

Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen und  
der *in vivo* Phosphorylierung des Sarkomerproteins  
Myomesin

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

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  
Mirko Himmel

Potsdam, im Dezember 2004

**Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:**

Hornemann T., Kempa S., Himmel M., Hayeß K., Fürst D. O., Wallimann T. (2003) Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *J. Mol. Biol.* 332:877-87.

Lange\* S., Himmel\* M., Auerbach D., Agarkova I., Hayeß K., Fürst D. O., Perriard J.-C., Ehler E. (2005) Towards a three-dimensional model of the sarcomeric M-band based on molecular interactions. *J. Mol. Biol.* 345:289–298. (\* beide Autoren leisteten den gleichen Beitrag)

Hayeß K., Himmel M., Fürst D. O. PKA dependent phosphorylation of myomesin is an indicator for cardiac hypertrophic signalling. *J. Mol. Cardiol.* In Vorbereitung.

## Kurzzusammenfassung

Für ein tiefergehendes Verständnis von Entwicklung und Funktion der quergestreiften Muskulatur ist eine Betrachtung der am Aufbau der Myofibrillen, den kontraktilen Organellen, beteiligten Proteine essentiell.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Myomesin, einem Protein der sarkomeren M-Bande. Zunächst wurde die cDNA des humanen Myomesins vollständig kloniert, sequenziert und nachfolgend die komplette Größe der aminoterminalen Kopfdomäne bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß Myomesin *in vitro* mit den Domänen 1 und 12 an Myosin bindet. Die muskelspezifische Isoform der Kreatinkinase bindet an die Domänen 7 und 8.

Stimulations- und Inhibitionsexperimente belegen, daß Myomesin an Serin 618 *in vivo* durch die Proteinkinase A phosphoryliert wird und daß diese Phosphorylierung durch Aktivierung  $\beta$ 2-adrenerger Rezeptoren stimulierbar ist. In Muskelgewebeproben von Patienten, die an der Hypertrophen Kardiomyopathie, einer genetisch bedingten Herzmuskelkrankheit, erkrankt sind, konnte mit einem neu hergestellten phosphorylierungsabhängigen Antikörper eine Verminderung der Menge phosphorylierten Myomesins nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen werden diskutiert.

Myomesin bildet Dimere, wie durch hefe-genetische und biochemische Experimente gezeigt werden konnte. Die Dimerisierung von Myomesin könnte eine zentrale Rolle für den Einbau der Myosinfilamente in die naszierende Myofibrille haben. Anhand der gewonnenen Daten wurde ein verbessertes Modell der zentralen M-Bande erstellt.

## Abstract

A deep understanding of the development and function of the sarcomeric muscle depends on the careful study of proteins involved in the assembly of myofibrills, the contractile organelles in cross-striated muscle.

This thesis deals with the sarcomeric M-band protein myomesin. First, the complete cDNA of human myomesin was cloned, sequenced, and subsequently the size of the aminoterminal head domain of myomesin was determined. Myomesin binds to myosin *in vitro* via domains 1 and 12. Musclespecific creatine kinase is binding to the domains 7 and 8 of myomesin.

Stimulation and inhibition experiments revealed, that serin 618 in human myomesin is phosphorylated *in vivo* by protein kinase A and that this phosphorylation can be stimulated by activation of  $\beta$ 2-adrenergic receptors. In muscle tissue of patients showing symptoms of the hypertrophic cardiomyopathy, a cardiac disease caused by genetic defects, the amount

of phosphorylated myomesin was lowered as detected by a phosphospecific antibody which was established new.

Myomesin dimerizes as shown by yeast two hybrid and biochemical experiments. Myomesin dimerization could be a central point in myofibrillogenesis, when myosin filaments were incorporated in nascent myofibrils. Taking all the data together, an improved model of the central M-band was developed.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	x
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Muskulatur	1
1.1.1 Die Struktur des quergestreiften Muskels	2
1.1.2 Proteine in der M-Bande	5
1.2 Modellvorstellungen zum Bau der sarkomeren M-Bande	9
1.3 Die Hypertrophe Kardiomyopathie ist eine genetische Erkrankung	11
1.4 Zielstellung dieser Arbeit	14
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Chemikalien	15
2.2 Kulturmedien	15
2.3 Antibiotika	15
2.4 Bakterien- und Hefenstämmen	16
2.4.1 DNA-Klonierung	16
2.4.2 Proteinexpression	16
2.4.3 Hefe-Doppelhybridsystem	16
2.5 Vektoren	16
2.5.1 Vektoren für Proteinexpression in Bakterien	16
2.5.2 Vektoren für Proteinexpression in Eukaryonten	17
2.5.3 Vektoren für das Hefen-Doppelhybridsystem	18
2.6 Molekularbiologische Methoden	18
2.6.1 Polymerasekettenreaktion	18
2.6.2 Reverse Transkriptase-PCR	19

2.6.3	Agarosegelelektrophorese . . . . .	19
2.6.4	DNA-Extraktion aus Agarosegelen . . . . .	20
2.6.5	Restriktionsverdau von DNA . . . . .	20
2.6.6	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA . . . . .	21
2.6.7	Ligation . . . . .	21
2.6.8	Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen . . . . .	22
2.6.9	Test der Transformationskompetenz von Bakterien . . . . .	23
2.6.10	Transformation kompetenter Bakterien . . . . .	23
2.6.11	DNA-Minipräparation . . . . .	23
2.6.12	Präparative DNA-Isolierung . . . . .	24
2.6.13	RNA-Isolierung aus Zellen . . . . .	24
2.6.14	Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA . . . . .	24
2.6.15	Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung . . . . .	25
2.6.16	Gezielte Hefe-Doppelhybridexperimente . . . . .	25
2.7	Proteinchemische und immunologische Methoden . . . . .	28
2.7.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> . . . . .	28
2.7.2	Mini-Expressionsanalyse . . . . .	28
2.7.3	Präparative Proteinexpression . . . . .	29
2.7.4	Reinigung rekombinanter Proteine . . . . .	30
2.7.5	Dialyse von Proteinlösungen . . . . .	32
2.7.6	Gewebe- und Zellextraktion für die SDS-PAGE . . . . .	32
2.7.7	Myosinreinigung aus Rinderskelettmuskel . . . . .	33
2.7.8	Proteinkonzentrationsbestimmungen . . . . .	33
2.7.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	34
2.7.10	Proteintransfer . . . . .	35
2.7.11	Immundetektion . . . . .	36
2.7.12	Verwendete Antikörper . . . . .	37
2.7.13	Herstellung eines monoklonalen Antikörpers . . . . .	37
2.7.14	Chemische Quervernetzung von Proteinen . . . . .	40
2.7.15	Flüssig-Festphasen-Experimente . . . . .	41
2.7.16	Proteinphosphorylierungen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> . . . . .	42
2.7.17	Stimulierung der PKA in kultivierten Zellen . . . . .	43
2.7.18	Phosphoproteinanalyse mittels 2D-Elektrophorese . . . . .	45
2.8	Biophysikalische Methoden . . . . .	47

2.8.1	CD-Spektroskopie . . . . .	47
2.8.2	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	48
2.9	Kultivierung von Säugetierzellen . . . . .	49
2.9.1	Zelllinien und Kulturmedien . . . . .	49
2.9.2	Auftauen, Passagieren und Einfrieren von Zellen . . . . .	51
2.9.3	Transiente Transfektionen . . . . .	52
2.10	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie . . . . .	52
2.10.1	Herstellung von Gefrierschnitten . . . . .	52
2.10.2	Immunfärbung von Zellen und Geweben . . . . .	53
2.10.3	Lichtmikroskopie . . . . .	53
2.10.4	Elektronische Bildbearbeitung der Mikrophotographien . . . . .	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1	Klonierung der humanen Myomesin cDNA . . . . .	55
3.1.1	Komplettierung der humanen Myomesin cDNA-Sequenz am 5'-Ende.	55
3.1.2	Korrektur der bisher publizierten cDNA-Sequenz des humanen Myomesins. . . . .	58
3.2	Phosphorylierung des humanen Myomesins . . . . .	62
3.2.1	Myomesin wird durch PKA phosphoryliert . . . . .	63
3.2.2	Herstellung eines phosphorylierungsabhängigen monoklonalen Antikörpers . . . . .	65
3.2.3	Phosphoryliertes Myomesin im hypertrophen Herzmuskel . . . . .	69
3.3	Myomesin interagiert mit der muskelspezifischen Kreatinkinase Isoform . .	74
3.4	Myomesin dimerisiert am Carboxyterminus . . . . .	75
3.4.1	Myomesin-Selbstassoziation im Hefen-Doppelhybridsystem . . . . .	75
3.4.2	Biochemische Charakterisierung der Dimerisierung . . . . .	75
3.5	Wechselwirkungen zwischen Myosin und Myomesin . . . . .	82
3.5.1	Biochemische Untersuchung der Myosin Myomesin Wechselwirkung	83
3.5.2	Charakterisierung einer weiteren Myosinbindungsstelle in Myomesin	84
3.5.3	Rekombinante Myomesindimere binden Myosin in COS-Zellen . . .	85
3.5.4	Lokalisation rekombinanter Myomesinfragmente in C2C12-Zellen . .	90
3.6	Analyse einer Mutation des humanen Myomesingens . . . . .	94
3.6.1	Spektroskopische Untersuchungen mutierter Myomesinfragmente . .	95
3.6.2	Biochemische Experimente mit mutiertem Myomesin . . . . .	98
3.6.3	Molekularbiologische Analyse des mutierten Myomesins . . . . .	99

<b>4 Diskussion</b>	<b>103</b>
4.1 Die vollständige Aminosäuresequenz des humanen Myomesins zeigt neue Eigenschaften des Proteins auf. . . . .	103
4.1.1 Die vollständige Kopfdomäne des humanen Myomesins . . . . .	104
4.2 Myomesin wird <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> durch PKA phosphoryliert. . . . .	106
4.2.1 PKA ist an der Entwicklung von Herzmuskelerkrankungen beteiligt	109
4.3 Kreatinkinase bindet an Myomesin und nicht an Titin . . . . .	111
4.4 Myomesin bildet <i>in vitro</i> Dimere . . . . .	112
4.5 Myomesin kann durch zwei Bindungsstellen mit Myosin interagieren . . . .	117
4.6 Eine Änderung der Eigenschaften des mutierten Myomesins ist <i>in vitro</i> nicht nachweisbar . . . . .	119
4.6.1 Faltung der mutierten Domäne 12 . . . . .	119
4.6.2 Myomesinminigene . . . . .	123
4.7 Ausblick . . . . .	123
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>126</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>129</b>
<b>A Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>B Oligonukleotidsequenzen</b>	<b>III</b>
<b>C Humane Myomesin cDNA Sequenz</b>	<b>IV</b>
<b>D Sequenzalignments</b>	<b>XI</b>
<b>E Vektorkarten</b>	<b>XV</b>
<b>F Kinase-Erkennungssequenzen in My1</b>	<b>XXIV</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Der Aufbau der Skelettmuskulatur . . . . .	2
1.2	. . . . .	3
1.3	Schematische Anordnung Filamente in einer Sarkomere . . . . .	6
1.4	Domänenorganisation in Myomesin . . . . .	7
1.5	M-Linie . . . . .	9
1.6	Dreidimensionales Modell M-Bande . . . . .	10
1.7	. . . . .	11
3.1	Klonierungsstrategie zur Herstellung der Myomesin cDNA . . . . .	56
3.2	Restriktionsanalyse der kompletten Myomesin cDNA . . . . .	58
3.3	Sequenzvergleich der Domäne 1 zwischen Mensch und Maus . . . . .	61
3.4	Hemmung der Phosphorylierung von My4–5 durch PKA-Inhibitoren . . . . .	63
3.5	Stimulierung der PKA-abhängigen Myomesinphosphorylierung in Zellen . . . . .	65
3.6	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von My4–5 . . . . .	67
3.7	Charakterisierung des Phosphomyomesinantikörpers . . . . .	68
3.8	Phosphoryliertes Myomesin in Herzmuskelgewebe . . . . .	69
3.9	Phosphomyomesin in Gewebeproben von HCM-Patienten . . . . .	72
3.10	Statistische Untersuchung Phosphomyomesin in HCM-Proben . . . . .	73
3.11	Quervernetzung von Myomesinfragmenten mit EGS . . . . .	76
3.12	Quervernetzung von Myomesinfragmenten mit EDC . . . . .	78
3.13	Einfluß von KCl auf rekombinante Myomesindimere . . . . .	79
3.14	Myomesindimere im Western Blot Overlay . . . . .	80
3.15	Phosphoryliertes Myomesin wird quervernetzt . . . . .	82
3.16	Neu kloniertes My1 bindet an Myosin . . . . .	83
3.17	Native Myomesinfragmente binden an Myosin . . . . .	84
3.18	Myosinfilamente in verschiedenen Zelltypen . . . . .	87

3.19	Expression Myomesinfragmenten und Myosin in COS-Zellen . . . . .	88
3.20	Aminoternale Myomesinkonstrukte und Myosin in COS-Zellen . . . . .	89
3.21	Carboxyterminale Myomesinkonstrukte und Myosin in COS-Zellen . . . . .	91
3.22	Myomesin My9–13 quervernetzt MHC in COS-Zellen . . . . .	92
3.23	Expression muriner Myomesinkonstrukte in C2C12-Zellen . . . . .	94
3.24	CD-Spektra von My9–11 Wildtyp und My12–13 Wildtyp/Mutante . . . . .	96
3.25	CD-Spektra von My11–12 Wildtyp/Mutante, My12 und My13 . . . . .	97
3.26	Mutiertes Myomesin dimerisiert und bindet Myosin . . . . .	99
3.27	ESE-Motive in Exon 32 . . . . .	100
3.28	Myomesin-Minigen . . . . .	101
4.1	Dreidimensionales Modell der M-Bande . . . . .	114
4.2	Sequenzvergleich zwischen den Domänen My13 und Mp13 . . . . .	115
4.3	Bindungspartner des humanen Myomesins . . . . .	118
4.4	Sequenzvergleich Domäne My12 . . . . .	120
4.5	Struktur einer Ig-Domäne . . . . .	121
4.6	Seitenketten interagieren im Kern einer Ig-Domäne . . . . .	122
C.1	Humane Myomesin cDNA . . . . .	V
C.2	Humane Myomesin cDNA - Fortsetzung . . . . .	VI
C.3	Humane Myomesin cDNA - Fortsetzung . . . . .	VII
C.4	Humane Myomesin cDNA - Fortsetzung . . . . .	VIII
C.5	Humane Myomesin cDNA - Fortsetzung . . . . .	IX
C.6	Humane Myomesin cDNA - Fortsetzung . . . . .	X
E.1	Vektorkarte pET23aEEF . . . . .	XVII
E.2	Vektorkarte pET23aT7 . . . . .	XVIII
E.3	Vektorkarte pET23aEEF . . . . .	XIX
E.4	Vektorkarte pMypG . . . . .	XX
E.5	Vektorkarte pMypM . . . . .	XXI
E.6	Vektorkarte pMypT7 . . . . .	XXII
E.7	Vektorkarte pCMV5-T7 . . . . .	XXIII

# Tabellenverzeichnis

1.1	Mutierte Gene bei HCM . . . . .	13
2.1	Antibiotikakonzentrationen . . . . .	15
2.2	Prozeßprofil für die genomische PCR . . . . .	19
2.3	Prozeßprofil für die RT-PCR . . . . .	20
2.4	Primärantikörper . . . . .	38
2.5	Sekundärantikörper . . . . .	38
2.6	Peptide für Immunisierungen . . . . .	39
2.7	Filtersätze . . . . .	54
3.1	Unterschiede zwischen Myomesin cDNA-Sequenzen . . . . .	60
3.2	Homologievergleich der Domäne My1 . . . . .	60
3.3	Übersicht HCM Gewebeprobe . . . . .	71
3.4	Ausschluß von Titin- und MM-CK-Interaktionen . . . . .	74
4.1	Lokalisation transfizierter Myomesinkonstrukte . . . . .	105
B.1	Oligonukleotidsequenzen . . . . .	III
F.1	Erkennungssequenzen für Proteinkinasen in My1 . . . . .	XXV

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Die Muskulatur

Der Drang zur Bewegung ist für jedes Tier mindestens zur Nahrungsaufnahme essentiell. Höhere Tiere sind darüber hinaus zur zielgerichteten Bewegung befähigt, für die sie spezialisiertes Gewebe, die Muskulatur, einsetzen. Die quergestreifte Skelettmuskulatur dient der für diese Bewegungsvorgänge nötigen Krafterzeugung und unterstützt gleichzeitig die Körperhaltung.

Ein Skelettmuskel besteht aus Bündeln (Faszien) von Muskelfasern, die durch Bindegewebshüllen umgeben sind. In den Muskelfasern liegen viele parallel angeordnete Myofibrillen, die eigentlich kraftgenerierenden Strukturen in der Muskelzelle. Der prinzipielle Aufbau eines Skelettmuskels wird schematisch in der Abbildung 1.1 gezeigt.

Unter dem Polarisationsmikroskop erkennt man in den Muskelfasern ein alternierendes Muster heller (isotroper) und dunkler (anisotroper) Streifen, anhand der man die Skelettmuskulatur als quergestreift klassifiziert und sie damit von den glatten Muskeln der Verdauungsorgane und des Blutgefäßsystems abgrenzt. Die Herzmuskulatur weist im polarisierten Licht ebenfalls eine Querstreifung auf, dieses Gewebe setzt sich aber aus einzelnen Y-förmigen Zellen, den Kardiomyozyten, zusammen. Die Muskelfasern der Skelettmuskulatur sind dagegen Synzytien, die durch Fusion mehrerer Vorläuferzellen, den Myoblasten, entstanden sind und deren Zellkerne peripher direkt an der Plasmamembran liegen. Die Muskelzellen sind terminal differenziert, die Regeneration verletzten Muskelgewebes erfolgt daher durch Aktivierung ruhender Myoblasten, sogenannter Satellitenzellen, die eng an den Muskelfasern anliegen und sich direkt unter der Basallamina befinden.

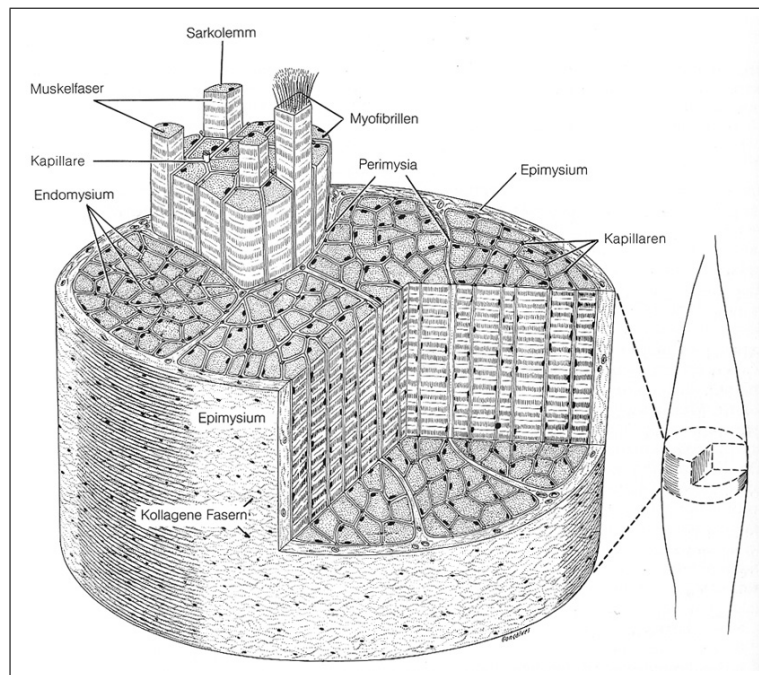


Abbildung 1.1: **Schematische Darstellung des Aufbaus der Skelettmuskulatur.** Die Abbildung zeigt den Feinbau eines Skelettmuskels (rechts angedeutet). Verschiedene Bindegewebshüllen umgeben den Muskel (Epimysium), fassen einzelne Muskelfaserbündel zusammen (Perimysium) und umgeben die einzelnen Muskelfasern. Jede Muskelfaser ist eine große Muskelzelle, deren Plasmamembran, das Sarkolemm, die in der Zelle gelegenen kontraktiven Myofibrillen umschließt. Die Zellkerne in einer Muskelfaser liegen peripher direkt am Sarkolemm. Blutkapillaren durchziehen den Muskel und dienen der Versorgung. Die Abbildung wurde entnommen aus Junqueira und Carneiro (1996).

### 1.1.1 Die Struktur des quergestreiften Muskels

Die lichtmikroskopisch sichtbare Querstreifung in den Muskelfasern wird durch die Myofibrillen verursacht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Längsschnittes durch einen Skelettmuskel zeigen in den Zellen eine regelmäßige Anordnung elektronendichter und durchlässigerer Banden, die A-Bande (anisotrop) und I-Bande (isotrop) genannt werden. In der A-Bande liegen dicke Bündel von Myosinfilamenten (Durchmesser 15 nm), in der I-Bande treten dagegen dünne Aktinfilamente (Durchmesser 7 nm) auf.

In der I-Bande ist eine besonders dichte Linie zu erkennen, die als Z(wischen)-Bande oder Z-Scheibe (*Z-disc*) bezeichnet wird. In ihr sind die dünnen Filamente verankert. Innerhalb der A-Bande fällt eine H(elle)-Zone auf, die bei vielen Muskelfasertypen von einer M(ittel-)Bande mit höherer Elektronendichte durchzogen wird. Myofibrillen beginnen und enden mit den Z-Scheiben. Sie begrenzen damit die kleinste kontraktile Einheit einer Muskelzelle, die Sarkomere (griech. *sarx*, *sarkos*, Fleisch). Die Abbildung 1.2 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Sarkomere.

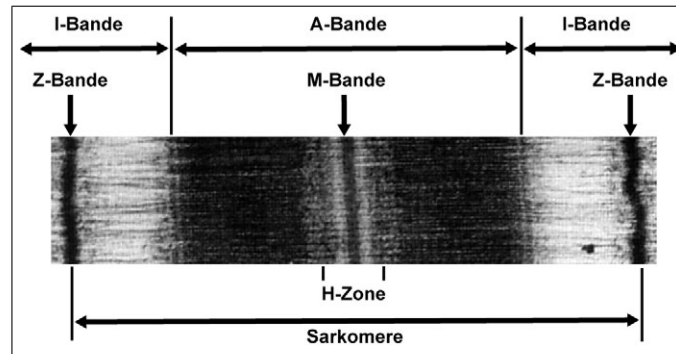


Abbildung 1.2: **Feinstruktur der Sarkomere im elektronenmikroskopischen Bild.** Eine Sarkomere wird von den Z-Scheiben begrenzt, in denen Aktinfilamente verankert sind. Diese Filamente verlaufen durch die I-Bande bis in die A-Bande und überlappen sich dort mit den Myosinfilamenten. In der Mitte der A-Bande befindet sich die H-Zone, in deren Zentrum die M-Bande liegt. Die Mikrophotographie wurde entnommen aus Fürst et al. (1988).

Die Myosinfilamente in der A-Bande bestehen aus einem makromolekularen Komplex einzelner Myosinhexamere, die aus zwei schweren Ketten (*myosin heavy chains*, MHC) und je zwei essentiellen und regulatorischen leichten Ketten (*myosin light chains*, MLC) bestehen. Die einzelne schwere Kette des Myosins besteht aus einem stäbchenförmigen Rückgrat (*myosin rod*) von 150 nm Länge und einer globulären Kopffregion mit einem Durchmesser von 20 nm.

