagctgtttcagtagtaccgattccagtcctctactaaatgaagtttct	840	
281	S S L I G T D S Q A F P S V S K P S S A	300	
841	tcttcccttattggaactgattcccaagcctttccatcagtttagcaagccttcatccgcc	900	
301	Y P S T T I V N P T I V L L Q H N R E Q	320	
901	tatccctccacaacgattgtcaatcctactattgtgctcttgcaacacaatcgagaacag	960	
321	Q K R L S S L S D P V S E R R V G E Q D	340	
961	caaaaacgactcagtagcctttcagatcctgtctcagaagaagagtgaggagcaggac	1020	
341	S A P T Q E K P T S P G K A I E K R A K	360	
1021	tcagaccaaacccagaaaaaacccacctcactggcaaggctattgaaaaagagcaaaag	1080	
361	D D S R R V V K S T Q D L S D V S M D E	380	
1081	gatgacagttagcgAgtggtgaagagcactcaggacttaagcagatgtttccatggatgaa	1140	
381	V G I P L R N T E R S K D W Y K T M F K	400	SoHo
1141	gtgggcatcccactccggaacactgagagatcaaaagactggtacaagactatgtttaa	1200	
401	<u>Q I H K L N R D D D S D L Y S P R Y S F</u>	420	
1201	cagatccacaactgaacagagatgatgattcagatctgtactctcccagatactcattt	1260	
421	S E D T K S P L S V P R S K S E M S Y I	440	
1261	tctgaagacaaaaatctccccttctgtgctcgtcaaaagtgagatgagctacatt	1320	

Abbildung C.7: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der klonierten humanen Ponsin-Variante ('Ps FL'). Alternativ gespleißte Exone sind benannt und in kursiver Fettschrift gedruckt, die zweiteilige Sorbin-Homologie-Region (SoHo) und die drei SH3-Domänen durch Unterstreichung gekennzeichnet. Die SP-/TP-Motive in der carboxyterminalen Insertion sind durch Boxen hervorgehoben, die Prolin-reiche Region (PRR) ist kursiv gedruckt und unterstrichen. Die Abweichungen von der genomischen Sequenz sind durch Großbuchstaben (Nukleotide) bzw. Kleinbuchstaben (Aminosäuren) gekennzeichnet [Nukleotide (Protein)]: T25C (S9P), A1943G (Q648R), A2290G (K764E), G3329T T3330G (G1110V), A3443G (E1148G).