Myosin kann durch proteolytischen Verdau in mehrere Fragmente mit unterschiedlichen Eigenschaften zerlegt werden. Mit Trypsin werden zwei Fragmente, ein carboxyterminaler Abschnitt, das *light meromyosin* (LMM), der rund Zweidrittel des Schaftes umfaßt und ein Fragment, das aus dem restlichen Teil des Schaftes und den beiden Myosinköpfchen besteht, das *heavy meromyosin*, (HMM) erzeugt. Das HMM-Fragment kann mit Papain in die kleineren Fragmente S1 (Kopffdomänen) und S2 (restlicher Schaft) zerlegt werden. Die S1-Fragmente können *in vitro* Aktinfilamente dekorieren und weisen eine ATPase-Aktivität auf.

Die zwei schweren Ketten des Myosins können unter Ausbildung einer sogenannten *coiled-coil* Struktur wechselwirken und ein Myosindimer bilden, an das die leichten Ketten binden. In der Muskelzelle, aber auch *in vitro* lagern sich viele hundert Myosinmoleküle zu großen, bipolare Filamente zusammen (siehe Schema in Abbildung 1.3). Der genaue Mechanismus dieser Filamentbildung ist noch nicht verstanden, aber es konnte ein repetitives Aminosäuresequenzmotiv im Myosin Schaft identifiziert werden, daß eine abwechselnde Folge positiver und negativer Ladungen aufweist, die mit den gleichartigen Motiven benachbarter Myosinmoleküle wechselwirken könnten (Sohn et al., 1997). Diese als *assem-*

*bly competence domain* (ACD) bezeichnete Region befindet sich am Carboxyterminus des Myosinmoleküls. Die ACD ist zwischen allen den Myosinisoformen aus Skelettmuskeln, aus glatter Muskulatur und in Nichtmuskelmyosin konserviert (Sohn et al., 1997).

Diese Art der Interaktion führt zu dem versetzten (*staggered*) Anlagerung der Myosinmoleküle an das wachsende Filament, wobei die 150 nm lange *bare zone* von den Myosinkopfdomänen ausgespart bleibt. Die *in vivo* beobachteten Myosinfilamente weisen eine Länge von 1,6  $\mu\text{m}$  auf, *in vitro* assemblierte Filamente sehen den *in vivo* gebildeten Filamenten sehr ähnlich, sie weisen aber eine wesentlich höhere Längenvarianz (0,5–2,4  $\mu\text{m}$ ) auf. Wie das Längenwachstum der Myosinfilamente *in vivo* reguliert wird, ist bisher noch nicht bekannt.

Die Krafterzeugung in der Sarkomere beruht auf der energieabhängigen Interaktion der dicken und der dünnen Filamente miteinander. Unter ATP-Verbrauch und vermittelt durch die Bewegung des Myosinmoleküls im Bereich des Kopfes und der angrenzenden Region gleiten die Aktin- und Myosinfilamente aneinander vorbei (sogenannter Querbrückenschlag), wobei sich die Z-Banden aufeinanderzubewegen. Dadurch verkürzt sich nicht nur die einzelne Sarkomere, sondern die ganze Myofibrille und in Summe der gesamte Muskel. Dieses Modell wird Gleitfilamenttheorie genannt und wurde beschrieben von Huxley und Niedergerke (1954); Huxley und Hanson (1954).

Mit diesem Zwei-Filament-Modell ließ sich jedoch eine wichtige Eigenschaft der Sarkomere nicht erklären: Die Sarkomere kann durch großen Zug soweit gestreckt werden, daß sich die Aktin- und Myosinfilamente nicht mehr überlappen. Läßt die Kraft nach, nehmen die Filamente wieder ihre ursprünglich Position ein, und der Abstand der Z-Scheiben entspricht dem vor der Belastung. Es gibt also ein weiteres System, das die Struktur der Sarkomere bestimmt und sie durch passive Spannung nach Belastung wieder in den Ruhezustand zurückführt.

Die Entdeckung des Titins bzw. Connectins (Maruyama et al., 1977; Wang et al., 1979) und seine gründliche Charakterisierung mittels Immunelektronenmikroskopie (Fürst et al., 1988, 1989) erbrachten Belege für die fundamentale Rolle, die Titin für den Aufbau der Sarkomere hat.

Titin ist das größte bisher beschriebene Protein. Es hat eine molekulare Masse von 3 MDa und besteht zum überwiegend Teil aus 112 immunoglobulin- und 132 fibronectinähnlichen Domänen. Titin ist mit seinem Aminoterminal in der Z-Scheibe verankert und erstreckt sich durch die Hälfte der Sarkomere bis in die M-Bande hinein (Fürst et al., 1988). Im Bereich der I-Bande scheint Titin elastisch zu sein, wie die abhängig vom Kontraktions-

zustand veränderliche Lokalisation entsprechender Titinepitope verdeutlichte (Fürst et al., 1988). Im Bereich der A-Bande verläuft Titin parallel und ist nicht flexibel (Trinick et al., 1984).

In der M-Bande treffen sich die Carboxytermini von zwei antiparallel aneinander vorbeilaufenden Titinmolekülen, die von beiden Seiten der Sarkomere Richtung M-Bande ausgehen, und überlappen dort (Obermann et al., 1996).

In der A-Bande fallen bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen 11 Längsstreifen auf, die in der sogenannten C-Zone innerhalb der A-Bande liegen. Sieben bis neun dieser Streifen werden durch C-Protein (*myosin binding protein C*, MyBP-C) verursacht (Craig und Offer, 1976). MyBP-C wurde ursprünglich als Kontamination von Myosinpräparationen („Verunreinigungsbande C“, daher der Name) identifiziert (Offer et al., 1973).

In der Z-Scheibe quervernetzen  $\alpha$ -Aktinindimere die Aktinfilamente, an die eine große Zahl weiterer Proteine bindet, die zusammen die elektronendichte Struktur der Z-Bande aufbauen. Die Aktinfilamente von zwei benachbarten Sarkomeren überlappen sich in der Z-Bande.

Die genaue Funktion der M-Bande ist noch nicht bekannt, sie könnte der Verankerung der dicken Filamente dienen. Jedoch nicht alle Muskelfasertypen weisen eine elektronenmikroskopisch sichtbare M-Bande auf. Eine gute Übersicht über die Proteine in der Sarkomere stellen Clark et al. (2002) vor.

### 1.1.2 Proteine in der M-Bande

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch verschiedene Bereiche der Sarkomere zeigen den Verlauf der dünnen und dicken Filamente und ihre Anordnung zueinander, wie in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt. In der I-Bande sind nur die Aktinfilamente zu sehen, in der A-Bande überlappen sich Aktin- und Myosinfilamente und in der H-Zone ist die hexagonale Anordnung der Myosinfilamente zu erkennen.

Die Abbildung 1.3 zeigt unten den schematischen Aufbau der bipolaren Myosinfilamente, von denen die Myosinköpfe nach außen gerichtet sind. Das Zentrum des Filaments wird durch die aneinandergelagerten Myosinsschäfte gebildet und ist frei von den globulären Kopfdomänen (sogenannte *bare zone*). Dieser Bereich liegt in der M-Region, die bei vielen Muskelfasertypen von der M-Bande durchzogen wird.

Bei der Betrachtung von Querschnitten in Höhe der M-Bande fallen elektronendichte Strukturen auf, die die Myosinfilamente miteinander zu verbinden scheinen und als M-Brücken bezeichnet werden (siehe Abbildung 1.3 Mitte). Diese M-Brücken enthalten ih-



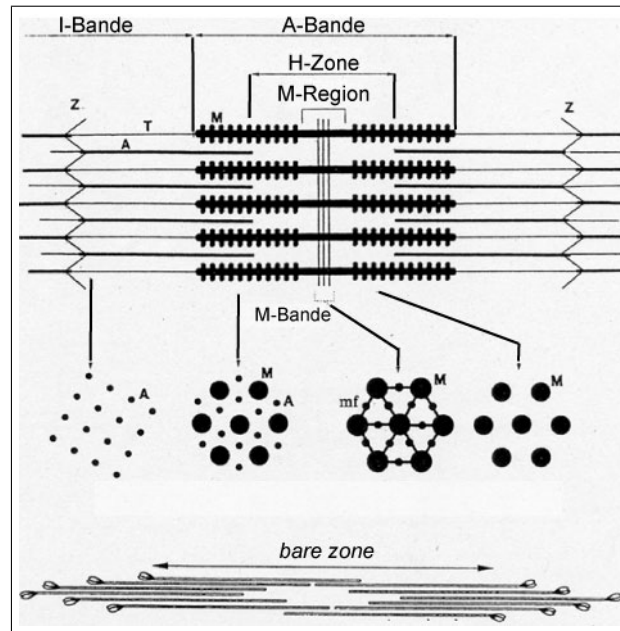


Abbildung 1.3: **Schematische Darstellung der Anordnung von Aktin- und Myosinfilamenten in der Sarkomere.** Der Aufbau einer Sarkomere ist hier schematisch wiedergegeben. Querschnitte durch verschiedene Regionen der Sarkomere zeigen eine unterschiedliche Anordnung dicker (M) und dünner (A) Filamente, die sich in der A-Bande überlappen. In der M-Bande sind die Myosinfilamente durch elektrodichtes Material, die M-Brücken verbunden. Die M-Brücken weisen zentral eine Struktur auf, die als M-Filamente (mf) bezeichnet wird. Unten ist der bipolare Aufbau eines Myosinfilaments aus antiparallel zusammengelagerten Myosinmolekülen, die eine Region ohne Myosinköpfe (*bare zone*) aufweisen, dargestellt. Die Abbildung wurde entnommen aus Squire (1997) und leicht modifiziert.

rerseits massereiche Strukturen, sogenannte M-Filamente, über deren molekularen Aufbau noch nichts bekannt ist.

Insgesamt konnte anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf die Existenz weiterer Proteine im Zentrum der Sarkomere geschlossen werden, die dort wahrscheinlich an Myosin binden.

Ein neues Protein wurde aus Myofibrillenextrakten isoliert und erhielt von seinen Entdeckern den Namen M-Protein (Masaki et al., 1968; Masaki und Takaiti, 1974). Mit der Immunelektronenmikroskopie konnte M-Protein als eine Komponente der M-Bande identifiziert werden (Eppenberger et al., 1981). M-Protein wird in der Skelett- und Herzmuskulatur entwicklungsabhängig exprimiert. M-Protein tritt im Verlauf der Myofibrillogenese zu einem späten Zeitpunkt auf, dann wenn die in die Myofibrillen eingebaute A-Bande bereits eine alternierende Querstreifung mit der Z-Bande ergibt. Im heranwachsenden Organismus kommt M-Protein anfangs in allen Muskelfasertypen vor, dann wird jedoch die Expression herunterreguliert und nur bei schnellen Muskelfasern (Typ II) später wieder hochreguliert.

In Typ I Fasern (langsame Muskeln) bleibt M-Protein dagegen abwesend (Grove et al., 1989; Grove und Thornell, 1988; Grove et al., 1987).

M-Protein hat eine molekulare Masse von 165 kDa und setzt sich aus insgesamt 13 Domänen zusammen. Einer Kopfdomäne, deren Sekundärstruktur unbekannt ist und die keine Homologie zu anderen Proteinen aufweist, folgen zwei Immunglobulindomänen, ein Block von fünf Fibronectindomänen und fünf weiteren Immunglobulindomänen. Die Klonierung der cDNA des M-Proteins von Huhn (Noguchi et al., 1992) und Mensch (Vinke-meier et al., 1993) ergab keine Hinweise auf weitere Isoformen des M-Proteins. Das Gen für M-Protein liegt auf Chromosom 8p23.3 (van der Ven et al., 1999).

Durch die Kreuzreaktivität eines Antikörpers gegen M-Protein wurde ein 185 kDa großes Protein gefunden (Grove et al., 1984), das den Namen Myomesin erhielt (nachdem sich die Umbenennung von M-Protein in *Myomesin*, siehe Eppenberger et al. (1981), nicht durchgesetzt hatte). Das humane Myomesin ist 185 kDa groß und weist den gleichen modularen Aufbau wie M-Protein auf. In Abbildung 1.4 wird die Domänenorganisation des Myomesins gezeigt,

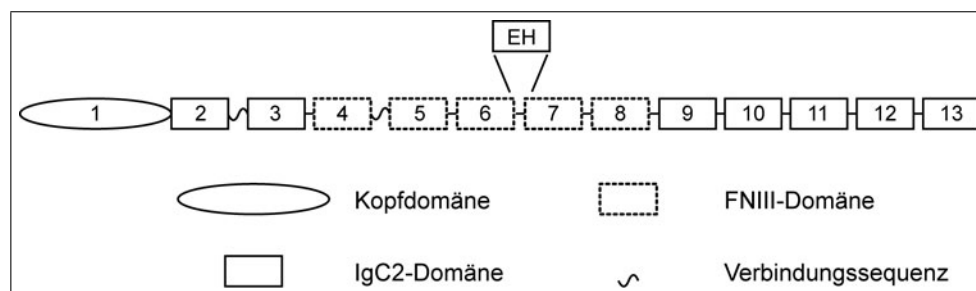


Abbildung 1.4: **Domänenorganisation im humanem Myomesin.** Myomesin besteht aus 13 Domänen. Einer singulären Kopfdomäne folgen zwei Immunglobulindomänen des Typs IgCII, die untereinander durch eine Linker-Sequenz verbunden sind. Daran schließen sich fünf Fibronectindomänen des Typs FNIII an, die zwischen den Domänen My4 und My5 ebenfalls eine Verbindungssequenz aufweisen. Den carboxyterminalen Teil des Myomesins bildet ein Block von fünf Immunglobulindomänen. Die embryonale Spleißvariante des humanen Myomesins enthält eine Serin- und Prolin-reiche Insertion (EH) zwischen den Domänen My6 und My7.

Die Sequenzidentität zwischen Myomesin und M-Protein beträgt trotz des gleichen Aufbaus nur 50 %. Das humane Myomesin umfaßt 105 kb genomischer Sequenz und liegt auf Chromosom 18p11.31-p11.32 (Speel et al., 1998). Die kodierende Sequenz ist in 37 Exons enthalten, durch alternatives Spleißen kann Exon 17 mit in den offenen Leserahmen eingebaut werden. Dadurch wird zwischen die Domänen My6 und My7 eine Serin-/Prolin-reiche Insertion eingefügt.

Myomesin wird im Gegensatz zu M-Protein in allen Muskelfasern exprimiert. Die durch

alternatives Spleißen entstehende Myomesinisoform wurde zuerst im embryonalen Herzmuskel beobachtet, weshalb sie EH-Myomesin genannt wird (Agarkova et al., 2000). Diese Isoform wurde ursprünglich für ein unabhängiges Protein, *Skelemin*, gehalten (Price, 1987; Price und Gomer, 1993). Steiner et al. (1999) konnten aber zeigen, daß Skelemin eine Spleißvariante des Myomesins ist. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß EH-Myomesin in geringer Menge auch in langsamen Muskelfasern nachgeweisbar ist (Agarkova et al., 2004). Bei Invertebraten konnte bisher kein Myomesin oder ein eng verwandtes Protein gefunden werden.

Im Huhn können insgesamt drei verschiedene Isoformen von Myomesin nachgewiesen werden. Zwei entstehen durch alternatives Spleißen am Carboxyterminus: Das Myomesinmolekül im Myokard des Huhns weist ein zusätzliches 100 Aminosäuren umfassendes Segment (Domäne 14) auf. Die Skelettmuskelisiform entspricht der des humanen Myomesins. Sie hat mit 174 kDa eine etwas kleinere molekulare Masse als die humane Variante. Auch im Huhn ist die embryonale Isoform des Myomesins nachweisbar.

Ein weiterer Bestandteil der sarkomeren M-Bande ist die muskelspezifische Isoform der Kreatinkinase, die MM-CK (Turner et al., 1973; Wallimann et al., 1983). Dieses Enzym liefert bei der Muskelkontraktion Energie in Form von ATP nach, indem es die in dem Kreatin-Phosphokreatin-System gespeicherten Phosphoatreste auf ADP überträgt.

Die MM-CK ist das Protein, das die M4/4'-Linien in der M-Bande verursacht, wie Strehler et al. (1983) durch Immunelektronenmikroskopie zeigen konnten. Dabei war lange nicht klar, ob die MM-CK in der M-Bande nur an andere Proteine gebunden ist oder ob sie selbst eine Stützfunktion ausübt.

In der M-Bande wurden weitere Proteine mit unterschiedlichen Funktionen identifiziert, deren genaue Lokalisation oder Interaktion mit Komponenten der M-Bande bisher nicht bekannt sind. Dazu zählen die Enzyme  $\beta$ -Enolase, Phosphofruktokinase und die Adenylatkinase (Agarkova et al., 2003).

Die an Signaltransduktionsprozessen beteiligten Proteine MURF1 und MURF2 (Pizon et al., 2002) wurden ebenso in der M-Bande detektiert wie Obscurin (Young et al., 2001) und DRAL/FHL-2 (Lange et al., 2002).

## 1.2 Modellvorstellungen zum Bau der sarkomeren M-Bande

Die sarkomere M-Bande wurde durch hochauflösende Elektronenmikroskopie (Luther und Squire, 1978, 1980; Luther und Crowther, 1984; Pask et al., 1994) bereits eingehend untersucht. Sie ist ungefähr 75 nm breit und weist in bestimmten Abständen charakteristische Linien auf, die durch eine höhere Elektronenundurchlässigkeit verursacht werden. An diesen Stellen ist der Proteingehalt offenbar höher als in der unmittelbaren Umgebung.

Die prominenteste dieser Linien wird als M1-Linie bezeichnet (Sjöström und Squire, 1977) und kommt in schnellen Muskelfasern sowie im Herzmuskel, nicht aber in langsamen Muskelfasern vor (Edman et al., 1988).

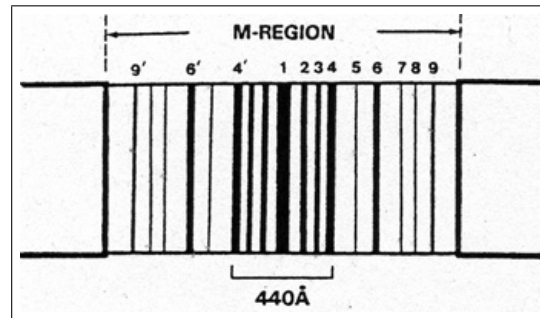


Abbildung 1.5: **Schematische Darstellung der Anordnung der M-Linien in der M-Bande.** Im Längsschnitt können in der sarkomeren M-Bande mehrere disrekte Linien mit höherer Elektronendichte beobachtet werden. Die Bezeichnung dieser M-Linien wurde von Sjöström und Squire (1977) eingeführt. Die zentrale M1-Linie fehlt in langsamen Muskelfasern, die M4/4'-Linien war dagegen in fast allen bisher untersuchten Sarkomeren sichtbar. Abbildung entnommen aus Pask et al. (1994).

Um die M1-Linie gruppieren sich je nach Muskelfasertyp und Spezies eine variable Zahl zusätzlicher Linien. Es konnten bisher insgesamt neun dieser Linie beobachtet werden. Die M4/4'-Linie wurde in fast allen bisher untersuchten Muskelfasern beobachtet. Eine Ausnahme ist der Herzmuskel des Huhns, in dem keine markante M-Bande zu finden ist (Strehler et al., 1983).

Ebenfalls prominent erscheinen die M6/6'-Linien am äußeren Rand der M-Bande. An dieser Stelle ist im Querschnitt weiteres elektronendichtes Material erkennbar, das die Myosinfilamente umhüllt (Luther et al., 1981). Die molekularen Grundlagen für diese Struktur sind nicht bekannt.

Aus den elektronenmikroskopischen Daten wurde von Luther und Squire (1978) ein erstes dreidimensionales Modell der M-Bande entwickelt, das in Abbildung 1.6 wiedergegeben wird.

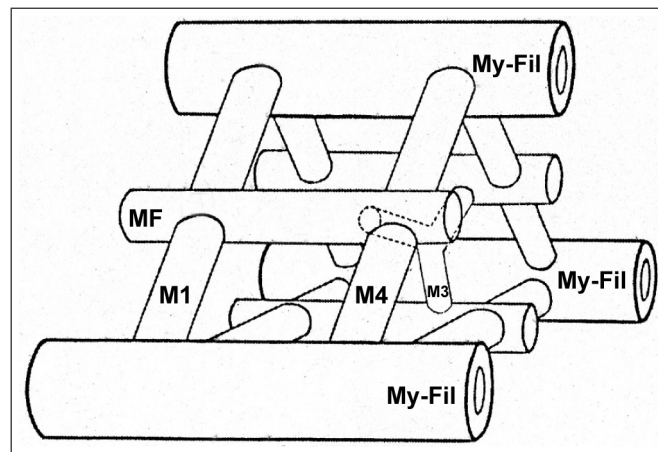


Abbildung 1.6: **Schema zum dreidimensionalen Aufbau der zentralen M-Bande.** Die Analyse transversaler und longitudinaler Dünnschnitte quergestreifter Muskelfasern ermöglichte die Entwicklung eines ersten dreidimensionalen Modells der M-Bande im Bereich der M1-Linie (Luther und Squire, 1978). Hier dargestellt sind Myosinfilamente (My-Fil), die durch die M1- und M4/4'-Brücken miteinander verbunden werden. Elektronendichtere Strukturen innerhalb der M-Brücken wurden als M-Filament (MF) interpretiert, die durch die M3/3'-Linien verbunden sind. Die Abbildung wurde aus Squire et al. (1987) entnommen und leicht modifiziert.

Mit diesem Modell wurden die verfügbaren Daten aus In diesem Modell werden die Myosinfilamente, die jeweils einen Abstand von 40 nm zueinander haben, durch M-Brücken miteinander verbunden, die ihrerseits durch sekundäre M-Filamente verknüpft sind. Ein alternatives Modell beschreibt eine Proteinhülle, die die dicken Filamente zwischen der M6- und M6'-Linie umgibt (Varriano-Marston et al., 1984).