441	D G E K V V K R S A T L P L P A R S S S	460	SoHo
1321	gatggtgagaaggtagctcaagaggtcggccacactaccctcccagcccgctcttctca	1380	
461	L K S S S E R N D W E P P D K K V D T R	480	
1381	ctgaagtcaagctcagaaagaaatgactgggaacccccagataagaaagtagaTacaaga	1440	
481	K Y R A E P K S I Y E Y Q P G K S S V L	500	
1441	aaatatcgtgcagagcccaagagcatttaCgaatatcagcctggcaagtcttccgttctg	1500	
501	T N E K M S R D I S P E E I D L K N E P	520	Exon 19
1501	accaacgaaaagatgagtcgggatataagcccagaagagatagatttaaagaatgaacct	1560	
521	W Y K F F S E L E F G K P   P P K K I W D	540	Exon 20
1561	tggataaaattcttttcggaattggagtttgggaacccgctcccaaaaagatatgggat	1620	
541	Y T P G D C S I L P R E D R K   T N L D K	560	Exon 21
1621	tatactcctggagactgctctatcctcctagagagatagaaagactaatctagacaaa	1680	
561	D L S L C Q T E L E A D L E K M E T L N	580	
1681	gatctcagcctctgccagacagagttagaggcagatttagaaaaatggagagcgttaat	1740	
581	K A P S A N V P Q S S A I S P T P E I S	600	
1741	aaagcaccagtgcaaacgtgccacagagctcagccatcagccctactccgaaaatttct	1800	
601	S E T P G Y I Y S S N F H A V K R E S D	620	
1801	tcagagactcctggatataatattcttccaacttccatgcagtggaaggggaatcagac	1860	
621	G A P G D L T S L E N E R Q I Y K S V L	640	
1861	ggggctcctgggatctcactagcttgagaatgagagacaaattataaaaagtgtcttg	1920	
641	E G G D I P L r G L S G L K R P S S S A	660	
1921	gaagtggtgacatccctcttGgggcctgagtgggctcaagcgaccatccagctctgct	1980	
661	S T K D S E S P R H F I P A D Y L E S T	680	
1981	tccactaaaagattcagaatcgcaagacattttataccagctgattacttggaatccagc	2040	
681	E E F I R R R H D D K E K L L A D Q R R	700	Exon 25
2041	gaagaatttattcgaagagctcatgatgataaaagagaacttttagcggaccagagacga	2100	
701	L K R E Q E E A D I A A R R H T G V I P	720	
2101	cttaaaccgagagaagaagaggtgatattgcagctcgacgccacacaggcgtcattccg	2160	
721	T H H Q F I T N E R F G D L L N I D D T	740	
2161	acgcaccatcagtttactactaatgagcgttttggggacctcctcaatatagacgatact	2220	
741	A K R K S G S E M R P A R A K F D F K A	760	SH3.1
2221	gcaaaaagaaatctgggtcagagatgagacctgccagagccaaatttgactttaagct	2280	
761	Q T L e E L P L Q K G D I V Y I Y K Q I	780	
2281	cagacactgGaggagttcctctgcagaaggagatattgtttacattataagcaaat	2340	
781	D Q N W Y E G E H H G R V G I F P R T Y	800	
2341	gatcagaactggtatgaaggagaacaccacggcgggtgggaatcttcccacgcacctac	2400	
801	I E L L P P A E K A Q P K K L T P V Q V	820	
2401	atcgagcttcttctcctgctgagaaggcacagcccaaaaagttgacaccagtgagggt	2460	
821	L E Y G E A I A K F N F N G D T Q V E M	840	SH3.2
2461	ttggaatatggagaAgctattgctaagtttaactttaatggtgatcacacaagtagaaatg	2520	
841	S F R K G E R I T L L R Q V D E N W Y E	860	
2521	tccttcagaaaaggtgagaggatcacactgctccggcaggtagatgagaactggtacgaa	2580	
861	G R I P G T S R Q G I F P I T Y V D V I	880	
2581	gggaggatcccggggacatcccgaagggatcttccccatcacctacgtggatgtgatc	2640	
881	K R P L V K N P V D Y M D L P F S S S P	900	
2641	aagcgaccactggtgaaaaacctgtggattacatggacctgcctttctcctcctcccca	2700	
901	S R S A T A S P Q F S S H S K L I T P A	921	Exon 30
2701	agtgcagtgccactgcaagcccacagttttccagtcacagcaagctcatcagccagcc	2760	
921	P S S L P H S R R A L S P E M H A V T S	940	
2761	ccctcatctctgccccactcccggcggcctgtccccggagatgcacgtgtcacctct	2820	

Abbildung C.7 (Fortsetzung)