Später konnte die Position einzelner Domänen der Proteine Myomesin, Titin und M-Protein in der Sarkomere durch Immunelektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden. Dadurch ergaben sich entscheidende Hinweise auf die Ultrastruktur der M-Bande. Durch biochemische Bindungsstudien konnten darüber hinaus Protein-Protein-Wechselwirkungen, die die M-Bandenproteine miteinander eingehen, identifiziert werden. Anhand dieser Daten wurde ein Modell der zentralen M-Bande vorgelegt, das in Abbildung 1.7 wiedergegeben wird. Mit diesem Modell war es erstmals möglich, den molekularen Aufbau der M-Bande näher zu beschreiben (Obermann et al., 1996). Die jeweils 250 kDa umfassenden Carboxytermini von zwei gegenläufigen Titinmolekülen durchziehen das Zentrum der M-Bande und enden in einem Abstand von 60 nm hinter der M1-Linie. Myomesin durchquert die Mitte der M-Bande ebenfalls, die Domäne My10 liegt dabei in Höhe der M1-Linie. Die weitere Orientierung des Myomesinmoleküls in der M-Bande wird durch seine Bindungspartner bestimmt. Mit der Kopfdomäne My1 bindet Myomesin an die Myosinfilamente und mit den Domänen My4–My6 an die Immunglobulindomäne mit des Titins. Nach dieser Vorstellung

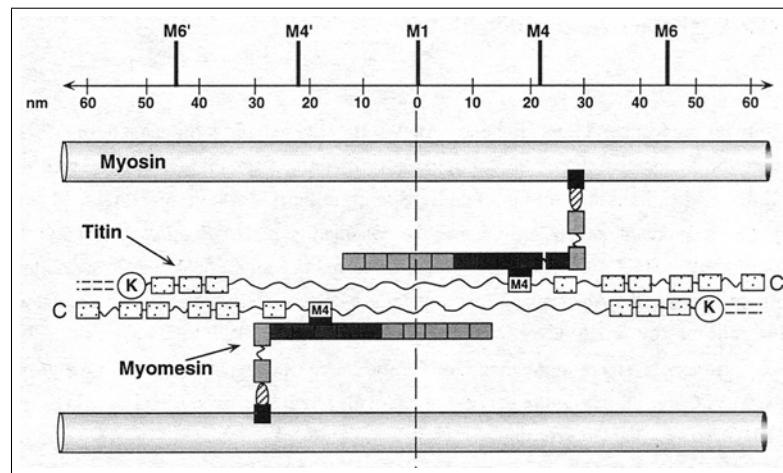


Abbildung 1.7: **Schematische Darstellung der Protein-Protein-Wechselwirkungen im Zentrum der M-Bande.** Ausgehend von Immunlokalisierungsdaten einzelner Domänen des Titins und Myomesins und biochemisch charakterisierten Protein-Interaktionen konnte ein molekulares Modell der zentralen M-Bande erstellt werden (Obermann et al., 1997). Gezeigt werden die prominenten M-Linien und darunter eine Skala mit Abständen in nm von der zentralen M1-Linie. Dargestellt sind Titin, Myomesin und die Myosinfilamente. Bei Titin sind die Domäne M4 und die Kinasedomäne hervorgehoben. Die Position des Myomesins wurde durch Epitopmarkierung und biochemische Bindungsversuche ermittelt (Obermann et al., 1997).

liegen die Myomesinmoleküle antiparallel in der M-Bande und folgen der Längsachse der dicken Filamente.

### 1.3 Die Hypertrophe Kardiomyopathie ist eine genetische Erkrankung

Die jahrzehntelange ständige Funktionalität des Herzmuskels ist für das Überleben und Wohlbefinden des Menschen unabdingbar. Verschiedene Krankheiten aber können die Leistung dieses spezialisierten Muskels beeinflussen, wobei deren Ursachen sehr unterschiedlich sind.

Eine Erkrankung des Myokards ist die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), die sich klinisch als eine Wandverdickung vor allem des linken Ventrikels und des interventrikulären Septums manifestiert und die sich von anderen hypertrophen Veränderungen des Herzmuskels durch eine fehlende erhöhte Volumenbelastung oder vermehrten hämodynamischen Streß als Ursache für die Hypertrophie unterscheidet. Die Diagnose kann mittels Echokardiographie gestellt werden, wobei eine Septumdicke von mehr als 10 mm ein Indiz für das Vorliegen einer HCM ist.

Die HCM wird häufig bei Kindern und jungen Erwachsenen im Alter von 10–25 Jahren beobachtet und ist die wichtigste Ursache für den plötzlichen Herztod (*sudden cardiac death*, SCD) in dieser Altersgruppe.

Ein späteres Auftreten wird bei älteren Erwachsenen mit einer Prävalenz von 1:500 Fällen beobachtet (Elliott und McKenna, 2004) und zeigt in vielen Fällen einen milderen Krankheitsverlauf als bei jüngeren Patienten (Marian und Roberts, 2001). Oft haben die älteren Patienten keine deutlichen Symptome und werden erst bei systematischen Untersuchungen auf Grund einer durch bildgebende Verfahren sichtbar gemachten Hypertrophie des linken Ventrikels als HCM-Patienten identifiziert. Wenn gesundheitliche Beschwerden auftreten, äußern sie sich als Brustschmerz, Atemnot oder unregelmäßigen Herzschlag (Arrhythmien), die unter körperlicher Belastung auftreten.

Für das Verständnis der Pathogenese der HCM war die Entdeckung genetisch bedingter Ursachen ein wichtiger Schritt: Das Auftreten einer Hypertrophen Kardiomyopathie konnte in einer großen Familie mit einem Locus auf dem Chromosom 14q1 in Verbindung gebracht werden (Jarcho et al., 1989). In diesem Bereich liegt das Gen für die kardiakale Myosinisoform  $\beta$ -MHC, das bei den Betroffenen der untersuchten Familie mutiert war (Geisterfer-Lowrance et al., 1990). Weitere Studien führten mittlerweile zur Identifizierung von über 100 Mutationen in 12 verschiedenen Genen, die mit der Entstehung einer HCM in Verbindung gebracht werden (Elliott und McKenna, 2004). Die betroffenen Proteine werden in der Tabelle 1.1 vorgestellt.

Da die von diesen Genen kodierten Proteine Bestandteile des kontraktilen Apparates in der Muskelzelle sind, wurde die HCM ursprünglich auch als Krankheit der Sarkomere bezeichnet (Thierfelder et al., 1994). Histologisch fallen im Myokard Bereiche ungeordneter Myozyten (*myocyte disarray*) auf, die Zellen variieren zudem in Größe und Form und gehen abnorme Zell-Zell-Verbindungen ein. Der interstitielle Zwischenraum ist vergrößert und mit Bindegewebe (Fibronisierung) ausgefüllt (zusammengefaßt in Elliott und McKenna (2004)). Physiologische Untersuchungen ergaben eine gestörte Kontraktilität der Myozyten (Marian, 2000), die möglicherweise direkt mit den Gendefekten in Verbindung steht.

Daneben finden sich aber auch Mutationen in Genen wie PRKAG2, welches für die  $\gamma_2$ -Untereinheit der AMP-aktivierten Kinase kodiert (Blair et al., 2001), oder in der mitochondrialen DNA (DiMauro und Schon, 2003; Taylor et al., 2003), die über einen beeinträchtigten Energiestoffwechsel der Herzmuskelzelle krankheitsauslösend wirken. Der PRKAG2-Gendefekt präsentiert sich interessanterweise klinisch als HCM (mit begleitendem Wolff-Parkinson-White-Syndrom, einer Fehlfunktion im Reizleitungssystem des Myokards), aber

Protein	Gen	Locus	Häufigkeit
$\beta$ -MHC	MHY7	14q12	$\approx 30$ %
MyBP-C	MYBPC3	11p11.2	$\approx 20$ %
Troponin T	TNNT2	1q32	$\approx 20$ %
$\alpha$ -Tropomyosin	TPM1	15q22.1	$\approx 5$ %
Troponin I	TNNI3	19p13.2	$\approx 5$ %
essentielle MLC	MYL3	3p21.3–p21.2	$< 5$ %
regulatorische MLC	MYL2	12q23–q24.3	$< 5$ %
$\alpha$ -Aktin	ACTC	11q	$< 5$ %
Titin	TTN	2q24.1	selten
Troponin C	TNNC1	3p21.3–p14.3	selten
$\gamma 2$ -Untereinheit der AMP-aktivierten Kinase	PRKAG2	7q36	n. b.
MLP	CRP3	11p15	n. b.

Tabelle 1.1: **An der Entwicklung einer HCM beteiligte Gene.** Die Lokalisation der betroffenen Gene auf den Chromosomen ist angegeben, ebenso die Häufigkeit, mit der das mutierte Gen an der Entstehung aller bisher untersuchten HCM-Fälle beteiligt ist. Die Proteine Myosin Bindungsprotein C (MyBP-C), Troponin T, I und C sind jeweils die herzmuskelspezifischen Isoformen. Verwendete Abkürzungen: MLC, Myosin leichte Kette; MLP, *muscle LIM protein*; n. b., nicht bestimmt. Nach Elliott und McKenna (2004); Marian und Roberts (2001); Geier et al. (2003).

histologisch lassen sich vermehrt Glykogenvakuolen in den betroffenen Myozyten ausmachen, weshalb man in diesem Fall von einer Speicherkrankheit mit dem gleichen Phänotyp wie der HCM bzw. einer Mimikry dieser Herzerkrankung spricht (Arad et al., 2002).

Im Rahmen einer systematischen Untersuchung von neun der bekannten Krankheitsgene für eine HCM in 197 Patienten, bei denen auf Grund klinischer Befunde, mittels Echokardiographie und Elektrokardiogramm diagnostiziert, eine Hypertrophe Kardiomyopathie festgestellt wurde (sogenannte Indexpatienten), konnte eine bekannte genetische Ursache für diese Krankheit nur in 63 % der Fälle sichergestellt werden (Richard et al., 2003). Die Autoren dieser Studie benennen Einschränkungen ihrer Untersuchung: Diese Patienten könnten falsch phänotypisiert worden sein, zudem könnten weitere, noch unbekannte Gene zur Entwicklung einer HCM beitragen. Es wurde zudem nur die kodierende Sequenz der neun Gene analysiert, Gendefekte in Intronsequenzen, die die Reifung der mRNA beeinflussen oder im Promotorbereich lagen, waren auf diese Weise nicht zwingend faßbar.

Eine einheitliche Hypothese zur Pathogenese der HCM kann nach dem bisherigen Stand des Wissens noch nicht abschließend formuliert werden (Ashrafian et al., 2003). So beobachtet man bei einer anderen Herzmuskelkrankheit, der Dilatativen Kardiomyopathie (DCM), neben den hauptsächlich von Mutationen betroffenen Genen von Zytoskelettproteinen (z.



B. Dystrophin, Desmin,  $\delta$ -Sarcoglykan) auch Defekte bei Proteinen, die zum kontraktilen Apparat der Kardiomyozyte gezählt werden (z. B. Aktin, Troponin,  $\beta$ -MHC). Daneben konnte in zwei verschiedenen Familien, bei denen Fälle von DCM auftraten, Mutationen im kardialen Myosin MYH7 gefunden werden, die aber interessanterweise andere Bereiche des Myosinmoleküls als bei den bisher bekannten HCM-Fällen betreffen (Kamisago et al., 2000). Die These, die HCM sei eine Krankheit der Sarkomere und die DCM eine des Zytoskeletts, wird daher zunehmend in Frage gestellt (Elliott und McKenna, 2004). Vielmehr könnten diese beiden Myopathien zwei verschiedene Ausprägungen der prinzipiell gleichen krankheitsauslösenden Veränderung der Kardiomyozyte sein.

## 1.4 Zielstellung dieser Arbeit

In vorausgegangenen Arbeiten hatten sich bereits angedeutet, daß Myomesin mehr Eigenschaften haben muß als von einem Strukturprotein zu erwarten war (Obermann, 1996; Steiner, 1997).

Für die Charakterisierung neuer Protein-Protein-Wechselwirkungen sollte zunächst eine vollständige cDNA des humanen Myomesins kloniert werden, um die Herstellung größerer rekombinanter Konstrukte zu ermöglichen. Dabei stellte sich heraus, daß die Myomesinsequenz am 5'-Ende bisher unvollständig war.

Ein anderer Ansatz war die Untersuchung der *in vivo* Phosphorylierung des humanen Myomesins. Hierzu sollte ein monoklonaler Antikörper hergestellt werden, um phosphoryliertes Myomesin in Zellextrakten und in fixierten Zellen nachweisen zu können. Durch die Stimulation und Inhibition von Proteinkinasen in kultivierten Zellen sollten Hinweise auf die an einer Phosphorylierung von Myomesin beteiligten Signalkaskaden erhalten werden.

Ausgehend von den bestehenden Vorstellungen über den molekularen Aufbau der M-Bande wurde die Funktion, die Myomesin in dieser Struktur haben könnte, näher beleuchtet.

Die mögliche Involvierung von Myomesin in die Entstehung einer Hypertrophen Kardiomyopathie sollte darüber hinaus mit proteinbiochemischen und biophysikalischen Methoden untersucht werden.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Laborchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma und hatten Analysequalität. Weitere Angaben finden sich bei den verwendeten Substanzen.

### 2.2 Kulturmedien

Die Zusammensetzung der Kulturmedien, die für mikrobiologische Arbeiten und für die Kultivierung von eukaryontischen Zellen gebraucht wurden, wird bei den einzelnen Methoden weiter unten aufgeführt. Medien, Lösungen und Wasser wurden in einem Varioklav Dampfsterilisator bei 125 °C und einem Betriebsdruck von 1,4 bar für 20 min bzw. 15 min bei glukosehaltigen Lösungen sterilisiert.

### 2.3 Antibiotika

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

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration</b>
Carbenicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Tabelle 2.1: Die verwendeten Antibiotika hatten die hier genannte Konzentration.

## 2.4 Bakterien- und Hefenstämmen

### 2.4.1 DNA-Klonierung

**E. coli JM109**, Firma Stratagene, Genotyp:  $e14^-$  (McrA $^-$ ) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17( $r_k^-$   $m_k^+$ ) supE44 relA1  $\Delta$ (lacproAB) [F' traD36 proAB lacI $^q$ Z $\Delta$ M15]

**E. coli XL1blue**, Firma Stratagene, Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI $^q$ Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet $^r$ )].

### 2.4.2 Proteinexpression

**E. coli BL21(DE3)CodonPlus(DE3)-RP**, Firma Stratagene, Genotyp: B F $^-$  ompT hsdS( $r_B^-$   $m_B^-$ ) dcm $^+$  Tet $^r$  gal  $\lambda$ (DE3) endA Hte [argU proL Cam $^r$ ]

**E. coli BL21(DE3)pLysS**, Firma Novagen, Genotyp: F $^-$  ompT hsdS $_B$ ( $r_B^-$   $m_B^-$ ) gal dcm $^+$  (DE3) pLysS (Cam $^r$ )

### 2.4.3 Hefe-Doppelhybridsystem

**Saccharomyces cerevisiae L40**, Firma Invitrogen, Genotyp: MAT $\alpha$  his3D200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2::(4lexAop-HIS3) URA3::(8lexAop-lacZ) GAL4.

## 2.5 Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vektoren verwendet, die auf Standardplasmiden basierten, aber teilweise modifiziert worden waren. Neben der folgenden kurzen Beschreibung der Plasmide finden sich die genauen Vektorkarten im Anhang.

### 2.5.1 Vektoren für Proteinexpression in Bakterien

#### pET23aW1

Für die DNA-Klonierung und Proteinexpression in *E. coli* wurde ein auf dem pET23a-Plasmid (Novagen) beruhender Vektor benutzt, dessen Klonierungskassette und Immunotag so verändert worden waren, daß exprimiertes Protein am C-Terminus eine Hexahi-

stidinesequenz gefolgt von einem Immunotag bestehend aus den Aminosäuren Glutamat, Glutamat und Phenylalanin (EEF) aufweist.

### **pET23aW2**

Dieser Vektor wurde ebenfalls von dem Plasmid pET23a abgeleitet. Exprimiertes Protein ist N-terminal mit einem T7-Immunotag (Aminosäuresequenz: MASMTGGQQMGR, Epitop aus dem aminoterminalen Teil von dem Capsidprotein des T7-Phagen) und C-terminal mit einer Hexahistidinesequenz versehen.

## **2.5.2 Vektoren für Proteinexpression in Eukaryonten**

### **pCMV5-T7**

Der Vektor pCMV5-T7 ist eine modifizierte Form von pCMV5 (Obermann et al., 1998) und wurde zur Klonierung in *E. coli* und Proteinexpression (Kontrolle durch Zytomegalievirus-Promotor) in eukaryontischen Zellen verwendet. Exprimiertes Protein war am Aminoterminus fusioniert mit dem T7-Immunotag.

### **pMyP-G**

Durch Umbau eines Vektors für CAT-Assays (Aktivierung der Chloramphenicol-Acetyltransferase als Reportgen), pCAT3-Enhancer (Promega, Mannheim), wurde ein Plasmid konstruiert, das eine Proteinexpression unter der Kontrolle eines stark aktiven Fragmentes des murinen Myomesin-Promotors ermöglicht (Basenpaare -569 und +122 des Myomesingens, vom Transkriptionsstartpunkt aus gerechnet, siehe (Steiner, 1997)). An das carboxyterminale Ende des exprimierten Proteins wird EGFP (*enhanced green fluorescence protein*) fusioniert, welches aus dem Vektor pEGFP-N3 (Clontech) in pMyP-G inkloniert wurde (Pacholsky, 2003).

### **pMyP-M**

Das Plasmid pMyP-M ist ein Derivat des oben genannten Plasmids pMyP-G, bei dem sich an das 3'-Ende der Klonierungskassette die Sequenz für den Immunotag *myc* anschließt (Aminosäuresequenz: EQKLISEEDL, ein Epitop aus dem humanen c-myc Onkoprotein).

### 2.5.3 Vektoren für das Hefen-Doppelhybridsystem

#### pLeXPd

Dieser Vektor ist ein Derivat des von der Firma Clontech angebotenen Plasmids mit umgebauter Klonierungskassette und wurde als sogenanntes Köderplasmid für die Suche nach Interaktionspartner in cDNA-Banken mit dem Hefe-Doppelhybridsystem verwendet. Die Expression rekombinanten Proteins steht unter der Kontrolle des Alkoholdehydrogenasepromotors. An den Carboxyterminus des Proteins wird eine LexA-DNA-Bindungsdomäne fusioniert.

#### pACTPd

Das Plasmid pACT2 (Clontech/BD Biosciences, Heidelberg) wurde so modifiziert, daß die Klonierungskassette u. a. die Restriktionsschnittstellen Mlu I und Sal I enthält. Dieser Vektor wurde für gezielte Hefe-Doppelhybridexperimente verwendet, er kodiert für die Aktivierungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4, die mit dem Aminoterminal des exprimierten Proteins fusioniert ist. Die Expression wird ebenfalls durch den Alkoholdehydrogenasepromotor reguliert.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

Die für die im folgenden beschriebenen molekularbiologischen Methoden verwendeten Enzyme und Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

### 2.6.1 Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1988) wurden ausgewählte Sequenzabschnitte der humanen bzw. murinen Myomesin-cDNA amplifiziert. Ein Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 100 ng Plasmid- oder Phagen-DNA, 20 pmol *sense* und *antisense* Primer (TIB Molbiol, Berlin), Enzympuffer und 2,5 U DNA-Polymerase, 200 µM Desoxyribonukleotide (Firma Roth) und steriles Aqua bidest. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Trioblock, Biometra, Göttingen) mit beheiztem Deckel durchgeführt. Das PCR-Prozessprofil bestand allgemein aus folgenden Schritten: *hot start*, 95 °C, 2 min lang, Denaturierung, Primeranlagerung (*annealing*) und Elongation. Die drei letztgenann-

ten Schritte wurden in 35 Zyklen wiederholt und dann ein letzter Elongationsschritt von 10 min Dauer durchgeführt. Nach Beenden der PCR wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt.

Für genomische PCR-Ansätze wurde ein *expand long template* Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Ein Ansatz enthielt 125 ng aus Blutproben gereinigte genomische DNA (zur Verfügung gestellt von A. Perrot). Das Prozeßprofil der PCR ist in Tabelle 2.2 wiedergegeben.

Denaturierung		94 °C	2 min	
10 Zyklen von	1. Denaturierung	94 °C	30 s	
	2. Anlagerung	60 °C	30 s	
	3. Elongation	68 °C	5 min	
25 Zyklen von	1. Denaturierung	94 °C	30 s	
	2. Anlagerung	60 °C	30 s	
	3. Elongation	68 °C	5 min	+ 20 s inkrementielle Verlängerung
Elongation		68 °C	10 min	
Aufbewahrung		4 °C	∞	

Tabelle 2.2: Amplifikate von genomischer DNA wurden mit dem aufgeführten Prozeßprofil erhalten.

Nach dem Ende der PCR wurde von jeder Probe ein 5 µl Aliquot zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.6.3). Die Ampilifikate wurden so auf ihre korrekte Länge hin überprüft, wobei ein DNA-Molekularmassenstandard als Referenz diente.

## 2.6.2 Reverse Transkriptase-PCR

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA wurde mit dem *SuperScript<sup>TM</sup> III One-Step RT-PCR System* Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA-Konzentration in einem Ansatz betrug 0,1 µg/µl. Das verwendete RT-PCR-Prozeßprofil wird in Tabelle 2.3 aufgeführt. Die Reaktionsprodukte der RT-PCR wurden mittels Agarosegelelektrophorese wie unter 2.6.3 beschrieben analysiert.

## 2.6.3 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurden je nach Trennproblem in unterschiedlichen Ausmaßen und mit unterschiedlichem Agarosegehalt hergestellt: 1 % (w/v) Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Azetat, pH 8,3, 1 mM EDTA) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, kurz abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und dann in eine Gelgießkassette

RT-Reaktion		50 °C	30 min
Denaturierung		94 °C	2 min
35 Zyklen von	1. Denaturierung	94 °C	30 s
	2. Anlagerung	60 °C	45 s
	3. Elongation	72 °C	1 min
Elongation		72 °C	10 min
Aufbewahrung		4 °C	∞

Tabelle 2.3: Die RT-PCR-Reaktion wurde mit dem hier wiedergegebenen Prozeßprofil durchgeführt.

überführt. Auftragesaschen wurden durch Einsetzen eines Kammes in die Gellösung erzeugt. Zur Analyse von DNA-Präparationen wurde die DNA-Lösung mit einem zehntel Volumen Probenpuffer (60 mM EDTA, 30 % (v/v) Glycerol, 0,5 ng/ml Bromphenolblau) versetzt und auf ein Agarosegel neben einem Molekularmassenstandard (*1 kb DNA ladder*, MBI Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Gele im UV-Durchlicht photographiert (GelDoc 2000, BioRad, München), wobei für die Präparation von DNA aus Agrosegelen als Schutz vor zu hohen UV-Lichtdosen eine Glasplatte unter dem Gel lag, und die Lichtintensität am Durchlichtkasten auf 75 % der Maximalleistung herabgesetzt wurde. Bilder wurden mit Hilfe der Digitalkamera der Dokumentationsanlage aufgenommen (256 Graustufen, 8 bit).

#### 2.6.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden im UV-Durchlicht durch Umfahren mit einer Skapellklinge markiert und bei ausgeschaltetem UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Gelstückchen wurden in Eppendorfgefäße überführt und die DNA entweder mittels Glasmilch (EasyPure Kit, Biozym, Hess. Oldendorf) oder über Säulen (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und in sterilem Aqua bidest. aufgenommen.

#### 2.6.5 Restriktionsverdau von DNA

Die für PCR-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide enthielten in den meisten Fällen die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen Mlu I (*sense*, am 5'-Ende des Amplifikats) und Sal I (*antisense*, am 3'-Ende). Unter Verwendung dieser Schnittstellen wurden DNA-Fragmente, soweit nicht anders beschrieben, in entsprechend aufgeschnittene Plasmide einkloniert.

### Analytischer Restriktionsverdau

Zur Kontrolle der Plasmide bzw. einklonierter DNA-Fragmente auf ihre korrekte Größe wurde ein analytischer Verdau durchgeführt. In einem 10 µl-Ansatz wurden 2,0 µl DNA-Lösung (ca. 200 ng bis 1 µg DNA) mit 2 U Enzym und 1,0 µl Enzympuffer (Puffer O<sup>+</sup>) oder 2,0 µl Y<sup>+</sup>/Tango Doppelverdaupuffer sowie mit sterilem Aqua bidest. zum Einstellen des Endvolumens versetzt und mindestens eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde mit Probenpuffer versetzt und durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.6.3) analysiert.