941	<b>E W I S L T V G V P G R R S L A L</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T P</span> <b>P</b>	960	PRR
2821	gagtggatctcactgactgtgggggtcccaggcaggcgttctctggccctgacccccacc	2880	
961	<b>L P P L P E A S I Y N T D H L A L</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">S P</span> <b>R</b>	980	
2881	ttgcctcctctgccagaggcttctatctataaactgaccacctgccttgtcaccaagg	2940	
981	<b>A</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">S P</span> <b>S L S L S L P H L S W S D R P</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T P</span>	1000	
2941	gccagtcctcctctctcagcctccccatttgagttggtcagatgctccaccacca	3000	
1001	<b>R S V A</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">S P</span> <b>L A L P</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">S P</span> <b>H K T Y S L A P</b>	1020	
3001	cgatcagtagcttctccactggccctacctccccacacaaaacctactccctagcacct	3060	
1021	<b>T S Q A S L H M N G D G G V H</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T P</span> <b>S S G</b>	1040	
3061	acttcccaggcctcctGccatgaatggagacggtggtgtccacacgccatcttcaggc	3120	
1041	<b>I H Q D S F L Q L P L G S S D S V I S Q</b>	1060	
3121	atccaccaagatagcttcttgacgctgccgctggggagctctgatagtgatctcccag	3180	
1061	<b>L S D A F S S Q S K R Q P W R E E S G Q</b>	1080	
3181	cttagtgatgccttttagcagccagagcaagagcagccatggcgcgaagagatggacaa	3240	
1081	<b>Y E R K A E R G A G E R G P G G P K I S</b>	1100	
3241	tatgagagaaagcagagagggggggcaggcgaagaggccctggtggacccaagatctct	3300	
1101	<b>K K S C L K P S D v V R C L S T E Q R L</b>	1120	
3301	aagaagagctgcttgaagccttcagacgTGgtcaggtgcctgagtagtgaacagagactc	3360	
1121	<b>S D L N</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T P</span> <b>E E S R P G K P L G S A F P</b>	1140	
3361	tcagatctcaaccacctgaggagagccggccggcaagccctgggtagcgttttcca	3420	
1141	<b>G S E A E Q T g R H R G G E Q A G R K A</b>	1160	
3421	ggaagtggagctgagcagacagGcgcgcatagagtgccgagcagggcggggagaaagct	3480	
1161	<b>A R R G G S Q   L S H H S L R A G P D L T</b>	1180	Exon 31
3481	gctcggagaggtgggagccagcttctcatcattcattgagagcaggaccagatctcaca	3540	
1181	<b>E S E K S Y V Q P Q A Q Q R R V T P D R</b>	1200	
3541	gaactgaaagagctatgtcaacctcaagcccagcagcgaagagtcaacccccagcagg	3600	
1201	<b>S Q T S Q D L F S Y Q A L Y S Y I P Q N</b>	1220	SH3.3
3601	agtcaaacctcacaagatttatttagctatcaagcattatagctatataccacagaat	3660	
1221	<b>D D E L E L R D G D I V D V M E K C D D</b>	1240	
3661	gatgatgagttggaactccggatggagatcgcttgatgcatggaanaatgtgacgat	3720	
1241	<b>G W F V G T S R R T K Q F G T F P G N Y</b>	1260	
3721	ggatggtttgtgtgacttcaagaagacaaagcagtttggtacttttcaggcaactat	3780	
1261	<b>V K P L Y L *</b>	1666	
3781	gtaaaccttggatctataAAGAAGACTGAAAACCATGGAGATTATTTTTATTGGAGGAG	3840	
3841	GAAGCATCATTCAAGCCGATCTTTTGTAGTCACTAGGAAAATAATACAGTGATGATAAGTAAAGAACAAAAGACAGGGACAGAGAAGTGTGTG	3840	
3941	TTTAAACCCCAAGCTGTCTAAGGTTACTGTGTATTAGACAGGGCCGAACCTAGTGTCTGAGCAAAAAGAATTGAAGCAAAATTGTAATTTACTAGCCCGC	4040	
4041	TTCTGGGAGCCACTTCAGCCTTTCCCTCCCTCCACTTCTGGTAATCTGACCTGAAGCATAGTCCAGGAGCAGAGTTAGCCAGAAAATGCCTCTGCT	4140	