### Präparativer Restriktionsverdau

Ansätze zum präparativen Verdau von DNA enthielten 10 µg Plasmid- bzw. 1 µg PCR-Fragment, zweifach konzentrierten Y<sup>+</sup>/Tango Doppelverdaupuffer und je 10 U Restriktionsenzym. Das Endvolumen wurde auf 50 µl mit sterilem Aqua bidest. eingestellt. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde der Ansatz mit Probenpuffer versetzt und in die Taschen eines Agarosegels pipettiert. Elektrophorese und DNA-Extraktion erfolgten wie unter 2.6.3 und 2.6.4 beschrieben.

## 2.6.6 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestinal phosphatase*, CIP) wurde Plasmid-DNA am 5'-Ende dephosphoryliert, um eine Religation leerer Plasmide zu verhindern. Hierzu wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 1 U CIP (Roche Diagnostics, Mannheim), 4 µl 10x Enzympuffer und sterilem Aqua bidest. in einem Gesamtvolumen von 40 µl bei 37 °C für 30 min im Brutschrank inkubiert. Durch Einstellen der Konzentration von EGTA auf 5 mM im Ansatz und durch zehnmütige Inkubation bei 65 °C wurde das Enzym inaktiviert. Die Plasmid-DNA wurde mittels Elektrophorese und Gelextraktion gereinigt (siehe 2.6.3 und 2.6.4).

## 2.6.7 Ligation

Durch Restriktionsverdau vorbereitete PCR-Produkte oder aus Vektoren herausgeschnittene DNA-Fragmente wurden in mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmide eingefügt (Klonierung über kohäsive Enden) und diese mit Hilfe des Enzyms Ligase geschlossen. Ein Ligationsansatz enthielt 1 µg Vektor-DNA und den dreifachen Überschuß an Insert-DNA



(Abschätzung an Hand der Ethidiumbromidfluoreszenz im Agarosegel im Vergleich zu der bekannten DNA-Menge bestimmter Markerbanden), einfach verdünnten Enzypuffer und 5 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas). Das Endvolumen wurde mit sterilem Aqua bidest. eingestellt. Der gesamte Ligationsansatz wurde nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei Raumtemperatur oder nach Inkubation über Nacht bei 16 °C im Thermocycler zur Transformation von Bakterien (siehe 2.6.10) verwendet.

### 2.6.8 Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen

Glycerolstocks der verwendeten Bakterienstämme wurden als Suspension mit 30 % (v/v) Glycerol bei -80 °C gelagert. Bakterienzellen wurden, wie im folgenden beschrieben, kompetent für die Aufnahme von DNA-Plasmiden gemacht.

Von den Glycerolstocks wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine Übernachtskultur mit einem Volumen von 3 ml LB-Medium (1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 8,5 mM NaCl, pH 7,5) inokuliert. Nur für die Stämme *E. coli* BL21 wurde dem Medium ein Antibiotikum, Chloramphenicol, zugesetzt. Übernachtskulturen wurden auf dem Schüttler bei 350 rpm und 37 °C inkubiert. 50 ml vorgewärmtes LB-Medium, das bei Bedarf Chloramphenicol enthielt, wurde mit 5 µl Übernachtskultur angeimpft.

Die große Bakterienkultur wurde bis zum Erreichen einer O. D.<sub>600nm</sub> von 0,8–0,9 bei 37 °C und 175 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Im Kühlraum wurde die Kultur durch zweiminütiges Schwenken in Eiswasser abgekühlt und auf Eis weitere 28 min stehen gelassen. Zur Sedimentation der Bakterienzellen wurde in der Tischkühlzentrifuge (Universal 32R, Hettich, Tuttlingen) bei 0 °C und 2500 rpm 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich entfernt und das Pellet in 0,32 Volumina (hier 16 ml) frisch angesetztem, eiskaltem HD-Puffer (9,8 % (v/v) Glycerol, 10 mM K-MES-Puffer (0,5 M MES, pH 6,3 mit KOH eingestellt, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 45 mM MnCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurde wieder wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 0,25 Volumina (hier 4 ml) HD-Puffer resuspendiert.

Die Suspension wurde in 200 µl-Aliquots in Eppendorfgläsern portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die chemisch kompetent gemachten Zellen lagerten bei -80 °C.

### 2.6.9 Test der Transformationskompetenz von Bakterien

Durch eine Transformation (siehe 2.6.10) kompetenter Bakterienzellen mit Plasmid-DNA bekannter Konzentration wurde die Transformationskompetenz der Bakterien bestimmt. Folgende DNA-Menge wurden transformiert: 100 µg, 10 µg und 1 µg. Nach Übernachtsinkubation der Agarplatten wurde die Anzahl gewachsener Bakterienkolonien gezählt. Eine Zahl von 100 Einzelkolonien bei 10 µg eingesetzter DNA-Menge entspricht einer Kompetenz von  $1 \cdot 10^7$  Kolonien/µg Plasmid-DNA.

### 2.6.10 Transformation kompetenter Bakterien

Von eingefrorenen kompetenten Bakterienzellen (siehe 2.6.8) wurden 100 µl Aliquots mit 10 µl Ligationsansatz oder 1 µg Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. In einem Wasserbad wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42 °C und 80 s Dauer ausgesetzt und dann sofort 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl SOC-Medium (2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose, pH 7,0) wurde eine Stunde lang bei 37 °C auf dem Eppendorfschüttler inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend bei 6000 rpm fünf Minuten lang sedimentiert, erneut in 100 µl Überstand suspendiert und auf einer LB-Agarplatte 1,5 % Bacto-Agar, 1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 8,5 mM NaCl, pH 7,5, die die entsprechenden Antibiotika zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterienzellen enthielt, ausplattiert. Die Platte wurde im Brutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag ließen sich Übernachtskulturen für DNA-Päparationen oder Proteinexpressionen animpfen.

### 2.6.11 DNA-Minipräparation

Kleinere Mengen Plasmid-DNA wurden aus transformierten Bakterienzellen durch schnelle Lyse der Zellen und Fällung der DNA isoliert. Von 3 ml einer Übernachtskultur wurden 1,5 ml Bakteriensuspension in Eppendorfgefäßen 5 min lang bei 6000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge Pico, Heraeus) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl TELT-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4 % (v/v) Triton X-100) resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bakterielle Proteine wurden durch zweiminütiges Erhitzen bei 95 °C denaturiert. Die Reaktionsgefäße wurden 5 min auf Eis gekühlt, und durch Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min) in der Tischzentrifuge wurden denaturierte Proteine, Zellwandtrümmer usw. pelletiert. Mit sterilen Zahnstochern wurde

dieses Pellet aus den Eppendorfgläsern entfernt. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand mit 0,8 Volumina Isopropanol gefällt, 15 min lang bei 13.000 rpm abzentrifugiert und einmal mit 2 Volumina 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und zuletzt in 50 µl sterilem Aqua bidest. aufgenommen. Durch Zugabe von 1 µl einer RNase A-Stammlösung (10 mg/ml) und Inkubation von 15 min wurde mitgefällte RNA zerstört. Nach zehnmütigem Erwärmen auf 65 °C wurde die DNA-Lösung kurz zentrifugiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

### 2.6.12 Präparative DNA-Isolierung

*High copy* oder *low copy* Plasmide wurden im präparativen Maßstab unter Verwendung eines Kits (*QIAGEN Plasmid Midi Kit*, Qiagen, Hilden) aus 25 oder 50 ml Übernachtskultur von *E. coli* JM109 entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.6.14).

### 2.6.13 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Reinigung von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der RNA-Präparation wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.6.14).

### 2.6.14 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von in TE-Puffer gelöster DNA wurde durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzglaszelle mit 1 cm Schichtdicke (Hellma, Mühlheim) mit einem Cary 50 Spektralphotometer (Varian, Darmstadt) bestimmt.

Für die Berechnung wurde zugrunde gelegt, daß eine Lösung doppelsträngiger DNA mit einer Konzentration von 50 µg/ml bei dieser Wellenlänge eine optische Dichte von 1,0 aufweist. Die Extinktion der Lösung bei 280 nm wurde herangezogen, um durch Ermittlung eines Reinheitsfaktors (Quotient aus den Extinktionswerten bei 260 und 280 nm) den Grad der Verunreinigung mit Proteinen abschätzen zu können. Nur DNA-Lösungen mit einem Reinheitsfaktor größer als 1,8 wurden für weitere Experimente wie transiente Transfektionen verwendet.

Gereinigte RNA wurde in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, verdünnt und die Konzentration und Reinheit bei 260 nm und 280 nm gemessen. Für die Konzentrationsberechnung wurde angenommen, daß 1 O. D. 40 µg/ml RNA entsprechen.

### 2.6.15 Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung

Oligonukleotide für die PCR oder DNA-Sequenzierung wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, bezogen. Plasmid-DNA wurde entweder mit einem Kit im Midi-Maßstab (siehe Abschnitt 2.6.12) oder nach dem gleichen Protokoll im Mini-Maßstab ohne Säule gereinigt und durch die Firma Agowa, Berlin, sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Programmen aus der EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY OPEN SOFTWARE SUITE, EMBOSS, Version 2.8.0 (Rice et al., 2000), die der Sequenzierchromatogramme mit dem Programm TREV, Version 1.8b1, aus dem STADEN PACKAGE, Version 2003.0b1 (Bonfield et al., 2004).

### 2.6.16 Gezielte Hefe-Doppelhybridexperimente

Protein-Protein-Interaktionen wurden auch mit gezielten Hefe-Doppelhybridexperimenten untersucht. Teile der cDNA zweier bekannter Interaktionspartner wurde in die Plasmide pLexPd (Köderplasmid) und pACTPd (Beuteplasmid) kloniert und sequentiell in Hefen des Stammes *S. cerevisiae* L40 transformiert.

In diesen Hefen werden zwei Reportergene durch den LexA-Operator kontrolliert: das HIS3-Gen (Histidinauxotrophie) und das lacZ-Gen ( $\beta$ -Galaktosidase). Köder und Beute werden als Fusionsproteine mit einer LexA-DNA-Bindungsdomäne bzw. einer Transkriptionsaktivierungsdomäne in der Hefezelle exprimiert und in den Zellkern transloziert. Interagieren die beide Proteine, entsteht ein Komplex, der als heterologer Transkriptionsfaktor wirkt und die Transkription der Reportergene aktiviert.

Eine erfolgreiche Doppeltransformation ließ sich durch Selektion der transformierten Hefen sicherstellen, denn in dem Stamm L40 sind Gene, die für die Synthese der Aminosäuren Tryptophan und Leuzin notwendig sind, deletiert. Tryptophanauxotrophie wird durch das Köderplasmid, Leuzinauxotrophie durch das Beuteplasmid ermöglicht. Die Bindung der beiden Proteine ließ sich dann durch Nachweis der Reportergenaktivität (Wachstum der Hefen auf Histidin-Mangelmedium und Nachweis von  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität) zeigen.

### Prätransformation von Hefen

Im ersten Schritt wurden L40 Hefezellen mit dem Köderplasmid transformiert. Dazu wurden von einer Vorratskultur Hefen in YPD-Medium (0,2 % (w/v) Pepton, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,2 % (w/v) Dextrose) 3 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 30 °C auf einem Schüttelinkubator bei 300 rpm inkubiert. Von dieser Kultur wurden 1,5 ml in der Tischzentrifuge bei 6000 rpm 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 µl Transformationsmix (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, 0,1 mg Heringssperma-DNA, 16 % Polyethylenglykol 4000) resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde mit 0,1 Volumina DMSO versetzt und 12 min im Wasserbad auf 42 °C erwärmt. Die Hefezellen wurden auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (6000 rpm, 5 min) und einmal mit sterilem Aqua bidest. gewaschen, zentrifugiert, in 80 µl Aqua bidest. aufgenommen und auf einer Selektionsplatte ausplattiert (DOB-Agar mit allen Aminosäuren außer Tryptophan: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar in DOB-Medium: 0,17 % (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,2 % (w/v) Dextrose, 0,5 % (w/v) NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, Firma QBiogene; das Aminosäuresupplement ohne Tryptophan wurde von der Firma Clontech bezogen). Die Platte wurde im Brutschrank bei 30 °C so lange inkubiert, bis die Hefekolonien einen Durchmesser von mindestens 2 mm hatten (3–5 Tage).

### Kotransformation von Hefen

Mit prätransformierten Hefen wurden 50 ml DOB-Medium (ohne Tryptophan) inokuliert und 16–20 Stunden bei 30 °C und 135 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Von dieser Kultur wurden 1 ml-Verdünnungen in frischem DOB-Medium hergestellt, um das Volumen der Hefensuspension zu bestimmen, das eine optische Dichte von 0,2–0,3 bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektralphotometer ergibt. Anschließend wurde das entsprechende Volumen zentrifugiert und das Zellpellet in 300 ml YPD-Medium aufgenommen.

Diese Kultur wurde ungefähr 3 Stunden weiter inkubiert, bis Werte für die optische Dichte von  $O.D._{600\text{ nm}} = 0,4\text{--}0,6$  erreicht wurden. Dann wurden die Hefen bei Raumtemperatur sedimentiert (3000 rpm, 5 min, Tischkühlzentrifuge, Rotor 1617), mit 50 ml sterilem TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) gewaschen, zentrifugiert und in 1,5 ml sterilem Lithiumacetat-TE-Puffer (100 mM Lithiumacetat in TE-Puffer) resuspendiert.

Für jedes im Beutepiasmid befindliche Konstrukt, das kotransformiert werden sollte, wurde in einem Eppendorfgefäß der folgende Transformationsansatz zusammengestellt: 0,1 µg Plasmid-DNA wurden mit 0,1 mg Heringssperma-DNA und 100 µl Hefensuspension gemischt, dann mit 600 µl steriler PEG-Lithiumacetatlösung (40 % (w/v) Polyethylenglykol

4000, 100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) versetzt und 10 s kräftig durchmischt (Vortex). Diese Suspension wurde 30 min bei 30 °C im Thermomixer 5436 (Firma Eppendorf) bei 1000 rpm geschüttelt und nach Zugabe von 70 µl DMSO 15 min im Wasserbad bei 42 °C inkubiert.

Nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz 5 min im Eisbad gekühlt. Die Hefen wurden durch kurze Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 s, 13000 rpm) sedimentiert, das Pellet mit sterilem Aqua bidest. gewaschen und in 1 ml vorgewärmtem YPD-Medium aufgenommen. Nach 20–60 min Inkubation im Thermomixer bei 30 °C und 1000 rpm wurden die Hefen erneut kurz pelletiert, mit sterilem Aqua bidest. gewaschen und in 500 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurden je 100 µl auf Selektionsplatten ausgestrichen.

Mit DOB-Agarplatten wurde zunächst auf Tryptophan- und Leuzinauxotrophie, d. h. auf erfolgreiche Kotransformation, selektiert (DOB-Agar-LW). Die Platten wurden mehrere Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert, bis die Hefekolonien einen Durchmesser >2 mm erreicht hatten.

### **Test auf Histidinauxotrophie**

Kotransformierte Hefekolonien wurden zum Nachweis der Histidinauxotrophie (Reporter-genaktivierung) auf einer Dreifachselektionsplatte ohne Leuzin, Tryptophan und Histidin (DOB-Agar-LWH) ausgestrichen und die Platte bei 30 °C im Brutschrank 3–5 Tage inkubiert. Interagierten die zwei zu untersuchenden Bindungspartner, wuchsen die Hefen zu deutlich sichtbaren Kolonien heran, die mit der Digitalkamera der Geldokumentationsanlage fotografiert wurden.

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

Der Nachweis von  $\beta$ -Galaktosidase sollte die LexA-Promotoraktivierung unabhängig vom Wachstumstest auf dem Histidin-Mangelmedium beweisen. Von einer Doppelselektionsplatte (DOB-Agar-LW, siehe 2.6.16) wurden 4–6 Hefekolonien auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S85, Porengröße 0,45 µm, Firma Schleicher & Schuell, Dassel), die auf einer frischen Doppelselektionsplatte (DOB-Agar-LW) lag, überimpft und mehrere Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert bis die Hefekolonien eine geeignete Größe (Durchmesser >2 mm) hatten.

Die Membran wurde sechsmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellwände der Hefen zu zerstören. Eine Petrischale wurde zur Herstellung einer feuchten Kammer verwendet: Ein Blatt Filterpapier wurde mit X-Gal-Färbelösung (60 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,3 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,85 mg/ml X-Gal) getränkt, von dem die Färbelösung in die darauf liegende Membran diffundierte. Die geschlossene Petrischale wurde im Brutschrank 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) wird durch  $\beta$ -Galaktosidase zu einer farbigen Verbindung (5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-Indigo) umgesetzt. Hefekolonien, in denen das  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen aktiviert wurde, färbten sich blau. Diese Färbung wurde photographisch mit der Farbdigitalkamera festgehalten und die Intensitätsunterschiede in Tabellenform vermerkt.

Die vorgenannten Nachweismethoden wurden auch auf einzeln mit Köder- und Beutekonstrukt transformierte Hefen angewendet, um diese Konstrukte auf Autoaktivierung der Reportergene zu untersuchen.

## 2.7 Proteinchemische und immxunologische Methoden

### 2.7.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die Proteinexpression wurde das pET-Expressionssystem der Firma Novagen verwendet, das gute Expressionsraten und Vorteile für die Expression zytotoxischer Proteinfragmente bietet (Novagen, 2003).

Von mit pET-Plamiden transformierten Bakterien der Stämme *E. coli* BL21 wurden zunächst Vorkulturen angelegt: Es wurde entweder eine Einzelkolonie von einer Agarplatte oder eine kleine Menge von einer Glycerolkultur mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in 3 ml LB-Medium mit den Antibiotika Carbenicillin und Chloramphenicol über Nacht im Schüttelinkubator (Certomat BS-1, B. Braun Biotech International, Melsungen) bei 350 rpm und 37 °C inkubiert.

Die in Kultur genommenen Bakterien wurden dann mit einer Mini-Expressionsanalyse auf Expression des rekombinanten Proteins hin überprüft (siehe 2.7.2).

### 2.7.2 Mini-Expressionsanalyse

Von einer Vorkultur wurde 1 ml zu 3 ml frischem LB-Medium, das die Antibiotika Carbenicillin und Chloramphenicol enthielt, gegeben und eine Stunde wie vorstehend beschrieben

inkubiert. Der Rest der Vorkultur wurde im Kühlraum aufbewahrt.

Eine Kontrollprobe (Negativkontrolle vor Induktion der Proteinexpression) von 500  $\mu\text{l}$  wurde entnommen, mit 6000 rpm in der Tischzentrifuge 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 50  $\mu\text{l}$  einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer (auf 65 °C vorgewärmt) resuspendiert.

Die Proteinexpression wurde mit 0,1 mM Isopropyl-Thio- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (IPTG) induziert. Nach 2–3 Stunden wurde ein Aliquot wie oben beschrieben entnommen und behandelt (Positivkontrollprobe). Von beiden Kontrollproben wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 2.7.9). Von der im Kühlraum gelagerten Vorkultur wurde bei erfolgreicher Expression ein Glycerolstock angelegt. In ein Eppendorfgefäß wurden 500  $\mu\text{l}$  reines Glycerol vorgelegt, zu dem 500  $\mu\text{l}$  Bakterien-suspension pipettiert wurden. Durch mehrmaliges Schwenken wurde das Glycerol mit der Suspension gemischt. Die Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.7.3 Präparative Proteinexpression

Von einer Vorkultur wurde 1 ml in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und die Bakterien bis zu einer optischen Dichte von 0,6–0,8 Extinktionseinheiten (gemessen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600$  nm) bei 37 °C und 175 rpm in einem 500 ml Rundkolben im Schüttelinkubator (Certomat BS-1, B. Braun Biotech International, Melsungen) herangezogen. Eine Negativkontrollprobe wurde wie oben genannt entnommen. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert.

Nach 2–3 Stunden wurde eine Positivkontrollprobe abgenommen, und die Bakterien wurden in der Kühlzentrifuge (Sorvall RC 5B Plus, Rotor GSA) bei 4 °C und 6000 rpm durch fünfzehnminütige Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20 °C gelagert.

Mit diesem Standardprotokoll konnten je nach verwendetem Expressionskonstrukt 2–5 mg rekombinantes Protein hergestellt werden, das war für viele proteinbiochemische Versuche ausreichend. War die Ausbeute rekombinanten Proteins unzureichend, weil das exprimierte Protein eine mittlere bis starke Zytotoxizität aufwies, die zu einer Verlangsamung des Bakterienwachstums, geringeren Zellzahl bei Beenden der Proteinexpression, geringen Expressionsrate im Vergleich zu anderen Konstrukten führte, oder wurden größere Proteinnengen als genannt für bestimmte Experimente (CD-Spektroskopie, Antigengewinnung) benötigt, mußte das Protokoll, wie im folgenden näher beschrieben, modifiziert werden.



### **Vergrößerung des Kulturvolumens und Erhöhung der IPTG-Konzentration**

Das Kulturvolumen wurde auf bis zu 1 l erhöht und in 200 ml-Portionen aufgeteilt und in Glaskolben mit einem Fassungsvermögen von einem Liter parallel inkubiert.

Die Konzentration von IPTG wurde in einem Bereich von 0,1–1,0 mM variiert, wobei die für eine ausreichend hohe Proteinexpression optimale Konzentration mit der Mini-Expressionsanalyse (siehe 2.7.2) bestimmt wurde.

### **Verringerung der Temperatur**

Die Expressionskultur wurde bei 37 °C bis zum Erreichen der gewünschten O. D. (siehe 2.7.3) inkubiert, dann wurde die Temperatur kurz vor Induktion der Proteinexpression auf 30 °C herabgesetzt. Die Expressionsdauer wurde auf 3–4 Stunden oder über Nacht verlängert.

### **Verlängerte Expressionszeit**

Für deutlich verlängerte Expressionszeiten (über 12 Stunden) wurde statt des LB-Mediums ein modifiziertes M9-Medium verwendet, das einen höheren Nährstoffgehalt hatte: M9-Medium (42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 24 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 mM NaCl, 19 mM NH<sub>4</sub>Cl, pH 7,4), angereichert mit NZ-Nährmedium (10 % (w/v) NZ-Amin A, 5 % (w/v) NaCl), dem noch 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM Sorbitol, 100 mM Betain, 0,04 % (w/v) Glukose zugesetzt wurden.

Sorbitol und Glukose dienten dabei als Kohlenstoffquellen für die Bakterien, Betain sollte den osmotischen Druck des Mediums herabsetzen, um einer Lyse der Bakterienzellen vorzubeugen. Glukose verringert zudem indirekt die Verminderung der Proteinexpression durch das pLys-Plasmid in den Stämmen *E. coli* BL21 (Novagen, 2003).

Mit diesem Medium war es möglich, die Expressionszeit bei 30 °C auf bis zu 48 Stunden auszudehnen sowie die Zellzahl (abgeschätzt an Hand der Bakterienpelletmasse) zu vermehren. Die Ausbeute rekombinanten Proteins konnte bei den verwendeten Expressionskonstrukten auf das zehnfache erhöht werden (10–20 mg/ml Protein).

## **2.7.4 Reinigung rekombinanter Proteine**

Die unter Verwendung der pET-Plasmide exprimierten Proteinfragmente wiesen jeweils am Carboxyterminus eine aus sechs Histidinresten bestehende Aminosäuresequenz auf. Zur Reinigung wurde die Bindung der Histidine an Nickelionen, die an Nitrilo-Tri-Essigsäure-(NTA)-Agarosekügelchen (Qiagen, Hilden) immobilisiert waren, ausgenutzt. Die im fol-

genden beschriebenen Arbeitstechniken lehnen sich an die Angaben des Herstellers der NTA-Agarosekügelchen an (Qiagen, 2003).