4141	GCCCGCTTTAGAGAGCTCCATCTCAATATTGAGCTGAAGCTTCAGCCCAAGAAATGCAACAGAGCCCAAGCTCAGATTTCTAGCTCCCTCGG	4240	
4241	AGCCAGCTGATCTGTAAGCCTCTGGAGGTCAGCTGAGTTCAGAGCTCTCTTGAAGAAAGGTGGATCCCCCACTGCCCAAGCAAAATCCCT	4340	
4341	CACCTAACCTGCTGAGTGTGGATGGGAAACAGAGCCAAACTGAGCCACTGATCCATTCAGCTGCTGTCAGCAGTGCCTTACTGCTCCTGATG	4440	
4441	TCAGAGAGAAACCCAGCAAGGTTTCCCATGAGAATTTGGGAGCAGATGGCCCAAGCAGATAGTTATGTCTGTTTCTGATGATGAAGTCAGGAAGCC	4540	
4541	CTGTGCTCTGGAGGCCACTTGTGGTTTCACTTTTCCCATATCTCTGGCTTTTGAAGATGGTTACCTTCAGGACAGTCCAGCTGCATTATCAGAGAC	4640	
4641	TATGCTAAGTTTTCTTCTGGCTGTGTTTTTCTGGACAGTTTGAATTTGGAGGCCCTATCTTCATAGAACACAAAATGATGTTCACTGATTCAT	4740	
4741	TTACATACACCAATGACTCTGCTGCTGGGGGACAAACCTAAGCAAGACATGCCAGGGTTTGCCTGGCTCCAGATCTACTCCCTGTAGAGTTCA	4840	
4841	AGATCACACACAGTACTACAGGTTGTATCTGATCAACCTGGCAAGCTCTCTTCAGAGTAAGCAGCAATTTCCCACTACAGAGTCA	4940	
4941	ACCCAGCCTCTGCTTTTGGGGCCAGATCAGAGAGAGAGGCCCTGTGAGCCCGGGCTCTGCTCACAACCTCTGTCCAATCTCAAGGATGTTA	5040	
5041	TCCGCTCTCTTAGATCTGAGTGAAGCAAAATACAGAAATGACCCATTTCCCTGCCACAGAACTCAGAGGTGATGGGGAGACTGACACAGGAAAATG	5140	
5141	AACTTAATCAAGAGACTGTGATGTGTGAAGAGGGTGTGAGGGAGGAGAGATGATTTTCCCTGGAGGGTCTTGAAGAACATGTCATATTCC	5240	
5241	ATCTCCATTAGCTCACTTTTAAACCACTAGGGTCTGGRAAGAACCTTGTCTGAGGGTAGTTCACTGCTGAAATACTTGAATATTTCCAGAGTCTCT	5340	
5341	AAACTCTCACTTCCCCACAGATACACATCCCAAGCTCACAAATAGGATAGCAATTTAGTGGTGGAGGTTGTGTACGGAAACCCCTGGCTGTCTGATA	5440	
5441	TATCTCAGAATTACCCAGGACATTTGCCAAAGCTCAGAGCTTTTACAGGTAGCAAAATTTGTTTTCAATGCCGTGGCTCAGCTGCTGTCAAAAT	5540	
5541	ACCATCTTAGATCCCACTAGCTTCCATCCCAACAGAGAGCCAGTACCCTCACTTCTCCCTATTTGTTTCAATTCCTGTTCTCAGAAAT	5640	
5641	ACCTGCCATTAATCTTACACTAAGTGTAAATGATGATAATAGGAATGACTTACTTCCCAACAGACATTTGTTTTAAGTATGACAGAGCAGG	5740	
5741	NCTTAATCCAAAGGAAAGGTTATGGAACCTGGAGGGGTGAGCTTTCTGGGTAGAGAGACTTCCGTAATTTCCAAACCCAGTAAAGTAAAGAC	5840	
5841	TGTTGTTTGGAGGTCGCTCCACCATCTAAGAGACTGTTTTTTTTTTTGTGTGTTGTTTACGGTCTTGGAGGAATAGTAAATAATGC	5940	
5941	ATATGCACTGCAATTTGCAAGCCAGCATTTCCAGCTGTGGACTGATTTGGCTAATGTGTTCTCTGGCTTTAGATGCAAAACCTAATAACACTATC	6040	
6041	TTACTCTATAGTTTTTTCAGGGTCTTCTGATAGTGGGAATTTTGAACCTCTTTAAATACAGCTAGAAAATAAACCAATTTGTAAGCCACAT	6140	
6141	TTGCATATGATGCCAGCTCAGGCAATTTGATATCTCCAGAAATTCAGATGTCCTCACAAATTTGCCCTCTTAAATAAATCTGTGTTAAATTTGC	6240	
6241	ATCCAGCTGGCTCTCTATGATGACGAAACAGAAACAGAGATTTCCAAATGCTTTTGTCTCCAGACATTTAGTAATAAAGTACCTATTTTATGC	6340	
6341	TGAATGTTTATACAGGTTTAAATAGCAAGTCAACTAATGGCCGATGCTTCCACACATTTTGAATATATAGCCATGCTCCGGGTAAAGGCA	6440	
6441	GCCCAACCTCTTATCTTTTGGCTCTCTGGGATCAGTAAAGAAAAAATAATGTGCTTAAAGTGGGACTGAAATAGTATATTTAACT	6540	
6541	TGTATAGCCATCTACCTACTCTGTATAGAAAATAATTTTAAAAATTTGAATGGAAGGGGTAAAGAGTCAATGAAGTTTTTTCGATTTTATTTAA	6640	
6641	ATGAGGAATCCCAATAACTCACCTACAGATTTTATGACAAAAATAGCCATTTAAAGTGTAAATTTACGATAAGTATCTATTGGGGAGAAAG	6740	
6741	TACTCTGATCTCAGTACAGTTTTTTTCCCTTTTAAATTCATATTTGGGTTTTGGTTTTGCACTCCATTTTATCTCAGTCTGATTTAAGTCTC	6840	
6841	ATTGCTAATATGTTACTACAAAAGGTTATATTTCCAGAAAAATGACTGACATATATATAACATTAATTTAAGTATGCCATTTAATATAC	6940	
6941	ACACTGACAGCTGCTATGCAAGACATGATTTTCTGCTCATTTTCTCTATGCACTGATGATTTGATAAATAGATGTTGAATTTACTAC	7040	
7041	ATTGCTGATCATATTTAATAAATTTATTCAGAAATTCCTGGCAAAAAAATAAAAAA	7104	