### **Reinigung unter nativen Bedingungen**

Eingefrorene Bakterienpellets von großen Expressionskulturen wurden 15 min auf Eis aufgetaut und dann in 4 mg/ml Frischgewicht Lysispuffer (50 mM NaHPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) aufgenommen. Dazu wurde 1 mg/ml Lysozym (Endkonzentration) gegeben und mehrmals gut mit der Pipette durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte eine Behandlung mit einer Ultraschallsonde (Sonifikator UP 50H, Firma Hielscher, Teltow), bis die Lösung kaum noch viskos war. In der Kühlzentrifuge (Sorvall RC 5B Plus, Rotor SS-34) wurden unlösliche Proteine, Zellwandreste und andere Partikel bei 10.000 rpm 30 min abzentrifugiert.

Zu 4 ml Überstand wurde 1 ml einer Suspension von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarosekügelchen gegeben. Nach einstündiger Inkubation auf dem Schwenktisch im Kühlraum wurde die Suspension 3 min bei 1500 rpm und 4 °C in der Tischkühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Agarosekügelchen durch dreimaliges Waschen mit je 4 ml kaltem Waschpuffer (50 mM NaHPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) von nicht gebundenen Proteinen gereinigt. Die Kügelchen wurden in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und in eine mit Waschpuffer äquilibrierte Chromatographiesäule (*Polypropylene 1 ml Column*, Qiagen, Hilden) gefüllt.

Der aus der Säule tropfende Waschpuffer wurde verworfen, und nach dem Absetzen der Agarosekügelchen konnte gebundenes Protein durch dreimaliges Auftragen von je 500 µl kaltem Elutionspuffer (50 mM NaHPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0) in Eppendorfgläsern aufgefangen werden. Die Proteinelution erfolgte bei Raumtemperatur, wobei die Eppendorfgläser in einem Eisbad standen.

Von jeder Elutionsfraktion wurden 24 µl mit 6 µl fünffach konzentriertem Probenpuffer versetzt und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.7.9), der Rest auf Eis im Kühlraum gelagert.

### **Reinigung unter denaturierenden Bedingungen**

War bei bestimmten Proteinfragmenten eine Reinigung unter nativen Bedingungen nicht möglich, weil sie in der Fraktion unlöslicher Proteine verblieben, wurde eine Reinigung

unter denaturierenden Bedingungen vorgenommen. Das von der Firma Qiagen beschriebene Protokoll war dabei Grundlage für die Entwicklung eines eigenen Protokolls.

Zunächst wurden Lyse und Zentrifugation wie für die Reinigung unter nativen Bedingungen ausgeführt, um möglichst viele (lösliche) Proteine mit dem Überstand zu entfernen. Das verbleibende Pellet wurde in 6 M Guanidiniumhydrochlorid resuspendiert (hierbei wurde u. a. rekombinantes Protein denaturiert) und bei Raumtemperatur 15–30 min inkubiert. In dieser Zeit wurde der Extrakt durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend sonifiziert. Unter diesen Bedingungen unlösliche Bestandteile wurde durch Zentrifugation für 20 min bei 10.000 rpm und 15 °C in der Kühlzentrifuge (Rotor SS-34) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarosekügelchen versetzt und bis zu einer Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch inkubiert.

Abweichend von den Angaben des Herstellers der Agarosekügelchen wurden die folgenden Schritte (Waschen und Elution) mit den gleichen Puffern wie für die native Reinigung durchgeführt, denn für die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine erwies sich eine schnelle Rückfaltung durch Waschen der Agarosekügelchen mit dem oben genannten Waschpuffer als ausreichend, um lösliches Protein zu erhalten.

### 2.7.5 Dialyse von Proteinlösungen

Für chemische Quervernetzungsexperimente und andere Bindungsstudien wurde eluiertes Protein gegen einen mindestens 2000fachen Überschuß an CL-Puffer (20 mM Na-Phosphat, pH 7,0, 80 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) über Nacht im Kühlraum dialysiert. Die Dialyseschläuche Spectra/Por 1 (Spectrum Laboratories, USA) hatten eine Ausschlußgrenze von 6000-8000 Da und bestanden aus besonders behandelte Zellulose.

### 2.7.6 Gewebe- und Zellextraktion für die SDS-PAGE

Tiefgefrorene Gewebeproben wurden in einem auf Eis vorgekühlten Mörser in flüssigem Stickstoff fein zermahlen und dann in zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (vorgewärmt auf 65 °C) aufgenommen.

Für die Gewinnung von Zellextrakten wurde eine Schale mit kultiviertem Zellen auf Eis gestellt und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Der Zellrasen wurde in zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen und in ein Eppendorfgesäß überführt.

Die Extrakte wurden bei 65 °C schonend 15 min denaturiert und mehrmals sonifiziert. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 20 min) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-

gefäß pipettiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.7.7 Myosinreinigung aus Rinderskelettmuskel

Myosin wurde aus Rinderskelettmuskel in Anlehnung an die Methode nach Margossian und Lowey (1982) gereinigt. 100 g tiefgefrorenes Muskelgewebe wurden in kaltem Hochsalzpuffer auf Eis homogenisiert (150 mM  $\text{KPi}$ , pH6,5, 300 mM KCl, 20 mM EDTA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP). Alle weiteren Arbeitsschritte wurden im Kühlraum durchgeführt.

Mit 900 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  wurde der Extrakt verdünnt und unlösliches Material durch Zentrifugation (3000 g, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) abgetrennt. Aus dem Überstand wurde Myosin durch Zugabe von 1,8 l kaltem  $\text{dH}_2\text{O}$  gefällt. Nach 3–4 Stunden konnte der Überstand abgegossen und das Proteinsediment durch Zentrifugation gesammelt werden.

Die pelletierten Proteine wurden in 90 ml eines Hochsalzpuffers (60 mM  $\text{KPi}$ , pH 6,5, 1 M KCl, 25 mM EDTA) in Lösung gebracht und über Nacht gegen einen anderen Puffer (25 mM  $\text{KPi}$ , pH 6,5, 600 mM KCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT) dialysiert. Das Dialysat wurde durch Präzipitation des Aktomyosins gereinigt, indem es mit 110 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  versetzt und nach kurzer Inkubation eine Stunde bei 52000g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert wurde.

Myosin wurde aus dem Überstand durch Verdünnen mit 1,3 l  $\text{dH}_2\text{O}$  innerhalb mehrerer Stunden ausgefällt und durch kurze Zentrifugation (12000g, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pelletiert. Dieses Myosinpellet wurde mit einem Hochsalzpuffer (10 mM  $\text{KPi}$ , pH 6,5, 3 M KCl) wieder gelöst. Die Myosinpräparation wurde mittels Dialyse über Nacht in einen Lagerungspuffer (50 mM  $\text{KPi}$ , pH6,5, 600 mM KCl, 1 mM DTT) überführt. Die aliquotierte Präparation, die 50 % (v/v) Glycerol enthielt, wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Herstellung nativer Myosinfilamente wurde die in Lagerungspuffer befindliche Myosinpräparation 1:50 mit  $\text{dH}_2\text{O}$  verdünnt und 30 min auf Eis gestellt. Die Filamentpräparation wurde dann direkt auf mit PBS angefeuchtete Nitrozellulosestreifen pipettiert.

### 2.7.8 Proteinkonzentrationsbestimmungen

#### Bradford-Assay

Kolorimetrisch erfolgte die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976), auf der der verwendete *BioRad Protein Assay Dye Reagent Kit* beruhte. Die Proben wurden ebenso wie das für eine Standardreihe verwendete  $\gamma$ -Globulin in PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH

7,3) verdünnt und in einer Mikrotiterplatte mit dem Farbstoff versetzt. Die Extinktionswerte dieser Ansätze konnten in einem Photometer (Milenia Kinetic Analyzer, Diagnostic Products Corp., SOFTMAX Programm, Version 2.35, Molecular Devices Corp., USA) gemessen werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL (Microsoft), wobei die Konzentrationsbestimmung durch Einsetzen der Probenmeßwerte in eine berechnete Regressionsgeradenformel ausgeführt wurde.

### Messung der Extinktion bei 280 nm

Der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  eines Proteins mit bekannter Aminosäuresequenz läßt sich mit Hilfe der publizierten Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Cystein, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin für verschiedene Lösungsmittel berechnen (Pace et al., 1995). Die Konzentrationsbestimmung wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm mit in 6 M Guanidiniumchlorid denaturiertem Protein durchgeführt.

Hierzu wurde eine 8 M Stammlösung von Guanidiniumchlorid (Firma Roth, p. a. Qualität) hergestellt, durch einen  $0,2 \mu\text{m}$  Filter filtriert und auf niedrige Absorption zwischen 400 und 220 nm kontrolliert. Der Brechungsindex  $n$  der Lösung wurde mit einem Refraktometer (Firma Zeiss, Jena) bestimmt und mit folgender Gleichung die genaue Konzentration an Guanidiniumchlorid berechnet:

$$[M]_{GndHCl} = 57,147n^1 + 38,68n^2 - 91,6n^3 \quad (2.1)$$

### 2.7.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Polyacrylamidgele zur Analyse von Proteinen wurden nach dem diskontinuierlichen System, wie es von Laemmli (Laemmli, 1970) beschrieben wurde, verwendet. Mit dem Gelgießsystem Miniprotean II der Firma BioRad wurden Mini-Vertikalgele gegossen, die verschiedene Acrylamidmengen (8–12 %) im Trenngel enthielten.

Die Gele hatten eine Dicke von 0,75 mm und bestanden aus einem Sammelgel (3 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Mischung 29,2:0,8), 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,8 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,45 % (v/v) Ammoniumpersulfat (APS), 0,3 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)) und dem Trenngel (Acrylamid/Bisacrylamid 8–12 %, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,8 % (w/v) SDS, 0,083 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED).

Die Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer (30 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1,5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 3 % (w/v) SDS, 6 % (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, 0,02 % (w/v)

Bromphenolblau) versetzt und 2 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert. Abweichend hiervon wurden Totalextrakte von Muskelgewebe/Zellen 15 min bei 60 °C erwärmt.

Die Gele befanden sich in einem Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS), und die Auftrennung der Proteine wurde bei konstanter Spannung (100 V für die Konzentrierung im Sammelgel, 200 V für die Trennung) oder konstanter Stromstärke (bis zu 25 mA pro Gel) durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel mit Coomassie Blau-Lösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) angefärbt oder auf eine Membran transferiert (siehe 2.7.10). Gefärbte Gele wurden mit der Dokumentationsanlage GelDoc 2000 (siehe 2.6.3) im Durchlicht photographiert.

### 2.7.10 Proteintransfer

Für immunologische Detektionsmethoden wurden Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Membran transferiert (sogenanntes *Western Blotting*). Transfermembranen bestanden aus Nitrozellulose (Protran BA 83, Porengröße 0,2 µm, Firma Schleicher & Schuell, Dassel), und je nach Aufgabenstellung wurde der Proteintransfer in kurzer Zeit mit dem Semidry-Verfahren oder über Nacht durch Tank-Blotting ausgeführt, wie im folgenden näher beschrieben.

#### Semidry-Verfahren

Proteine mit einer Masse unter 150 kDa wurden mit einer Semidry-Blotting-Aparatur (Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell, Firma BioRad) transferiert.

Ein diskontinuierliches Puffersystem beinhaltete zwei in Anodenpuffer I (300 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4) getränkte Filterpapiere, die direkt auf der Anodenplatte der Aparatur lagen. Anodenpuffer II (25 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4) wurde zur Durchfeuchtung eines weiteren Blattes Filterpapier und zum Äquilibrieren der Nitrozellulosemembran verwendet. Auf der Membran kam das kurz in Anodenlösung II gespülte Polyacrylamidgel zu liegen, das mit drei Blatt in Kathodenpuffer (40 mM 6-Amino-n-Hexansäure, 20 % (v/v) Methanol, pH 7,6) überschichtet wurde. Diese Pufferzusammensetzungen sollten wegen der verschiedenen Ionenbeweglichkeiten in einem elektrischen Feld und unterschiedlichen Ionenkonzentrationen einen effizienten Transfer größerer und kleinerer (<20 kDa) Proteine in der gleichen Zeit ermöglichen.

In den Fällen, in denen sich die Größe der zu untersuchenden Proteine im gleichen

Massenbereich (ca. 36–97 kDa) befand, wurde ein einfaches Puffersystem angewendet: 10 % (v/v) Elektrophoresepuffer (siehe 2.7.9) mit 20 % (v/v) Methanol.

Der Proteintransfer dauerte 60–90 min bei einer konstanten Stromstärke  $I$  (in mA), die sich nach der Gelfläche  $F$  (in cm<sup>2</sup>) richtete und wie folgt berechnet wurde:

$$I = F \cdot 0,8 \text{ mA.} \quad (2.2)$$

Die Spannung wurde auf maximal 24 V begrenzt, um Schäden an der Apparatur zu vermeiden.

### **Tank-Blotting**

Der Transfer größerer Proteine (>150 kDa) erforderte eine längere Zeit und höhere Stromstärke; hierfür reichten Puffervolumen und Pufferkapazität des Semidry-Verfahrens nicht aus, weshalb der Transfer in einem mit 4 l Blottingpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,01 % (w/v) SDS) gefüllten Tank durchgeführt wurde.

Polyacrylamidgel und Nitrozellulosemembran wurden mit je zwei Blatt Filterpapier umgeben und zwischen mit Puffer getränkte Schaumstoffkissen in eine Kassette gelegt, die dann in den Tank (Trans-Blott Cell, Firma BioRad) eingesetzt wurde. Der Proteintransfer erstreckte sich über Nacht und wurde im Kühlraum bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA durchgeführt.

### **Proteinfärbung und Dokumentation**

Nitrozellulosemembranen wurden 3 min in Ponceau Rot Lösung (3 % (w/v) Trichloressigsäure, 0,2 % (w/v) Ponceau S Rot) gefärbt und in ddH<sub>2</sub>O soweit entfärbt, bis der Hintergrund fast weiß und die Proteinbanden noch kräftig rot waren. Markerbanden, die Position der Laufspuren sowie die Trenngelunterkante wurden auf der Membran mit Bleistift markiert. Der so aufgearbeitete Blot wurde im Auflicht mit einer Farbdigitalkamera (Camedia 1240, Olympus) fotografiert und die Photos mit dem Programm PHOTOSHOP (Version 8.0, Adobe, USA) in Graustufenbilder umgewandelt. Getrocknete Transfermembranen konnten im Kühlschrank über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

#### **2.7.11 Immundetektion**

Zum Nachweis rekombinanter und anderer Proteine auf der Transfermembran wurde eine Immundetektion durchgeführt. Die fotografierte Membran wurde zunächst für minde-

stens 30 min in Blockierlösung (4 % (w/v) Magermilchpulver, gelöst in TBST: 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 150 mM NaCl, 0,05 % (w/v) Tween-20) geschwenkt, kurz mit TBST gespült und eine Stunde mit einem Primärantikörper, der in TBST verdünnt war, inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Membran dreimal 5 min mit TBST gewaschen und dann 45 min mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper, der mit dem Enzym Peroxidase konjugiert war, auf dem Schwenktisch inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch erneutes Waschen entfernt.

Die Detektion des mit dem Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms erfolgte mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion. Verwendet wurde das *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* der Firma Pierce (Pierce Biotechnology Inc., USA) nach Angaben des Herstellers. Die frisch angesetzte Arbeitslösung wurde auf eine Folie pipettiert und die Membran mit der Proteinseite nach unten auf den Reagenztropfen gelegt, so daß ihre ganze Fläche luftblasenfrei bedeckt war. Nach 5 min wurde die Membranrückseite ebenfalls mit Folie bedeckt und überschüssiges Reagenz durch Ausstreichen entfernt.

In der Dunkelkammer wurde die in Folie eingeschlagene Transfermembran in einer Röntgenfilmkassette (Firma Siemens) auf Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, England) gepreßt. Die richtige Belichtungszeit wurde durch eine Probelichtung von 1 min abgeschätzt. Belichteter Film wurde mit Entwickler (GBX developer) und Fixierer (GBX fixer, beides Kodak, USA) behandelt. Röntgenfilm wurde entweder mit der Farbdigitalkamera photographiert oder mit einem Scanner (Perfection 1670, Epson, Japan) eingelesen und als Graustufenbilder gespeichert.

Densitometrische Analysen wurden mit dem Programm QUANTITYONE (Version 3, Biorad) durchgeführt.

### 2.7.12 Verwendete Antikörper

Für die Detektion rekombinanter Proteine und Proteine in Zellen und Geweben wurden folgende primäre Antikörper verwendet.

Die in Tabelle 2.4 genannten Primärantikörper wurden mit den in Tabelle 2.5 Sekundärantikörpern detektiert.

### 2.7.13 Herstellung eines monoklonalen Antikörpers

Zur Analyse der Phosphorylierung von Myomesin am Serinrest 618 wurden zwei Peptide hergestellt (Firma Biosyntan, Berlin), die der an dieser Aminosäure phosphorylierten (Pep-



Name	Epitop	Typ	Herkunft
M190N	Myomesindomäne My1	Ratte	Obermann et al. (1997)
WO6	Peptid WO6/My1	Kanninchen	Obermann (1996)
WO17	Peptid WO17/My4-5	Kanninchen	Obermann (1996)
HG12A9	Phosphopeptid WO17p/My4-5p	Maus IgG2a	diese Arbeit
Ab653	$\alpha$ -Aktinin 2	Kanninchen	van der Ven et al. (2000)
MF20	Myosin Hühnchen	Maus IgG2b	Bader et al. (1982)
T12	Titin Z-Bandenepitop	Maus IgG1	(Fürst et al., 1988)
$\alpha$ -EEF	EEF Immuntag	Ratte	(Wehland et al., 1983)
$\alpha$ -T7	T7 Immuntag	Maus IgG2b	Novagen
$\alpha$ -myc	c-myc Immuntag	Maus	ICI Chemikalien, Ismaningen

Tabelle 2.4: Die verwendeten Primärantikörper waren teilweise gegen Peptide gerichtet, die in Tabelle 2.6 aufgeführt sind.

Name	Donor	Markierung	Anti-	Hersteller
gamPO	Ziege	POD	Maus	Dianova
garatPO	Ziege	POD	Ratte	Dianova
garPO	Ziege	POD	Kanninchen	Dianova
gamIgG1	Ziege	Alexa Fluor 488	Maus	Molecular Probes
gamIgG2b	Ziege	Alexa Fluor 594	Maus	Molecular Probes
garCy2	Ziege	Cyanin	Kanninchen	Jackson
garCy3	Ziege	Indocarbocyanin	Kanninchen	Jackson

Tabelle 2.5: Für die Immundetektion mittels ECL oder DAB-Farbstoffniederschlag wurden verschiedene Sekundärantikörper verwendet, die mit dem Enzym Peroxidase (POD) gekoppelt waren. Die für die indirekte Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten Antikörper waren mit den genannten Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

tid WO17p) und nicht phosphorylierten (Peptid WO17) Form des Proteins entsprachen. Die Aminosäurezusammensetzung der Peptide ist in der Tabelle 2.6 wiedergegeben. Diese Tabelle weist außerdem darauf hin, daß bereits zwei polyklonale Antikörper vorhanden waren, die gegen die Myomesinkopfdomäne (Antikörper WO6) und das nicht phosphorylierte Peptid WO17 (Antikörper WO17) gerichtet waren (Obermann et al., 1997).

Name	Aminosäuresequenz	Lokalisation in Myomesin	Tier
WO6	TASKQSTASKQSTASKQSC	Kopf (T <sub>191</sub> –S <sub>208</sub> )	Kanninchen
WO17	EKARLKSRPSAPWTGQC	My4–5 (E <sub>609</sub> –Q <sub>624</sub> )	Kanninchen
WO17p	EKARLKSRP <b>p</b> SAPWTGQC	My4–5 (E <sub>609</sub> –Q <sub>624</sub> )	Maus

Tabelle 2.6: Die Immunisierung mit den Peptiden WO6 und WO17 ergab polyklonale Antikörper und wurde bereits beschrieben (Obermann, 1996), das Peptid WO17p wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers eingesetzt (siehe 2.7.12). Alle drei Peptide tragen am Carboxyterminus einen für die Kopplung an ein Trägerprotein vorgesehenen Cysteinrest. Die Lokalisation der Peptide im Myomesinmoelkül ist jeweils für den amino- und carboxyterminalen Aminosäurerest angegeben.

Für die Herstellung eines phosphorylierungsabhängigen Antikörpers wurde das Peptid WO17p an *keyhole limpet hemocyanin* (KLH, Blutfarbstoff der Meeresschnecke *Megathura crenulata*) gekoppelt und zur Immunisierung einer Maus verwendet (M. Heiner, Universität Potsdam). KHL wurde als Haptenträger verwendet, um dem Immunsystem der Maus das Phosphopeptid als Antigen zu präsentieren. Nach zwei weiteren Nachimmunisierungen konnten im Serum des Tieres Antikörper gegen das Peptid WO17p mit einem ELISA nachgewiesen, sodaß eine Hybridomzelllinie nach Standardprotokollen hergestellt werden konnte (M. Heiner, Universität Potsdam).

Zur Selektion der Hybridomklone wurde das Kulturmedium der Hybridomzellen mittels ELISA auf Antikörperreaktivität gegen das Phosphopeptid WO17p untersucht. Als Kontrolle wurde das Peptid WO17 im ELISA verwendet, um Antikörper, die nicht gegen von dem phosphorylierten Serin abhängige Epitope gerichtet waren, in den Kulturüberständen zu identifizieren und damit die entsprechenden Hybridomzellen von der weiteren Kultivierung auszuschließen.

Eine Hybridomzelllinie (HG12A9) konnte auf diese Weise etabliert werden, die einen phosphorylierungsabhängigen Antikörper produzierte. Diese Hybridomzellen wurden wie unter 2.9.1 beschrieben kultiviert, der anfallende Kulturüberstand wurde durch Nachweis phosphorylierten Myomesins My4–5 (hergestellt wie unter 2.7.16 genannt) mittels Immundetektion auf seine Spezifität für das phosphorylierte Myomesinfragment getestet.

### 2.7.14 Chemische Quervernetzung von Proteinen

Protein-Protein-Wechselwirkungen konnten *in vitro* durch chemische Quervernetzung (*chemical cross-linking*) analysiert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Quervernetzer eingesetzt: Ethylenglykolbis(succinimidylsuccinat), EGS, und 1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl) Carbodiimid Hydrochlorid, EDC, die von der Firma Pierce, USA, bezogen wurden.

#### Chemische Quervernetzung mit EGS

EGS ist ein homobifunktionaler, wasserunlöslicher N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester), der mit primären Aminen reagiert. Das sind in einem Protein die  $\alpha$ -Aminogruppen der Aminosäuren am Aminoterminus. Von den Aminosäuren, die Stickstoffatome in ihrer Seitenkette tragen, reagiert nur Lysin signifikant über seine  $\varepsilon$ -Aminogruppe mit dem Quervernetzer.

Im Verlaufe der Quervernetzungsreaktion werden kovalente Amidbindungen unter Freisetzung von zwei Molekülen NHS-Ester pro EGS-Molekül ausgebildet. Der quervernetzende Rest des EGS-Moleküls weist eine Länge von 16,1 Å auf. Dieses Molekül läßt sich im alkalischen Milieu hydrolysieren (z. B. in Hydroxylamin, pH 8,5), die quervernetzten Moleküle lassen sich so wieder voneinander trennen.