Abbildung C.7 (Fortsetzung)

# Anhang D

## Oligonukleotide

Tabelle D.1: Sequenzen der verwendeten Primer. Eingeführte MluI- und Sall-Schnittstellen sind fett gedruckt, MunI-Schnittstellen zusätzlich kursiv dargestellt. Eingeführte Fehlbasen sind in Großbuchstaben gedruckt. (\*) Das verwendete Konstrukt 'Pxn N-LD3' ist ein stabiles Proteolyseprodukt des ursprünglich beabsichtigten Konstrukts 'Pxn N-LD5.'

Protein	Sequenz 5'-3'	Bemerkungen
<b><math>\alpha</math>-Actinin 2</b>		
Actn2 fw	ttt <b>acg cgt</b> atg aac cag ata gag ccc ggc	
Actn2 rv	ttt <b>gtc gac</b> cag atc gct ctc ccc gta gag	
<b>CRP1</b>		
CRP1 fw	ttt <b>acg cgt</b> atg ccg aac tgg gga gga g	
CRP1 rv	ttt <b>gtc gac</b> ctc aga gtg gac caa ggc c	
<b>CRP2</b>		
CRP2 fw	ttt <b>acg cgt</b> atg cct gtc tgg gga ggt g	
CRP2 rv	ttt <b>gtc gac</b> ctg ggc atg aac aag agc c	
<b>FAK</b>		
FAK fw	ttt <b>acg cgt</b> atg gca gct gct tac ctt gac	
FRNK fw	ttt <b>acg cgt</b> atg gag tcc aga aga cag gcc	
FAK rv	ttt <b>gtc gac</b> gtg tgg tct cgt ctg ccc aag	
<b>MLP</b>		
MLP fw	aat <b>tac gcg tcc</b> aaa ctg ggg cgg agg cgc aaa tta	
MLP rv	ggc <b>gtc gac</b> ttc ttt ctt ttc cac ttg ttg tgt	
C58G fw	tga gtc gga gat cta cGg caa ggt gtg cta tgg	C58G Mutagenese
C58G rv	cca tag cac acc ttg cCg tag atc tcc gac tca	C58G Mutagenese
<b>Nck2</b>		
Nck2 fw	ttt <b>acg cgt</b> atg aca gaa gaa gtt att gtg	
Nck2 rv	ttt <b>gtc gac</b> ctg cag ggc cct gac gag g	

Protein	Sequenz 5'-3'	Bemerkungen
<b>N-RAP</b>		
aa0001fw	ttt <b>acg cgt</b> atg aat gtg cag ccc tgt tc	
aa0121rv	ttt <b>gtc gac</b> tct ctc att tgc cag tgg ctg	
aa0183rv	ttt <b>gtc gac</b> ttt ctt ggc cct ttg ata agc	
<b>Paxillin</b>		
Pxn fw	cga <b>cgc gtc</b> acg acc tcg acg ccc tgc tg	
PxnPRR fw	cga <b>cgc gtc</b> agt cta cca cct ccc aca tc	
PxnPRR rv	ttt <b>gtc gac</b> gcc cag gga cgt gct cat ta	
PxnLD5 rv	ttt <b>gtc gac</b> gca gac tcc ttt ggc gac tg	für 'Pxn N-LD3' (*)
Pxn rv	ttt <b>gtc gac</b> gca gaa gag ctt gag gaa gc	
<b>Ponsin</b>		
(g) Ponsin fw	ttt <b>acg cgt</b> atg agt tct gaa tgt gat gg	
(c) Ps Ex16 fw	ttt <b>acg cgt</b> tca gat ctg tac tct ccc ag	
(i) Ps Ex21 rv	ttt <b>acg cgt</b> atc tgc ctc taa ctc tgt ctg	
(h) Ps Ex23 rv	ttt <b>acg cgt</b> ctt cac tgc atg gaa gtt gg	für RT-PCR
Ps Ex25 rv	ttt <b>gtc gac</b> cat ctc tga ccc aga ttt cc	
(f) Ponsin rv	ttg <b>tcg act</b> aga tac aaa ggt ttt aca tag	
(III) Ps 3'UTR rv	ttt <b>gtc gac</b> cat gaa tga tgc ttc ctc ctc	im 3'UTR
(b) Ps Ex30,31 rv	ttt <b>gtc gac</b> atg aga aag ctg gct ccc acc	Übergang Ex30,31
(e) Ps FL Ex21 fw	agc ctc tgc cag aca gag tta gag gca g	'Ps FL' Klonierung
(k) Ps FL Ex21 rv	atc tgc ctc taa ctc tgt ctg gca gag g	'Ps FL' Klonierung
Ps SH3.1 fw	ttt <b>acg cgt</b> tca gag atg aga cct gcc ag	
Ps SH3.1 rv	ttt <b>gtc gac</b> tgc ctt ctc agc agg agg aag	
(I) Ps SH3.2 fw	ttt <b>acg cgt</b> aaa aag ttg aca cca gtg cag	
(d) Ps SH3.2 rv	ttt <b>gtc gac</b> cag tgg tcg ctt gat cac atc	
(II) Ps SH3.3 fw	ttt <b>acg cgt</b> gac agg agt caa acc tca c	
Ps Ex30 fw	ttt <b>acg cgt</b> aac cct gtg gat tac atg gac	
Ps Ex31 rv	ttt <b>gtc gac</b> tga ggt ttg act cct gtc ggg	
Ps PRR fw	ttt <b>acg cgt</b> ttt tcc agt cac agc aag ctc	
Ps PRR rv	ttt <b>gtc gac</b> gag gtg gtc agt gtt ata g	
Ps ΔEx31fw	ttt <b>acg cgt</b> ttt <b>caa ttg</b> caa cct caa gcc cag cag cg	MunI-Schnittstelle
Ps ΔEx31rv	ttt <b>caa ttg</b> gct ccc acc tct ccg agc agc	MunI-Schnittstelle
<b>Vektorprimer</b>		
(a) pACT2 fw	gtt tgg aat cac tac agg gat g	