In wässrigen Lösungen hydrolysiert EGS, daher wurde eine Stammlösung (30 mg/ml, das sind 65,73 mM) stets frisch in DMSO (hygroskopisch!) angesetzt und sofort verwendet. In einem Quervernetzungsansatz befanden sich 1  $\mu$ M rekombinantes Protein in CL-Puffer (siehe Abschnitt 2.7.5), dem EGS in einer Endkonzentration von 1,3 mM zugefügt wurde. Nach Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Fällung der Proteine mit 10 % (w/v) Trichloressigsäure im Ansatz und zehnmütige Inkubation auf Eis beendet. Die Inkubationszeit mit EGS wurde für bestimmte Experimente variiert, wie im Ergebnisteil beschrieben.

Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation in der Tischkühlzentrifuge 30 min lang bei 14.000 rpm und 4 °C pelletiert. Das Proteinpellet wurde einmal mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen, zentrifugiert und dann mit reinem Aceton gewaschen und wieder abzentrifugiert. Das luftgetrocknete Pellet wurde in einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe 2.7.9) analysiert.

## Chemische Quervernetzung mit EDC

EDC ist ein sogenannter *zero length* Quervernetzer, mit dem die Carboxylgruppen von Glutamat und Aspartat eines Proteins direkt mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes eines Bindungspartners durch Ausbildung einer Amidbindung verknüpft werden können, wenn die genannten Aminosäuren an einer Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligt sind. Die Effizienz der Quervernetzungsreaktion läßt sich durch Zugabe von N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) erhöhen (Grabarek und Gergely, 1990).

Für Quervernetzungsexperimente wurden 100 mM EDC und Sulfo-NHS in Aqua bi-dist. angesetzt und sofort verwendet, da die Substanzen hydrolyseempfindlich sind. Ein Quervernetzungsansatz enthielt 1  $\mu\text{g}/4\mu\text{l}$  Protein in einem Imidazol-Puffer (20 mM Imidazol, pH 7,0, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA), dem 5 mM Sulfo-NHS und 5 mM EDC hinzugefügt wurden. Der Ansatz wurde bei 37 °C inkubiert und die Reaktion nach einer Stunde beendet, indem zu dem Ansatz SDS-Probenpuffer pipettiert wurde. Die Probenanalyse erfolgte mittels Gelelektrophorese (siehe 2.7.9).

### 2.7.15 Flüssig-Festphasen-Experimente

#### Western Blot Overlay Experimente

Protein-Protein-Wechselwirkungen ließen sich mit rekombinanten Proteinfragmenten durch ein *Western blot overlay* Experiment nachweisen. Der eine mögliche Bindungspartner wurde nach Gelelektrophorese (siehe 2.7.9) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wie in Abschnitt 2.7.10 ausgeführt. Die Membran wurde in Streifen, die jeweils die Hälfte einer Laufspur umfaßten, geschnitten und blockiert (siehe 2.7.11).

Die eine Hälfte der Membran wurde mit einer Proteinlösung inkubiert, die einen potentiellen Bindungspartner in PBS verdünnt enthielt. Die Proteinmengen variierten in dieser Lösung zwischen 25  $\mu\text{g}$  und 75  $\mu\text{g}$  Protein in 500  $\mu\text{l}$  PBS je Streifen. Die zweite Hälfte der Membran wurde zur Kontrolle nur mit PBS inkubiert. Nach einer Inkubation von 1–2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum wurde die Proteinlösung bzw. das PBS entfernt und die Membranstreifen dreimal mit TBST gewaschen.

Gebundenes Protein wurde durch Nachweis des entsprechenden Immunotags sichtbar gemacht. Auf den für die Kontrolle verwendeten Streifen wurde das Vorhandensein des transferierten Bindungspartners mit gegen einen Immuntag gerichteten oder einem für das jeweilige Protein spezifischen Antikörper gezeigt. Die Arbeitsschritte waren die gleichen wie im Abschnitt 2.7.11 genannt.

## Dot Blot Overlay Experimente

Ein Nachteil der im vorherigen Abschnitt vorgestellten Methode ist, daß der eine mögliche Bindungspartner einer Denaturierung (SDS-Gelelektrophorese) und Renaturierung (auf der Transfermembran in Puffer) ausgesetzt wurde. Eine korrekte Faltung des transferierten Proteins wurde erwünscht, ließ sich aber nicht unmittelbar nachweisen. Deshalb wurde zum Vergleich ein *Dot blot overlay* Experiment durchgeführt, bei dem der eine mögliche Bindungspartner als natives Protein auf einer Nitrozellulosemembran (Protran BA-85/20, Porengröße 0,45 µm, Firma Schleicher & Schuell) durch direktes Auftropfen der Proteinlösung immobilisiert wurde.

Membranstreifen wurden nach dem Blockieren mit Proteinlösung oder zur Kontrolle nur mit PBS inkubiert und wie im Abschnitt 2.7.15 beschrieben weiter behandelt. Die Detektion von transferiertem und gebundenem Protein erfolgte ebenfalls nach dem gleichen Prinzip.

## 2.7.16 Proteinphosphorylierungen *in vitro* und *in vivo*

### Phosphorylierung rekombinanter Proteine durch PKA

Aus *E. coli* Bakterien gereinigte rekombinante Proteine wurden durch Inkubation mit Proteinkinase A (PKA, katalytische Untereinheit, Sigma) phosphoryliert. Ein Ansatz enthielt in einem Volumen von 20 µl Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>) 1 µg Protein sowie Proteinaseinhibitorenmix (5 µM E64, 1 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Trypsininhibitor, 0,25 µg/ml Pepstatin A), 0,5 mM Natrium-*ortho*-Vandat, 0,5 mM ATP, 10 µM cAMP und 2,5–5 U Proteinkinase A. Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und die Reaktion nachfolgend durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Phosphoryliertes Protein wurde durch zweidimensionale Elektrophorese (unter 2.7.18 beschrieben) von nicht phosphoryliertem Protein im Ansatz getrennt. Die separierten Proteine wurden durch Immunoblotting mit einem nicht phosphorylierungsabhängigen Antikörper sichtbar gemacht.

### Phosphorylierung rekombinanter Proteine durch Zellextrakt

Neben gereinigter Proteinkinase A wurde auch die in einem Muskelzellextrakt vorhandenen Proteinkinasen für ein Phosphorylierungsexperiment eingesetzt.

Zunächst wurde ein Zellysat wie folgt hergestellt: Eine große Kulturschale mit L6-Myoblasten (Fläche 60 cm<sup>2</sup>) wurde einen Tag nach Beginn der Muskeldifferenzierung aus

dem Inkubator genommen und sofort auf Eis gestellt.

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit Proteaseinhibitorenmix und 0,5 mM Natrium-*ortho*-Vanadat abgeschabt und die Suspension in ein gekühltes Eppendorfgefäß überführt. Die abeglösten Zellen wurden durch kurze Zentrifugation (2 min, 5.000 rpm, 4 °C) pelletiert, in 100 µl Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 138 mM NaCl, 100 mM KCl, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,5 mM Natrium-*ortho*-Vanadat, 5 % (v/v) Glycerol, Proteinaseinhibitorenmix (Zusammensetzung wie oben genannt) und 1 % (v/v) Triton X-100) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert.

Zelltrümmer und unter diesen Bedingungen unlösliche Proteine wurden in der Tischkühlzentrifuge 20 min bei 14000 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Konzentration von Glycerol wurde auf 10 % eingestellt und der Extrakt bei -80 °C gelagert.

Ein Phosphorylierungsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und enthielt neben 1 µl L6-Zellextrakt 1 µg Protein, 0,5 mM ATP und 10 µM cAMP. Inkubiert wurde 1 Stunde bei 30 °C und die Reaktion dann mit SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Analyse erfolgte mittels zweidimensionaler Elektrophorese oder (siehe [2.7.18](#)) oder Autoradiographie (siehe [2.7.17](#)).

### Hemmung der Proteinphosphorylierung durch Inhibitoren

Phosphorylierungsreaktionen durch Proteinkinase A wurden mit einem spezifischen Inhibitor gehemmt: dem hitzestabilen Proteinkinase Inhibitor PKI 14–22 (Calbiochem, Schwalbach/Ts.), das als Pseudosubstrat von der katalytischen Untereinheit der PKA gebunden wird und die Kinase damit blockiert. Dieses Peptid entspricht den Aminosäuren 14–22 eines *in vivo* Inhibitors der PKA, der bei biochemischen Versuchen mit Extrakten von Kaninchenskelettmuskel gefunden wurde (Walsh et al., 1971). Das Amid dieses Peptids ist zur Erhöhung der Zellpermeabilität am Aminoterminus myristolyliert und weist folgende Aminosäuresequenz auf: *Myr*-N-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-NH<sub>2</sub>. Ein synthetischer Inhibitor der PKA ist H-89 (N-[2-((p-Bromophenylacryl)amino)ethyl]-5-isochinolinsulfonamid), der aber nicht hochspezifisch diese Kinase hemmt (Chijiwa et al., 1990).

#### 2.7.17 Stimulierung der PKA in kultivierten Zellen

Proteinkinase A in kultivierten Zellen wurde durch verschiedene Substanzen stimuliert: Forskolin (aus der Buntnessel, *Coleus forskohlii*), Clenbuterol (4-Amino-3,5-dichloro- $\alpha$ -

(((1,1-dimethylethyl)amino)methyl)benzenmethanol), Isoprenalin (1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-(isopropylamino)ethanol, anderer Name *Isoproterenol*) und 8-Br-cAMP (8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat) – alle bezogen von Sigma, Taufkirchen.

Isoprenalin stimuliert  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren, Clenbuterol ist ein  $\beta$ 2-Agonist. Beide Substanzen aktivieren die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade, die durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die PKA stimuliert. Mit Forskolin wurde das cAMP-produzierende Enzym, die Adenylatzyklase, direkt aktiviert. 8-Br-cAMP ist ein nicht hydrolysierbares cAMP-Analogon, daß die PKA durch Bindung der regulatorischen Unter-einheiten des Enzyms dauerhaft aktiv hält.

Humane Skelettmuskelzellen wurden wie unter 2.9.1 beschrieben bis zum vierten Tag einer Differenzierungsreihe kultiviert und dann mit 1 mM 8-Br-cAMP, 10  $\mu$ M Clenbuterol, 1  $\mu$ M Forskolin und 0,5  $\mu$ M Isoprenalin versetzt. Der an Tag vier normalerweise durchgeführte Mediumwechsel wurde ausgelassen, da sich gezeigt hatte, daß die Erneuerung des Mediums stimulierend auf die Zellen wirkte und die Beobachtung der Myomesinphosphorylierung störte.

Von den stimulierten Zellen wurden zu den Zeitpunkten 0 min, 5 min, 20 min, 1 h und 4 h SDS-Totalextrakte (vgl. 2.7.6) gemacht, die nach SDS-PAGE auf Nitrozellulose transferiert wurden. Phosphoryliertes Myomesin wurde durch den monoklonalen Antikörper HG12 mittels Immundetektion und ECL-Reaktion (siehe 2.7.11) detektiert.

### Proteinphosphorylierung mit radioaktivem Phosphor

Durch *in vitro* Phosphorylierung mit gereinigter Proteinkinase A oder Zellextrakt als Kinasquelle im Ansatz und in Gegenwart von  $\gamma$ [ $^{33}$ P]ATP wurde rekombinantes Protein mit radioaktivem Phosphor markiert und so die Phosphorylierung des Proteins detektierbar gemacht.

Ein Ansatz mit PKA enthielt 1  $\mu$ g Protein, 100  $\mu$ M ATP, 20  $\mu$ Ci  $\gamma$ [ $^{33}$ P]ATP (Hartmann Analytics, Braunschweig), Proteinaseinhibitorenmix (5  $\mu$ M E64, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin, 10  $\mu$ g/ml Trypsininhibitor, 0,25  $\mu$ g/ml Pepstatin A), 0,5 mM Natrium-*ortho*-Vanadat und 2,5 U PKA in einem Volumen von 20  $\mu$ l Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>).

Wurde L6-Zellextrakt als Quelle für die Proteinkinaseaktivität verwendet, hatte ein Ansatz von 150  $\mu$ l Gesamtvolumen folgende Zusammensetzung: 0,3 mg/ml Protein, Proteaseinhibitormix (5  $\mu$ M E64, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin, 10  $\mu$ g/ml Trypsininhibitor, 0,25  $\mu$ g/ml Pepstatin A), 0,5 mM Natrium-*ortho*-Vanadat, 60  $\mu$ Ci  $\gamma$ [ $^{33}$ P]ATP (Hartmann Analytics,

Braunschweig), 100  $\mu\text{M}$  ATP und 15  $\mu\text{l}$  L6-Zellextrakt (siehe 2.7.16) in Phospho-CL-Puffer (20 mM Na-Phosphat, pH 7,5, 1 mM DTT, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 % (v/v) DMSO). Jeder Ansatz wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und dann mit SDS-Probenpuffer versetzt, um die Reaktion zu stoppen.

Die Proteine in den Proben wurden mittels SDS-PAGE separiert, das Polyacrylamidgel auf Filterpapier zwei Stunden mit einer Geltrocknungsanlage (Biometra) getrocknet und dann in eine Kassette überführt, in der eine eingelegte *PhosphoImager* Platte durch das radioaktive Gel über Nacht belichtet wurde. Die Autoradiographie wurde am nächsten Tag mit dem *PhosphoImager* BAS 2000 (Fuji) ausgewertet.

### Chemische Quervernetzung radioaktiv markierter Proteine

Die Phosphorylierung gereinigter rekombinanter Proteine durch Proteinkinasen aus L6-Zellextrakt, hergestellt wie unter 2.7.16 beschrieben, wurde in Anwesenheit von radioaktivem ATP durchgeführt.

Für die Proteinphosphorylierung wurde die Probe zweieinhalb Stunden bei 30 °C im Thermoblock inkubiert und nachfolgend mit oder ohne 1,3 mM EGS 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Quervernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proteine mittels Gelelektrophorese (siehe 2.7.9) nach ihrer molekularen Masse separiert. Das getrocknete Gel wurde mit dem *PhosphoImager* analysiert.

### 2.7.18 Phosphoproteinanalyse mittels 2D-Elektrophorese

Mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese wurden phosphorylierte Proteinfragmente analysiert. Im ersten Schritt wurden die Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung in einem Kapillargel aufgetrennt (1. Dimension). Das Kapillargel wurde nach Beenden der Fokussierung in die Tasche eines präparativen SDS-Polyacrylamidgels gelegt, die Proteine wurden dann entsprechend ihrer molekularen Masse separiert wie in Abschnitt 2.7.9 beschrieben (2. Dimension). Aus diesem Gel wurden die Proteine mittels Semidry-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran überführt (siehe 2.7.10). Auf der Membran wurde die Position des rekombinanten Proteins durch Immundetektion sichtbar gemacht (siehe 2.7.11).

Die Gellösung für die Kapillargele enthielt 0,13 mM Harnstoff, 4 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Mischung 37,5:1, BioRad), 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (v/v) NP-40, 1 % (v/v) Ampholyte pH 3–10 und 1 % (v/v) Ampholyte pH 5–7 (beide Firma BioRad). Die Lösung wurde bei 37 °C im Brutschrank erwärmt, bis der Harnstoff vollständig gelöst war, und



wurde dann im Ultraschallbad entgast. Nach Zugabe von 0,15 % (v/v) TEMED und 0,05 % (v/v) APS wurde die Gellösung in Kapillarröhrchen (x) gefüllt, in denen das Gel in 30 min polymerisierte.

Das Kapillargel wurde in eine Halterung für das Gelsystem Miniprotean II (siehe 2.7.9) eingesetzt und für die Vorfokussierung des pH-Gradienten mit 40 µl 2 % 2D-Probenpuffer (9,5 M Harnstoff, 2 % NP-40, 1 % Ampholyte 3–10, 1 % Ampholyte 5–7 und 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) beladen und mit 50 mM NaOH überschichtet, bis die Probenaufnahme über dem Gel mit Flüssigkeit vollständig gefüllt war. In den Puffertank des Systems (Anode) wurde 15 mM  $H_3PO_4$ , in das Pufferreservoir der Halterung (Kathode) 50 mM NaOH gefüllt, die Apparatur an eine Spannungsquelle (PowerPack 3000, BioRad) angeschlossen und die Vorfokussierung für 10 min bei 200 V, 15 min bei 300 V und 15 min bei 400 V vorgenommen.

Die verbrauchten Elektrodenlösungen wurden verworfen. Ein Kapillargel wurde dann mit Aqua dest. gespült und mit bis zu 20 µl Probe beladen, die mit 40 µl *Overlay*puffer (8 M Harnstoff, 5 % NP-40, 0,5 % (v/v) Ampholyte pH 3–10, 0,5 % Ampholyte pH 5–7, 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) und mit 50 mM NaOH überschichtet wurde. Die Elektrodenlösungen wurden erneuert und die Fokussierung der Proteine im pH-Gradienten durch einen stufenweisen Lauf (15 min bei 400 V, 15 min bei 750 V und 2,5 Stunden bei 1000 V) erreicht.

Das Kapillargel wurde aus dem Glasröhrchen in einen Äquilibriumspuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 100 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) gebracht und nach zehnmütiger Inkubation entweder für die zweite Elektrophorese (SDS-PAGE) verwendet oder in Aluminiumfolie gewickelt bei -80 °C gelagert.

Das Gel für die Trennung der Proteine nach molekularer Masse hatte eine Dicke von 1 mm und wurde im übrigen vorbereitet wie in Abschnitt 2.7.9 beschrieben. Die durch Verwendung eines präparativen Kamms entstandene große Tasche des Gels wurde mit dem Kapillargel gefüllt und die Elektrophorese bei 50 V für die Probenwanderung im Sammelgel und bei 150 V für die Separation im Trenngel ausgeführt. Das Gel wurde nach dem Lauf gefärbt (siehe 2.7.9) oder geblottet (siehe 2.7.10), so daß die Auswertung von Phosphorylierungsexperimenten durch Anfärbung und Immundetektion von phosphorylierten Spezies rekombinanter Proteine möglich wurde.

## 2.8 Biophysikalische Methoden

### 2.8.1 CD-Spektroskopie

Die Faltung von Proteinen in Lösung wurde mit der CD-Spektroskopie untersucht. Proteine weisen eine unterschiedlich große Extinktion von zirkular links und rechts polarisiertem Licht abhängig von ihrer Konformation auf. Diesen Effekt bezeichnet man als Zirkulardichroismus (*circular dichroism*). Das zirkular polarisierte Licht ist nach dem Probendurchgang elliptisch polarisiert, d. h., die Intensitäten für rechts und links zirkular polarisiertes Licht sind unterschiedlich. Das Spektropolarimeter mißt diese Intensitäten und berechnet aus ihnen die Elliptizität  $\Theta$ , mit der der Effekt des Zirkulardichroismus eines Proteins beschrieben werden kann.

Die vom Meßgerät ausgegebenen Werte für  $\Theta$  wurden in die molare Elliptizität pro Aminosäurerest,  $\Theta_{MRW}$  (der Index MRW steht für *mean residue weight*), mit folgender Formel umgerechnet:

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta 100 M_r}{c d n} \quad (2.3)$$

Hierbei ist  $M_r$  die molekulare Masse des Proteins in g/mol,  $c$  die Konzentration in g/l,  $d$  die Schichtdicke in dm und  $n$  die Anzahl der Aminosäuren. Die nach dieser Methode berechneten CD-Spektren waren für verschiedene Proteine vergleichbar.

Rekombinantes Protein wurde gegen CD-Puffer (20 mM Na-Phosphat, pH 7,0) über Nacht im Kühlraum dialysiert und am nächsten Tag 30 min in der Tischkühlzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, die Konzentration durch Färbung von 1 µl Proteinlösung auf einem Stück Nitrozellulosemembran mit Ponceau Rot abgeschätzt und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe 2.7.9) analysiert.

Direkt vor der Messung wurde die Proteinlösung in dichtschießenden Eppendorfgläsern in einer Ultrazentrifuge 30 min bei 40000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der CD-Puffer wurde im Vakuum entgast und für die Messung der Pufferreferenzspektren sowie Verdünnung der Proteinlösung verwendet.

Die Extinktion der Proteinlösung wurde bei  $\lambda = 280$  nm in einer Quarzglasküvette (1 mm Schichtdicke, Hellma, Mühlheim) gemessen und um die Extinktion des Puffers bei dieser Wellenlänge korrigiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach dem umgestellten Lambert-Beerschen Gesetz unter Verwendung des berechneten molaren Extinktionskoeffizienten (siehe 2.7.8):

$$c = \frac{EM_r}{\varepsilon d} \quad (2.4)$$

Mit  $c$  wird die Konzentration in mol/l, mit  $E$  die Extinktion, mit  $M_r$  die molekulare Masse in g/mol, mit  $\varepsilon$  der molare Extinktionskoeffizient in  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und mit  $d$  die Schichtdicke in cm bezeichnet. Für die folgenden Messungen wurde die Proteinkonzentration durch Verdünnen mit CD-Puffer auf einen Bereich von 0,5–1,0 mg/ml eingestellt.

In der Küvette mit 1 mm Schichtdicke wurde in einem J-715 CD-Spektropolarimeter (Jasco, Groß-Umstandt) zunächst das Nah-UV-Spektrum (350–250 nm) von CD-Puffer und Proteinlösung aufgenommen. CD-Signale in diesem Spektralbereich werden durch die Tertiärstruktur gefalteter Proteine verursacht. Sie sind für das Protein charakteristisch (sogenannter *finger print*).

Im fernen UV-Licht (250–180 nm) wurde die Elliptizität in der selben Küvette von 250 bis ungefähr 220 nm gemessen. Um noch weiter in den fernen UV-Lichtbereich zu gelangen, wurden Puffer bzw. Proteinlösung in eine Plättchenküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 mm (Hellma) gefüllt. Im Fern-UV-Licht beeinflusst die Sekundärstruktur eines Proteins die Absorption des zirkular polarisierten Lichts.

Die CD-Spektren wurden pufferkorrigiert und die Elliptizität wie oben beschrieben umgerechnet (Statistikprogramm SIGMAPLOT, Version 8.0, SPSS Inc., USA). Aus den beiden Spektren im Fern-UV-Bereich (1 mm und 0,1 mm Schichtdicke) wurde ein Spektrum, das den gesamten untersuchten Wellenlängenbereich wiedergibt, zusammengesetzt.

## 2.8.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die unterschiedliche Stabilität der rekombinanten Myomesinfragmente My11–12 Wildtyp und My11–12 Mutante wurde durch ein Entfaltungsexperiment untersucht. Dazu wurde zunächst die Wellenlänge bestimmt, bei der natives und durch 6 M Guanidiniumchlorid denaturiertes Protein den größten Signalunterschied aufwies.

Proteinlösungen, die für die CD-Spektroskopie vorbereitet worden waren (siehe 2.8.1), wurden mit CD-Puffer auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  eingestellt, in eine 4 mm Küvette pipettiert und auf 10 °C temperiert. Die (Tryptophan-)Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm in einem Bereich von 310 nm bis 450 nm mit einem Fluorometer (Fluoro Max-3, Horiba Jobin Yvon, München) gemessen. Der größte Signalunterschied zwischen nativem und denaturiertem Protein wurde bei 330 nm beobachtet.