# **Anhang E**

## **Vektorkarten**

Name des Plasmids: **pET23aEEF**

Länge: 3,6 kb

Herkunft: Firma Novagen (pET23a)

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

```

                                T7 Promotor
                                →
BglII
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC

XbaI                                rbs                                NdeI  MluI      SalI
TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACATATGACGCGTTTTGTTCGAC

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

CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAA

                                T7-Terminator
                                →
CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT

```

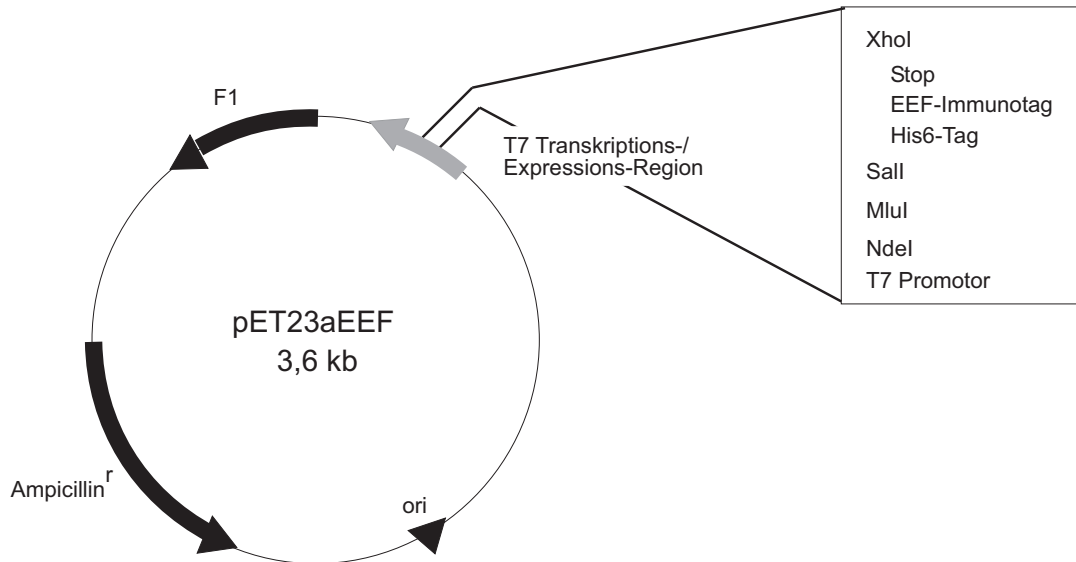


Abbildung E.1: Vektorkarte pET23aEEF

Name des Plasmids: **pET23aT7**

Länge: 3,7 kb

Herkunft: Firma Novagen (pET23a)

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

```

                                T7 Promotor
                                ----->
BglIII
AGATCTCGATCCCCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC

XbaI
TCTAGAAATAATTTTGGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACT
                                rbs                                NdeI  NheI
                                M A S M T

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

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

                                T7-Terminator
CTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAA
ACGGGTCTTGAGGGGT
    
```

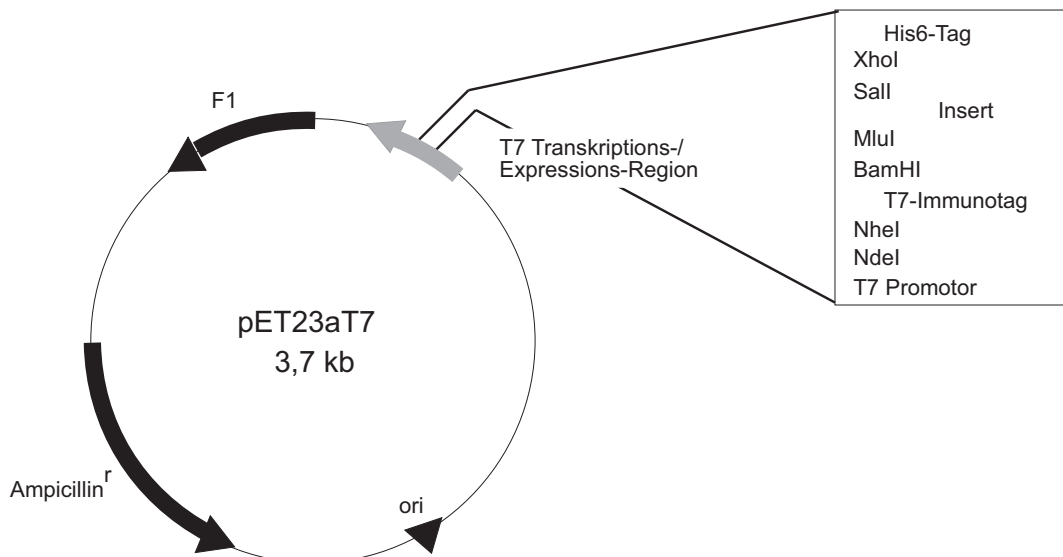


Abbildung E.2: Vektorkarte pET23aT7

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)