Für die zeitabhängige Messung der Fluoreszenz wurde Tryptophan bei 295 nm angeregt und das Fluoreszenzsignal bei 330 nm aufgezeichnet (Meßparameter: Temperatur 10 °C, Spaltbreite Anregung 2,5 nm und Emission 5,0 nm, Inkrement 0,5 nm, Integrationszeit 0,2 s).

Das Experiment wurde durch Zugabe einer 8 M Guanidiniumchloridstammlösung, die in der Meßküvette mittels Magnetrührer schnell mit der Proteinlösung vermischt wurde, gestartet. Die Veränderung des Fluoreszenzsignals wurde über einen Zeitraum von 60 s gemessen. Durch die Entfaltung des Proteins verschob sich dabei die Wellenlänge des Tryptophanemissionsmaximums und die Emissionsintensität nahm ab, sodaß das Fluoreszenzsignal durch die Denaturierung kleiner wurde.

## 2.9 Kultivierung von Säugetierzellen

Die Kultivierung von eukaryontischen Zellen wurde mit Standardmethoden durchgeführt. Die Zellen wurden als Adhäsionskulturen in sterilen Plastikschalen (Biochrome KG, Berlin) gehalten und in einem Begasungsbrutschrank (NuAir US Autoflow) bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle Schritte, die steriles Arbeiten verlangten, wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

### 2.9.1 Zelllinien und Kulturmedien

Die für diese Arbeit in Kultur genommenen Zelllinien werden im folgenden kurz vorgestellt unter Angabe der zugehörigen Zugangsnummer für die amerikanische Gewebe- und Zellkultursammlung (*American Type Culture Collection – ATCC*), sofern die Linie dort geführt wird. Die verwendeten Medien und Zusätze wurden entweder von PromoCell (Heidelberg) oder unter dem Markennamen Gibco von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

#### BHK-21/C13 Zellen

BHK-Zellen (ATCC-Nummer: CCL-10) sind Mesangialzellen (glomeruläre Epithelzellen) aus der Niere des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*), die zur Expression muskelspezifischer Proteine und der Bildung von Myofibrillen angeregt werden können (Schaart et al., 1991), weshalb sie als putative Myofibroblastenlinie betrachtet werden (Mayer und Leinwand, 1997; van der Ven und Fürst, 1998). Proliferierende Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Pencillin und 1 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Differenzierung der Zellen wurde durch Verwendung eines anderen Mediums (DMEM mit 0,4 % Utroser G und 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Pencillin sowie 1 µg/ml Streptomycin) stimuliert, das jeden zweiten Tag zur Hälfte erneuert wurde. Nach spätestens sechs Tagen wurden die Zellen fixiert und für Immunfärbungen aufgearbeitet (siehe [2.10.2](#)).

### **COS-1 Zellen**

COS-Zellen (ATCC-Nummer: CRL-1650) sind ein Derivat (Gluzman, 1981) der CV-1 Fibroblastenzelllinie (Jensen et al., 1964), isoliert aus der Niere der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Pencillin und 1 µg/ml Streptomycin kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % passagiert.

### **C2C12 Zellen**

C2C12-Zellen sind Skelettmuskelmyoblasten, die aus dem Beinmuskel einer Maus isoliert wurden (ATCC-Nummer: CRL-1772). Für die Kultivierung proliferierender Zellen wurde phenolrotfreies DMEM mit 15 % FCS, 2 % L-Glutamin, 100 U/ml Pencillin, 1 µg/ml Streptomycin und 1 % nichtessentielle Aminosäuren (NEAA) verwendet. Bevor die Myoblasten konfluent waren, wurden sie im Verhältnis 1:3 bis 1:5 umgesetzt. Zum Passagieren wurde der Zellrasen mit 0,25 % Trypsin in PBS abgelöst und wie unter 2.9.2 beschrieben weiterbehandelt. Wurde das Proliferationsmedium gegen Differenzierungsmedium (DMEM mit 0,4 % Ultrosor G, 2 % L-Glutamin, 100 U/ml Pencillin, 1 µg/ml Streptomycin, 1 % NEAA) ausgewechselt, fusionierten die Myoblasten innerhalb von 1–2 Tagen zu Myotuben, die nach 4–5 Tagen Myofibrillen assembliert hatten. Das Differenzierungsmedium wurde jeden zweiten Tag mit 50 % frischem Medium versehen.

### **L6 Skelettmuskelzellen**

L6-Zellen sind Myoblasten und entstammen dem Oberschenkelmuskel von Ratten wurden Myblasten isoliert, die in Proliferationsmedium (DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Pencillin und 1 µg/ml Streptomycin) ausgesät und kultiviert wurden. Die Differenzierung der Myoblasten wurde durch Kultivierung der Zellen mit Differenzierungsmedium (DMEM mit 0,4 % Ultrosor G, 2 % L-Glutamin, 100 U/ml Pencillin, 1 µg/ml Streptomycin, 1 % NEAA) angeregt.

### **HSkM-Zellen**

Für die Gewinnung von humanen Skelettmuskelzellen wurden aus humanem Muskelbiopsiematerial adulte Satellitenzellen isoliert, die als primäre Zelllinie in Proliferationsmedium (DMEM ohne Phenolrot) kultiviert wurden (van der Ven et al., 1992). Die proliferierenden Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:2 bis 1:6 umgesetzt. Zum

Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale wurde 0,05 % Trypsin verwendet. Die myogene Differenzierung wurde durch Verwendung von Differenzierungsmedium für Skelettmuskelzellen (PromoCell, Heidelberg) eingeleitet. Nach 2–3 Tagen waren die Myoblasten zu Myotuben fusioniert, die nach 4–5 Tagen Myofibrillen aufwiesen und teilweise kontraktile waren. Das Differenzierungsmedium wurde alle zwei Tage zur Hälfte mit frischem Medium erneuert.

### Hybridomzellen

Hybridomzellen wurden zunächst in eine kleine Schale bzw. die Vertiefungen einer 6-well Kulturplatte in Hybridommedium (RPMI-1640 (Sigma), 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Pencillin, 1 µg/ml Streptomycin, 0,28 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2 % HT, 2 mM Na-Pyruvat) ausgesät und dort einige Tage kultiviert, bis die Zellzahl ausreichend hoch war, um sie in eine Kulturflasche (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen) zu 25 mL Medium zu geben. Die Zellen wurden in dieser Flasche mehrere Wochen inkubiert, bis sie kein weiteres Wachstum mehr zeigten. Durch kurze Zentrifugation wurden die Hybridomzellen sedimentiert, der Kulturüberstand wurde dann vorsichtig abgenommen und für immunologische Nachweisverfahren verwendet. Zur Stabilisierung wurde dem Hybridomüberstand 1 mM  $\text{NaN}_3$  zugesetzt.

### 2.9.2 Auftauen, Passagieren und Einfrieren von Zellen

Tiefgefrorene Zellen lagerten in flüssigem Stickstoff. Sie wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, sofort in 10 ml vorgewärmtes Medium pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Sorvall RT 7, Rotor RTH 250), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Zu zwei mittlgroßen Schalen (6 cm Durchmesser), die 5 ml vorgewärmtes Medium enthielten, wurden jeweils 500 µl der Zellsuspension gegeben.

Die Zellen wurden kultiviert, bis sie eine optische Konfluenz von 70–80 % erreichten. Dann wurden sie wie folgt abgelöst, verdünnt und in neue Kulturschalen umgesetzt. Die zum Passagieren der Zellen notwendigen Lösungen und Medien wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das verbrauchte Medium wurde von den Zellen abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml 0,5 mM EDTA in PBS einmal gewaschen. Der Waschpuffer wurde entfernt und die Zellen mit 1 ml Trypsin-PBS-Lösung inkubiert, bis sie sich vom Boden der Schale ablösten. Die Trypsinkonzentration war für die einzelnen Zelllinien verschieden, wie bei den

einzelnen Zelllinien genannt. Trypsin wurde dann durch Zugabe eines Volumens frischen Mediums inhibiert. Die Suspension wurde sorgfältig gemischt und die Zellen in geeigneter Dichte auf neue, mit Medium gefüllte Schalen aufgeteilt.

Sollten Zellen eingefroren werden, wurde je 1 ml der Zellsuspension nach Abstoppen der Trypsinreaktion zu 10 ml Medium gegeben und wie oben beschrieben sedimentiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml einer Lösung von 10 % (v/v) DMSO in fötalem Kälberserum resuspendiert, in ein Kryoröhrchen (Nalgene, USA) gefüllt und bei -80 °C über Nacht tiefgefroren. Das Kryoröhrchen wurde dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.9.3 Transiente Transfektionen

Zunächst wurden die Zellen in eine mittelgroße Schale (6 cm Durchmesser) ausgesät, auf deren Boden runde Deckgläschen (12 mm Durchmesser) lagen. Transfektionen wurden durch Einschluß der Vektor-DNA in Lipidmizellen, die mit der Membran der Zellen fusionieren konnten, vorgenommen. Hierfür wurde das Transfektionsreagenz FuGene 6 (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Pro Ansatz wurden in einem Eppendorfgesäß 1–2 µg Plasmid-DNA vorgelegt und in einem weiteren zu 94–97 µl serumfreien DMEM 6–3 µl FuGene-Reagenz hinzupipettiert. Diese Mischung wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die DNA-Lösung pipettiert. Durch Antippen des Gefäßes wurde vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Transfektionsansatz direkt auf die Zellen gegeben und diese über Nacht im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde am nächsten Tag vollständig abgesaugt und durch frisches ersetzt. Die Expression wurde 24–48 Stunden abgewartet und die Zellen dann für die Immunfärbung aufgearbeitet, wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben.

## 2.10 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

### 2.10.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Frisch vom Rind entnommener Skelettmuskel wurde bei -80 °C gelagert. Hiervon wurden kleine Portionen abgenommen und auf dem Block eines Mikrotoms (Mikrotom-Kryostat HM 500 OM, Firma Microm, Walldorf) fixiert. Block und Schneidekammer des Mikrotoms wurden auf -20 °C gekühlt. Proben von menschlichem Skelettmuskel wurden von einer Klinik zur Verfügung gestellt: Biopsiematerial wurde dem Muskelgewebe entnommen und

sofort in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren.

Die 5–8  $\mu\text{m}$  dicken Gefrierschnitte wurden auf einem Glasobjektträger aufgenommen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Immunfärbung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet und dann 5 min in Methanol und 30 s in Azeton bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fixiert und permeabilisiert. Die luftgetrockneten Schnitte wurden auf dem Objektträger mit einem Fettstift (DakoCytomation Pen, Dako, Dänemark) umrandet, so daß sie für Inkubationen mit Antikörperlösung, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, verwendet werden konnten.

### 2.10.2 Immunfärbung von Zellen und Geweben

Transfizierte Zellen befanden sich auf Deckgläschen, die der Kulturschale entnommen und durch mehrmaliges Eintauchen in PBS gewaschen wurden. Die Zellen wurden dann entweder mit Methanol und Azeton fixiert, wie im vorhergehenden Abschnitt erläutert, oder mit Formaldehyd behandelt. Hierzu wurden die Zellen 10 min in 4 % (v/v) Formaldehyd/PBS fixiert, mit 0,5 % (v/v) Triton/PBS 10 min permeabilisiert und dann mit PBS gewaschen.

Gewebeschnitte oder Zellen wurden kurz in PBST getaucht und dann mit Primärantikörper in einer feuchten Kammer eine Stunde inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBST (PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20) wurde 1 Stunde mit Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Präparate in Mowiol (Calbiochem, Heidelberg) eingebettet.

### 2.10.3 Lichtmikroskopie

Indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen wurden mit dem Photomikroskop Axioplan 2 (Zeiss, Jena) und dem Objektiv Plan-Apochromat 63x (63-fache Vergrößerung, numerische Apertur 1,40, Öl-Immersion, Ph3 Phasenkontrastring, Zeiss, Jena) betrachtet und Mikrophotographien mit einer gekühlten CCD-Kamera (Visicam 1300, Visitron, Puchheim) aufgenommen.

Die Anregung der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die verwendeten Sekundärantikörper (siehe 2.5) gekoppelt waren, und das Filtern des vom Präparat kommenden Lichtes erfolgte mit drei verschiedenen Filtersätzen (Zeiss, Jena), die in Tabelle 2.7 aufgelistet werden.

Die Nummer des Filtersatzes entspricht der von der Firma Zeiss verwendeten Nomenklatur. Unter *Filtoreigenschaften* werden in der Tabelle die im Filtersatz verbauten Bandpaßfilter (Anregung), Strahlenteiler (UV-Lampe – Präparat – Okular/Kamera) und



Filtersatz	Filtereigenschaften			Fluorochrom	Emission Falschfarbe
	BP	FT	LP		
01	365±12	510	397	DAPI	blau
09	450–490	510	515	FITC/cy2/alexa488	grün
15	546±12	580	590	TXR/cy3/alexa594	rot

Tabelle 2.7: **Filtersätze im Photomikroskop Axioplan 2.** Jeder Filtersatz ermöglichte die Anregung des genannten Fluorochroms, Strahlteilung des Lichtes zum Präparat und zu Okular/Kamera und das Filtern der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Die Abkürzungen stehen für: *BP*, Bandpaßfilter, *FT*, Strahlenteiler, *LP*, Langpaßfilter. Die von den Filtern durchgelassenen Wellenlängenbereiche sind in nm angegeben. Die Farbe des sichtbaren Emissionslichts wurde zur Falschfarbendarstellung der Mikrophotographien verwendet.

Langpaßfilter (Emission) aufgelistet, die zur Sichtbarmachung der markierten Antikörper benötigt wurden.

#### 2.10.4 Elektronische Bildbearbeitung der Mikrophotographien

Mit der Digitalkamera des Photomikroskops (vgl. 2.10.3) wurden Graustufenbilder aufgenommen, die nachträglich mit dem Bildbearbeitungsprogramm PHOTOSHOP in RGB-Bilder konvertiert wurden. Nachfolgend wurde die ursprünglich im Okular sichtbare Farbe des Emissionslichts der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (vgl. 2.7) als Falschfarbe zum nachträglichen Einfärben der Mikrophotographien ausgewählt. Die Bilder von Doppelmarkierungen mit verschiedenen Sekundärantikörpern wurden jeweils in die Kanäle Rot oder Grün eines RGB-Bildes kopiert und der blaue Kanal mit Schwarz überschrieben. In der Gesamtansicht des RGB-Bildes konnte eine Kolo-kalisation der Fluoreszenzsignale die durch Überlagerung der beiden Farbkanäle als Gelbfärbung sichtbar gemacht werden.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Klonierung der humanen Myomesin cDNA

#### 3.1.1 Komplettierung der humanen Myomesin cDNA-Sequenz am 5'-Ende.

Aus einer humanen Skelettmuskel cDNA-Bank wurden partielle cDNA-Klone isoliert, die die DNA-Sequenz von Myomesin (fast) vollständig abdeckten (Vinkemeier, 1992). Die aus den Einzelfragmenten zusammengesetzte cDNA enthielt einen 4353 bp langen offenen Leserahmen, der für 1451 Aminosäuren kodiert (Vinkemeier et al., 1993), das entspricht einer Molekülmasse von 162 kDa. Die Kopfregion des humanen Myomesinmoleküls war nach dieser Sequenz aber etwas kleiner als bei murinem Myomesin (Steiner et al., 1999) und bei humanem M-Protein. Zudem hatte die mit verschiedenen, gegen Myomesin gerichteten Antikörpern beobachtete Proteinbande im Immunblot eine apparente Masse von 185 kDa. Dieser Widerspruch zwischen der an Hand der DNA-Sequenz berechneten molekularen Masse und der mittels Immunblotting beobachteten ließ sich zunächst nicht weiter aufklären.

Eine Analyse der inzwischen bekannten Sequenz des humanen Myomesingens auf Chromosom 18 deutete auf das Vorhandensein zweier zusätzlicher Exone stromabwärts des bisherigen Translationsstarts, die den Exons 1 und 2 im murinen Myomesingen entsprachen, hin.

Anhand der genomischen Sequenz wurde der Primer My1fwd (siehe Anhang B) entworfen, der zum Nachweis und zur Klonierung der kompletten Myomesinkopfdomäne diente. Mittels RT-PCR konnte unter Verwendung einer RNA-Präparation aus differenzierenden

humanen Skelettmuskelzellen (zur Verfügung gestellt von Dr. van der Ven) mit den Primern My1fwd und My3rev das Fragment My1–3 amplifiziert werden (Ergebnis nicht gezeigt). Auf diese Weise konnte die Existenz des Exons 1 und 2 in dem Transkript des humanen Myomesingens belegt werden. Das Amplifikat My1–3 wurde für die im folgenden beschriebene Klonierung der kompletten Myomesin cDNA benutzt.

Die Herstellung der gesamten Myomesin cDNA mit den Primern My1f und My13rev und einer für größere DNA-Fragmente (>2,5 kb) optimierten PCR *expand long PCR system*, Roche Diagnostics, Mannheim) war mit einer humanen Skelettmuskel cDNA-Bank als Matritze nicht erfolgreich. Versuche, das Fragment My1–7 mit kompletter Kopregion mittels PCR zu amplifizieren, scheiterten ebenso, da der Gehalt an den Basen Guanin und Cytosin in dem neuen Sequenzabschnitt offenbar zu hoch ist, um ein längeres Amplifikat zu erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde der in Abbildung 3.1 dargestellte Weg zur Klonierung der kompletten Myomesin cDNA gewählt.

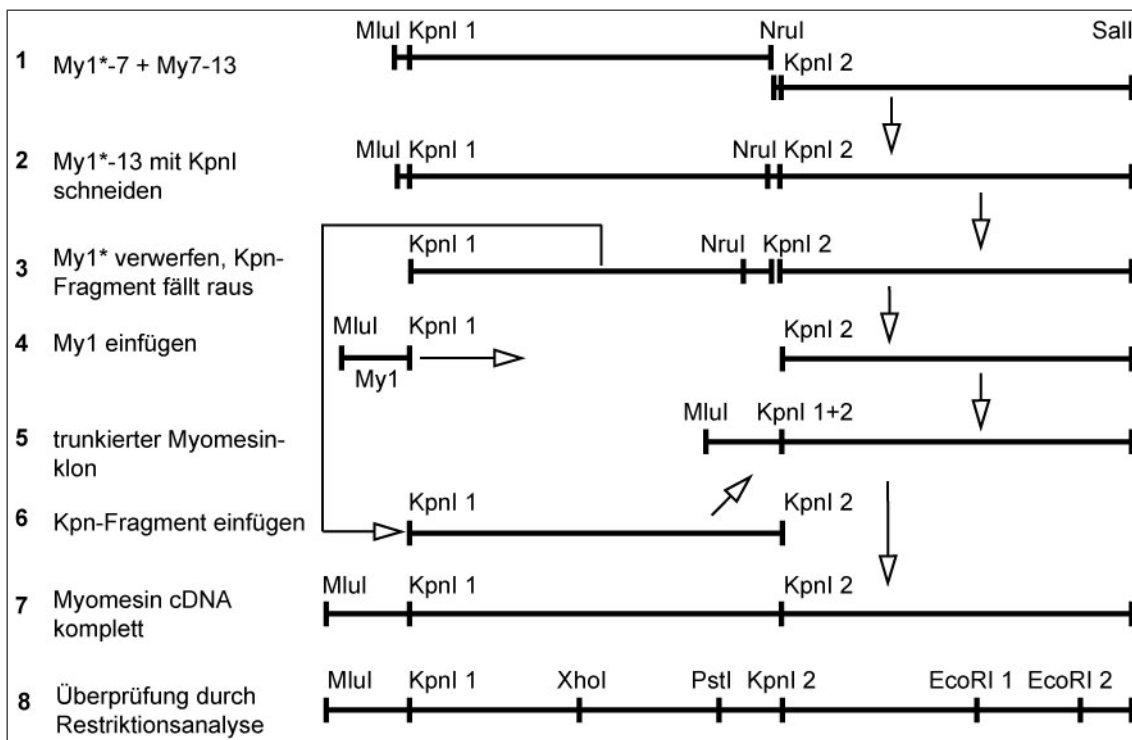


Abbildung 3.1: **Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Komplettierung der humanen Myomesin cDNA.** Die Klonierung der kompletten Myomesin cDNA erfolgte in acht Schritten, die unter 3.1.1 näher beschrieben sind. Die Position der verwendeten Restriktionsschnittstellen ist in den schematisch wiedergegebenen DNA-Fragmente eingezeichnet. My1\* entspricht der am 5'-Ende unvollständigen Myomesinsequenz.

Zunächst wurde das Fragment My1\*–7 mittels PCR vom bisher bekannten Transla-

tionsstartpunkt beginnend amplifiziert. Hierfür diente ein Myomesin cDNA-Fragment in dem Vektor pBS ( $\lambda$  18N) als Matritze. Das carboxyterminale Konstrukt My7–13 lag bereits in dem Plasmid pCMV5-T7 kloniert vor. In Schritt 1 (siehe Abbildung 3.1) wurden die cDNA-Fragmente My1\*–7 und My7–13 durch Verwendung der Restriktionsschnittstelle NruI in Domäne 7 zusammengefügt.

Nach Klonierung in das Plasmid pMyP wurde aus diesem Vektor ein Fragment mit den Enzymen MluI und NruI herausgeschnitten, das ungefähr nach der Hälfte der Domäne 7 endete. Dieses Fragment wurde unter Verwendung der Nru I-Schnittstelle vor das mit MluI und NruI aufgeschnittene Myomesinkonstrukt My7–13, das sich in dem Vektor pCMV5-T7 befand, kloniert (vgl. Abbildung 3.1 1). Die resultierende Myomesin cDNA (My1\*–13) war am 5'-Ende weiterhin unvollständig (Schritt 2).

Die Myomesin cDNA wurde deshalb in Schritt 3 um die in der Datenbank gefundene Sequenz ergänzt. Als Restriktionsschnittstellen wurden MluI am 5'-Ende und KpnI in der bisher bekannten Kopfsequenz ausgewählt. Durch einen entsprechenden Restriktionsverdau wurde das Fragment mit der unvollständigen Sequenz von My1 (in Abbildung 3.1 als My1\* bezeichnet) entfernt. Das Enzym KpnI schneidet aber innerhalb der DNA-Sequenz noch an einer weiteren Position, wodurch ein größerer Teil aus der Myomesin cDNA entfernt wurde (Kpn1-Kpn2-Fragment, x bp), wie schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Der Klonierungsschritt 5 (siehe Abbildung 3.1) ergab daher eine trunktierte Myomesin cDNA. Nach einem Verdau mit dem Restriktionsenzym KpnI wurde in diese cDNA das Kpn1-Kpn2-Fragment wieder einkloniert (Schritt 6) und somit die vollständige cDNA des humanen Myomesins in dem Vektor pCMV5-T7 erhalten (Schritt 7).

Die richtige Orientierung des in Schritt 6 eingefügten Kpn1-Kpn2-Fragmentes in der Myomesin cDNA wurde anhand der Position ausgewählter Restriktionsschnittstellen (schematisch dargestellt in Abbildung 3.1) mit einer Restriktionsanalyse überprüft (Schritt 8). Die Myomesin cDNA, die das Kpn1-Kpn2-Fragment wieder in der richtigen Orientierung enthielt, wurde durch Nachweis der korrekten Position der Restriktionsschnittstelle Nru I (x bp) identifiziert. Da die gesamte Myomesin cDNA fast die gleiche Größe wie der Vektor pCMV5-T7 hatte, konnte die vervollständigte Myomesin cDNA nur durch einen Tripelverdau mit den Enzymen MluI, EcoRI und Sall in Fragmenten sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis dieses Tripelverdaus wird in Abbildung 3.2 gezeigt.