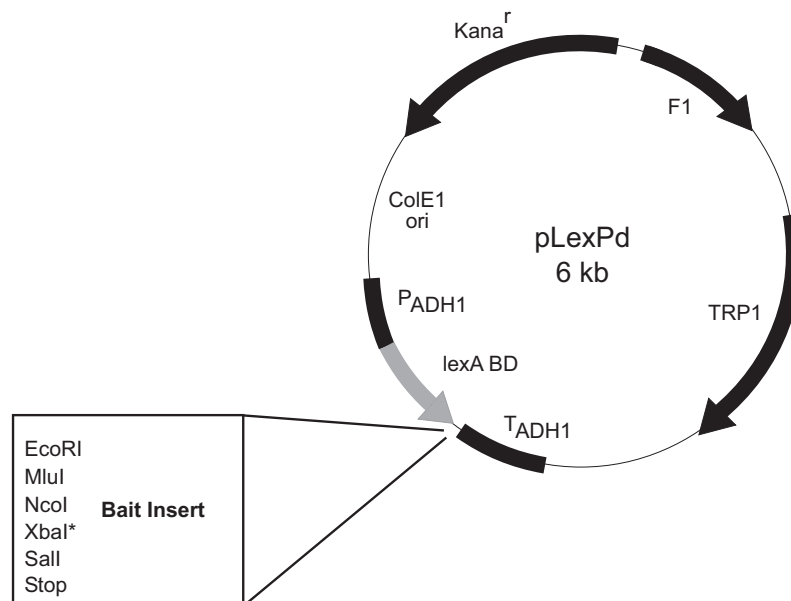
lexA DNA-Bindungsdomäne

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 Sall Stop
  
```



\* nicht unique!!!

Abbildung E.3: Vektorkarte pLexPd





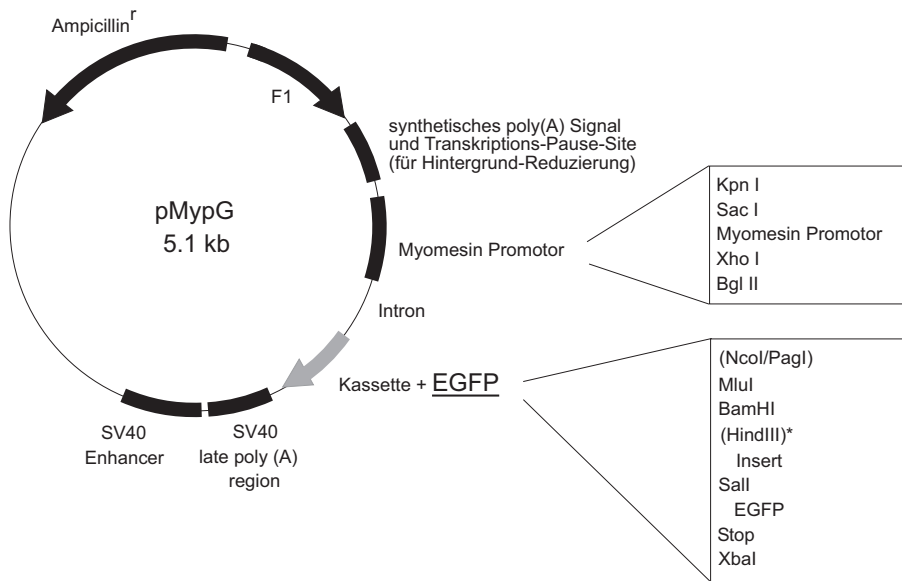
Name des Plasmids: **pMypG**  
 Länge: 5,1 kb  
 Herkunft: Firma Promega (pCAT3-Enhancer)

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

PagI cloned into NcoI

```

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



\* nicht unique!!!

Abbildung E.5: Vektorkarte pMypG

# Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dieter O. Fürst für die freundliche und kreative Arbeitsatmosphäre, die spannende Themenstellung und die fachliche Betreuung der Arbeit, sowie auch für seine ständige Gesprächsbereitschaft.

Bei Dr. Katrin Hayeß möchte ich mich für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen bedanken, für ihre Unterstützung und nicht zuletzt für ihre unendliche Geduld bei der 2D-Elpho. Dr. Peter F. M. van der Ven danke ich für die vielen Ratschläge und Tipps, die den Laboralltag effizienter werden ließen.

Mein Dank gilt auch Anita Guhlan und Bärbel Mai, deren Arbeit unverzichtbar für den Laborbetrieb ist. Vor allem möchte ich mich für die ungezählten Midi-Präparationen und zahlreichen Immunfluoreszenzfärbungen bedanken.

Ich danke selbstverständlich auch den Doktoranden und Diplomanden, Mirko Himmel, Padmanabhan (Pathoo) Vakeel, Thomas Löwe und Stefan Eulitz, die mir mit hilfreichen Diskussionen zur Seite standen.

Bei Prof. Dr. Karl-Josef Osterziel und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die fruchtbare Kooperation bedanken. Mein Dank gilt vor allem Christian Geier, der mich zum „Hobby MLP“ brachte und mir mit verständlichen Worten komplizierte medizinische Begriffe und Zusammenhänge verständlich machen konnte. Dr. Sabine Haßfeld danke ich nicht nur für mehrere Kilometer sequenzierter DNA-Stränge, sondern auch für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei Dr. Elisabeth Ehler möchte ich mich nicht nur für die zahlreichen NRC-Transfektionen bedanken, sondern vor allem auch für viele Anregungen in Emails und persönlichen Gesprächen. Ihre Erfahrung auf dem Gebiet „MLP“ hat mir so manches Mal weitergeholfen.

Dr. Sophie Haebel danke ich ganz herzlich für die massenspektrometrische Untersuchungen, ebenso Dr. Ute Krämer und Astrid Schröder für ihre Hilfe bei den Zinkmessungen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Walz, Prof. Dr. Micheel, Prof. Dr. Seckler und Prof. Dr. Müller-Röber für ihre Hilfe und Unterstützung.

# Lebenslauf

**Name** Katja Gehmlich

Geburtsdatum 18.02.1978

Geburtsort Rostock

## **berufliche Tätigkeit**

seit 08/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin  
an der Universität Potsdam  
im Institut für Biochemie und Biologie  
in der Arbeitsgruppe Zellbiologie (Prof. Fürst)

## **Studium**

1996 – 2001 Studium an der Universität Potsdam  
in der Fachrichtung Chemie

07/2001 Abschluss als Diplom-Chemikerin

## **Schulausbildung**

1984 – 1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule in Rostock

1991 – 1996 Christophorus-Gymnasium Rostock

Abschluss Abitur

# **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Potsdam, 03. Dezember 2004

Katja Gehmlich