Das Enzym EcoRI schneidet an den Positionen 3891 bp und 4524 bp ( $E_2$ ) in der cDNA, MluI am 5'- und Sall am 3'-Ende, wodurch die Fragmente MluI–EcoRI 1 (x bp), EcoRI 1–EcoRI 2 und EcoRI 2–Sall entstanden sind.

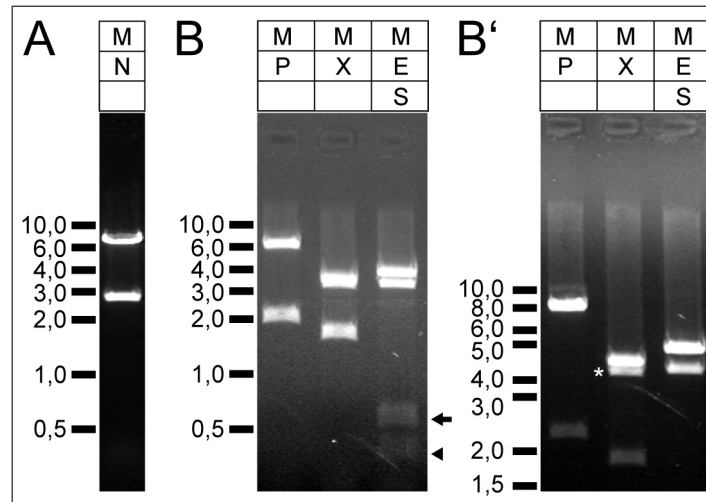


Abbildung 3.2: **Restriktionsanalyse der klonierten Myomesin cDNA.** Der Erfolg der cDNA-Klonierung wurde durch Überprüfung der Position verschiedener Restriktionsschnittstellen innerhalb der DNA-Sequenz mittels analytischem Restriktionsverdau kontrolliert.

Durch die Sequenzierung der cDNA mit mehreren Primern (siehe Anhang B) wurde abschließend bestätigt, daß der hergestellte cDNA-Klon die komplette Myomesinkopfdomäne enthält. Die aminoterminalen Kopfdomäne des humanen Myomesins ist also tatsächlich größer als bisher beschrieben, Damit erhöht sich die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete molekulare Masse des humanen Myomesins auf 182 kDa, was der mittels Immunblot festgestellten apparenten Masse des Myomesin in Skelettmuskelextrakten von 185 kDa gut übereinstimmt.

### 3.1.2 Korrektur der bisher publizierten cDNA-Sequenz des humanen Myomesins.

Einige Fehler in der bisher publizierten cDNA-Sequenz konnten durch die Sequenzierung des Myomesin cDNA-Klons gefunden und korrigiert werden. Dabei wurden die ermittelten Aminosäureaustausche durch einen Sequenzvergleich zwischen den Myomesinen aus verschiedenen Spezies (siehe D) auf eine zusätzliche Bestätigung durch Konservierung innerhalb dieser Myomesinsequenzen überprüft. Auf diese Weise konnte das Vorliegen von Sequenzierfehlern ausgeschlossen werden.

Ein Unterschied war die Entdeckung eines zusätzlichen Triplets an Position 3572 in der cDNA-Sequenz. Dieses Triplet kodiert für einen Alaninrest (Ala<sub>1080</sub>) in Domäne My8, Myomesin ist also um eine Aminosäure länger, als bisher bekannt war.

In Domäne My13 wurde durch Einfügen und Entfernen jeweils einer Base das Leseraster korrigiert. Die neu entstanden Triplets kodieren für die Aminosäuren S1615 und D1616, Serin und Aspartat sind an diesen Positionen bei allen bekannten Myomesinsequenzen konserviert.

Die korrigierte cDNA-Sequenz wurde unter der Zugriffsnummer AJ621424 in die EMBL-Datenbank gestellt.

Ein Sequenzvergleich zwischen bisher verfügbaren aminoterminalen Myomesinsequenzen ist im Anhang unter [D](#) dargestellt. Für eine gezielte Untersuchung wurde die Sequenz der Domäne My1 des humanen Myomesins jeweils mit der aus Ratte, Maus und Huhn mit dem Programm STRETCHER aus dem EMBOSS-Programmpaket (Rice et al., 2000) verglichen. Die Ergebnisse werden in [Tabelle 3.2](#) aufgeführt.

Die Unterschiede zwischen den Kopfdomänen der Myomesine aus Säugetieren wurde durch einen Sequenzvergleich zwischen Mensch und Maus näher untersucht, wie in [Abbildung 3.3](#) gezeigt.

Position	Nukleotid	Aminosäure	konserviert
1073	G–A	G–E	
1238	A–C	G–G	
1659	G–A	R–Q	x
2134	G–C	A–P	x
2494	A–G	S–G	x
2631	A–G	N–S	x
3218	C–T	T–I	
3315	A–T	R–S	x
3572	+gcc	A	x
5174	+C		
5177	<i>TCA</i>	Q–S	x
5180	<i>GAC</i>	T–D	x
5183	–G		

Tabelle 3.1: **Korrektur der humanen Myomesin cDNA.** Die vervollständigte cDNA-Sequenz des humanen Myomesins weicht an einigen Stellen von der bisher publizierten Sequenz ab. Es sind die Basen- und Aminosäureaustausche angegeben und markiert (x), wenn die in die Sequenz neu eingebrachte Aminosäure zwischen den Myomesinen verschiedener Spezies konserviert ist. Ab Base 5174 wird die Korrektur des Leserasters durch Hinzufügen (+C) und Entfernen (-G) von zwei Nukleotiden und der Benennung der dadurch entstandenen *Codons* dargestellt.

Spezies	Identität	Ähnlichkeit
Mensch/Maus	67	75
Mensch/Ratte	76	83
Mensch/Huhn	49	34

Tabelle 3.2: **Vergleich der Homologie der Primärsequenzen von Domäne My1 zwischen verschiedenen Spezies.** Die aminoterminalen Kopfdomäne des Myomesins zeigt zwischen Mensch und Ratte die höchste Identität. Der Vergleich mit der murinen Sequenz der Domäne 1 belegt auch hier auf eine hohe Homologie. Die Primärsequenz des Huhns weicht am stärksten von der humanen Myomesinsequenz ab. Die Werte sind in Prozent angegeben.

	10	20	30	40	50
hsMyom	MSLPFYQRCHQHYDLSYRNKDVRSTVSHYQREKKRSVYTGSTAYSSRS				
	.....	.....	.....	.....	.....
mmMyom	MSLPFYQRSHQHYDLSYRNKDLRTTMSHYQQEKKRSVYTHGSTAYSSRS				
	10	20	30	40	50
	60	70		80	
hsMyom	SAHRRESEAFRRASASSSQQASQ-----HALSSEVSRKAASA				
	.....	.....	.....	.....	.....
mmMyom	LAARROESEAFSQASATSYQQQASQTYSLGASSSRHSQSGSEVSRKTASA				
	60	70	80	90	100
	90	100	110	120	130
hsMyom	YDYGSSHGLTDSSLLDDYSSKLSPKPKRAKHSLLSGEKENLPSDYMVP				My1*
	.....	.....	.....	.....	.....
mmMyom	YDYGSHGLTDSSLLEDYSSKLSPQTKRAKR-VLSGEETGSLPGNYLVP				
	110	120	130	140	
	140	150	160	170	180
hsMyom	IFSGRQKHVSGITDTEEERIKEAAAYIAQRNLLASEEGITTSKQSTASKQ				
	.....	.....	.....	.....	.....
mmMyom	IYSGRQVHISGIRDSEERIKEAAAYIAQKTLASEEAIASKQSTASKQ				
	150	160	170	180	190
	190	200	210	220	230
hsMyom	TTASKQSTASKQSTASKQSTASRQSTASRQSVVSKQATSALQQEETSEKK				
	.....	.....	.....	.....	.....
mmMyom	-----SATSKRTTSTLQREETFEKK				
		200	210		
	240	250	260	270	
hsMyom	SRKVVIREKAERLSLRKTTLEETETYHAKLNEDHLL				
	.....	.....	.....	.....	.....
mmMyom	SRNIAIREKAEELSLKTTLEETQTYHGKLNEDHLL				
	220	230	240	250	

Abbildung 3.3: Die vollständige Kopfdomäne des humanen Myomesins ist der murinen Kopfdomäne sehr ähnlich. Ein Sequenzvergleich zwischen der erstmals vollständig verfügbaren Kopfdomäne des humanen Myomesins mit der gleichen Domäne des murinen Myomesins zeigt eine große Übereinstimmung. Die Sequenzidentität wurde mit dem Programm STRETCHER bestimmt und beträgt 75 %, die Sequenzenähnlichkeit ist 67 %. In der humanen Proteinsequenz fehlt eine 11 Aminosäuren umfassende serinreiche Insertion (ab Position 75), das repetitive Sequenzmotiv S[K/R]QSTA ist um fünf Einheiten länger als in der murinen Sequenz. Zusätzlich zu gleichen (:) und ähnlichen (.) Aminosäuren ist der bisher bekannte Translationsstartpunkt (My1\*) markiert. Sequenzbereiche ohne Übereinstimmung sind mit Strichen gekennzeichnet.



Bedeutende Unterschiede zwischen der humanen und der murinen Primärsequenz der Domäne My1 sind das Fehlen einer 11 Aminosäure langen Insertion (siehe Abbildung 3.3) und dem um fünf Einheiten längeren repetitiven Motiv S[K/R]QSTA in letzten Drittel der Kopfdomäne. In diesem Bereich ist die Homologie zwischen Ratte und Mensch größer als zwischen Mensch und Maus. Die Primärsequenzen von Ratte und Maus untereinander haben eine Identität von 80 % und eine Ähnlichkeit von 85 %. Parallel zu den vorgestellten Arbeiten zur Klonierung und Überprüfung der kompletten Myomesin cDNA wurde anhand der Sequenzen einer cDNA-Bank aus humanen NT2-Zellen (isoliert aus Metastasen eines Teratokarzinoms) ein Myomesinklon voller Länge erstellt und in der EMBL-Datenbank veröffentlicht (Zugriffsnummer AK125322). Diese Myomesin cDNA ist zu 99,8 % identisch mit der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten cDNA (Auswertung mit dem Programm STRETCHER).

## 3.2 Phosphorylierung des humanen Myomesins

Biochemische Experimente hatten gezeigt, daß Myomesin *in vitro* an verschiedenen Stellen durch unterschiedliche Proteinkinasen phosphoryliert werden kann (Obermann et al., 1995, 1997).

Mit dem phosphorylierungsabhängigen Antikörper NE14 (Shaw et al., 1984) wurde der Einbau von Phosphatresten in dem die letzten 60 Aminosäuren umfassenden Sequenzabschnitt am Myomesincarboxyterminus nachgewiesen (Obermann et al., 1995). Die hierfür verantwortliche(n) Proteinkinaseaktivität(en) und die phosphorylierte(n) Aminosäure(n) sind bisher nicht bekannt. Durch Testung verschiedener Stimulatoren und Inhibitoren konnte aber eine Proteinkinase A Aktivität ausgeschlossen werden (Obermann, 1996).

Nativ aufgereinigtes Myomesin und rekombinante Konstrukte ließen sich *in vitro* durch gereinigte Proteinkinase A phosphorylieren. Mittels zielgerichteter Mutation bestimmter Aminosäuren konnte der Serinrest 618 (Serin 482 nach alter Nomenklatur) identifiziert werden, der durch PKA phosphoryliert wird (Obermann et al., 1997). Dieses Serin befindet sich in dem Sequenzabschnitt, der die Domänen vier und fünf verbindendet.

In Rinderskelettmuskelextrakt war eine Proteinkinaseaktivität vorhanden, die Myomesin an Serin 618 phosphorylierte und die durch Zugabe des PKA-Modellsubstrates Kempid Kemp et al. (1977) spezifisch hemmbar war (Obermann et al., 1997).

Eine eindeutige Bestätigung für eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von Myomesin fehlte aber ebenso, wie Hinweise auf die beteiligten Signalkaskade(n). Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit wurde diese Phosphorylierung bezüglich der verantwortlichen Kinase näher charakterisiert und der Phosphorylierungsstatus des humanen Myomesins *in vivo* untersucht.

### 3.2.1 Myomesin wird durch PKA phosphoryliert

Ein Extrakt kultivierter Skelettmuskelzellen (siehe 2.7.16) diente für die *in vitro* Phosphorylierung des rekombinanten Myomesins My4-5 als Proteinkinasequelle. Die Ergebnisse verschiedener radioaktiver Phosphorylierungsexperimente (siehe 2.7.16) ist in Abbildung 3.4 wiedergegeben.

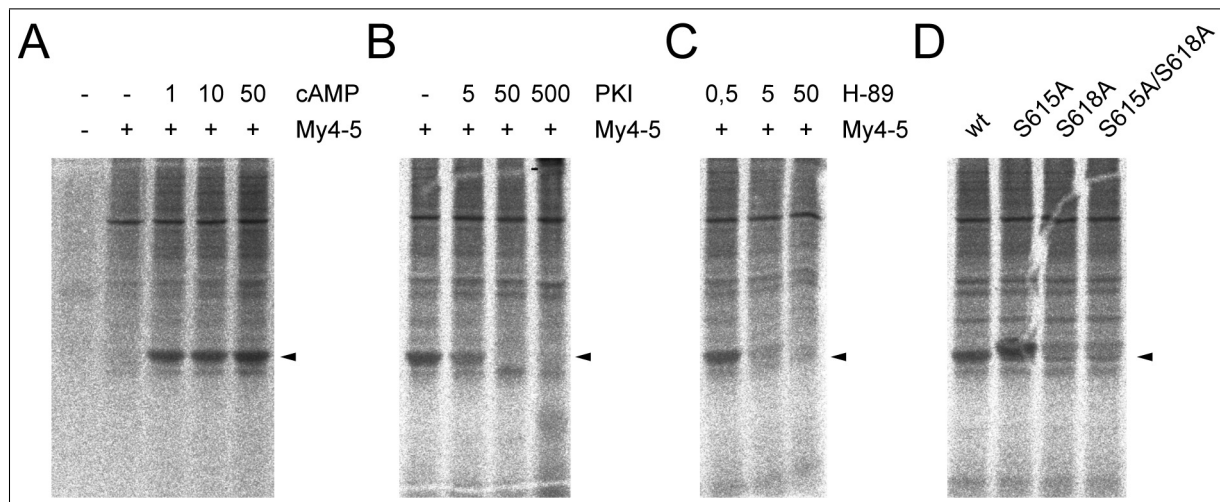


Abbildung 3.4: Die *in vitro* Phosphorylierung von My4-5 ist cAMP-abhängig und wird durch PKA-Inhibitoren gehemmt. Die Autoradiographien zeigen das durch Einbau von radioaktivem Phosphor markierte Myomesinfragment My4-5 (Pfeilspitzen), als Quelle für die Proteinkinaseaktivität diente Skelettmuskelextrakt. **A.** Die Phosphorylierung von My4-5 ist abhängig von der Konzentration an cAMP im Ansatz, hier angegeben in µM. **B.** Die Zugabe des spezifischen PKA-Inhibitors PKI vermindert bei einer Konzentration von 5 µg/ml die Menge an eingebauter Radioaktivität und verhindert die Phosphorylierung von My4-5 bei 50 und bei 500 µg/ml. **C.** Die gezielte Hemmung der PKA wurde mit einem weiteren Inhibitor, H-89, demonstriert. Bei einer Konzentration von 5 µM H-89 ist eine Markierung von My4-5 kaum noch, bei 50 µM gar nicht mehr nachweisbar. **D.** Die Phosphorylierung von My4-5 durch PKA erfolgt an Serin 618, denn der Wildtyp und die Mutante S615A wurden markiert (Pfeilspitze), die Mutanten S618A und S615A/S618A nicht.

Wie in Abbildung 3.4 gezeigt wird, ist die Phosphorylierung des Myomesinfragmentes 4-5 streng von der Anwesenheit von cAMP-abhängig. In der Kontrolle ohne cAMP ist keine radioaktive Markierung des Fragmentes nachweisbar. Sie war am stärksten bei 50 µM cAMP im Ansatz und deutet auf eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Proteinkinase, PKA, hin.

Die Kinaseaktivität in dem Muskelzellextrakt konnte mit dem spezifischen PKA-Inhibitor PKI bereits mit 5 µg/ml im Ansatz vermindert und mit 50 µg/ml und 500 µg/ml vollständig gehemmt werden (siehe Abbildung 3.4 B). Mit einem weiteren Inhibitor, H-89, ließ sich ebenfalls eine Hemmung der PKA-abhängigen Phosphorylierungsreaktion nachweisen (vgl. Abbildung 3.4 C). Auch mit diesem Inhibitor verschwand die radioaktive Markierung des My4–5 Fragmentes, wofür bereits 5 µM H-89 im Ansatz ausreichten.

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden drei rekombinante Myomesinkonstrukte hergestellt: Austausch von (1) Serin 615 gegen Alanin (S615A), (2) Serin 618 gegen Alanin (S618A), (3) beider Serinreste gegen Alanin (S615A/S618A), beschrieben in Obermann et al. (1996). Mit diesen Konstrukten wurde gezeigt, daß Serin 618 die *in vitro* durch gereinigte PKA und Rinderskelettmuskelextrakt phosphorylierbare Aminosäure ist (Obermann et al., 1997). Mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Extrakt kultivierter Skelettmuskelzellen wurde ebenfalls nur dieser Serinrest in der Linker-Sequenz zwischen den Domänen My4 und My5 phosphoryliert (vgl. Abbildung 3.4 D), die Mutante S615A zeigte keine radioaktive Markierung.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde in kultivierten humanen Skelettmuskelzellen die Aktivität der Proteinkinase A mit verschiedenen Stimulatoren erhöht (siehe 2.7.17). 8-Br-cAMP ist ein membrandurchgängiges cAMP-Analogon, das die PKA direkt aktiviert. Clenbuterol und Isoprenalin stimulieren  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, die durch G-Proteine die Adenylatzyklase aktivieren, die ihrerseits durch die Produktion von cAMP stimulierend auf die PKA wirkt. Forskolin erhöht die Aktivität der Adenylatzyklase direkt.

Durch die Stimulierung der PKA konnte eine Zunahme der Menge an phosphoryliertem Myomesin in den Zellen bzw. in den Zellextrakten mit dem Antikörper HG12A9 (siehe 2.7.13) beobachtet werden, wie in Abbildung 3.5 dargestellt.

Während 8-Br-cAMP nur einen schwachen Einfluß auf die Myomesinphosphorylierung hatte, bewirkten Clenbuterol und Isoprenalin eine deutliche Zunahme an Phosphomyomesin in den Zellen. Eine Stunde nach Stimulierung der Myotuben war eine deutlich erhöhte Myomesinphosphorylierung festzustellen, die bis zum Zeitpunkt 4 h noch weiter gesteigert wurde.

Die Zugabe von Forskolin dagegen führte zu einer schnellen Antwort, denn bereits nach fünf Minuten war mehr phosphoryliertes Myomesin detektierbar als in den Kontrollen. Die Wirkung ließ aber schnell nach, so daß schon nach 20 min die Phosphomyomesinmenge vergleichbar hoch zu den Kontrollen war. Die Stimulierung mit Clenbuterol und Isoprenalin

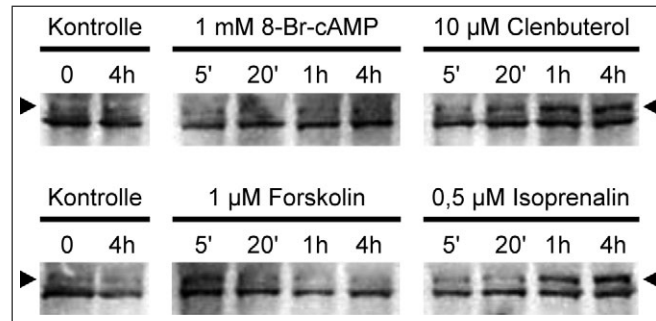


Abbildung 3.5: **Myomesin wird in HSkM-Zellen durch PKA-Stimulation vermehrt phosphoryliert.** Kultivierte humane Skelettmuskelzellen wurden mit verschiedenen Stimulatoren inkubiert und nach den angegebenen Zeitpunkten extrahiert. Phosphomyomesin wurde durch Immunblotting mit dem Antikörper HG12 sichtbar gemacht (Pfeilspitzen). In Extrakten nicht stimulierter Zellen (*Kontrolle*) veränderte sich die Menge an phosphoryliertem Myomesin über den beobachteten Zeitraum von vier Stunden nicht. Forskolin bewirkte eine Zunahme phosphorylierten Myomesins bereits nach 5 min, die Wirkung ließ aber schnell nach, während ein deutlicher Effekt bei Clenbuterol und Isoprenalalin erst nach 1 h eintrat. Die Menge an Phosphomyomesin blieb auch nach 4 h im Vergleich zu den Kontrollen hoch. 8-Br-cAMP hatte einen nur geringen Einfluß auf die Myomesinphosphorylierung. Die in allen Proben unterhalb des Phosphomyomesins sichtbare Bande war eine Nebenreaktion des Antikörpers.

zeigte den höchsten Einfluß auf die Myomesinphosphorylierung.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß mit den hier verwendeten Inhibitoren Proteinkinase A aus Skelettmuskelzellextrakt eindeutig als die Kinase identifiziert werden konnte, die Myomesin an Serin 618 *in vivo* phosphoryliert. Diese Phosphorylierung erfolgte in kultivierten Zellen auch bei Erhöhung der PKA-Aktivität durch die Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren mit Clenbuterol und Isoprenalalin.

### 3.2.2 Herstellung eines phosphorylierungsabhängigen monoklonalen Antikörpers

Zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen an Serin 618 phosphoryliertes Myomesin wurde eine Maus mit einem an KLH gekoppelten Phosphopeptid (WO17p, siehe 2.7.13) immunisiert, das den mit einer Phosphatgruppe kovalent verknüpften Serinrest enthielt, der Serin 618 in Myomesin entsprach.

Die Immunisierung und die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte zur Etablierung einer monoklonalen Hybridomazelllinie wurden von Herrn Dr. Behrsing und Frau Manuela Heiner, Universität Potsdam, Abteilung Biotechnologie, durchgeführt. Nach zwei Nachimmunisierungen mit dem Antigen konnten im Serum des Tieres Antikörper, die in einem Flüssig-Festphasentest (ELISA) an das Phosphopeptid banden, nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Maus wurde getötet und die aus der Milz des Tieres isolierten B-Lymphozyten mit murinen Myelomzellen fusioniert. Die Hybridomzellen wurden unter HAT-Selektion kultiviert und durch wiederholtes Reklonieren bis zum Erhalt von monoklonalen Zelllinien weitergeführt. Ein ausgewählter Hybridomklon, HG12A9, sezernierte nur gegen das Peptid WO17p, aber nicht gegen das Peptid WO17 gerichtete Antikörper, wie mit Hilfe eines ELISA Tests sichergestellt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

Diese Hybridomzelllinie wurde wie unter 2.9.1 angegeben kultiviert, um größere Mengen des monoklonalen Antikörpers HG12A9 zu produzieren. Die Spezifität des Antikörpers wurde zum einen durch Bindung an phosphoryliertes My4–5 (Abb. 3.6) und zum anderen durch Detektion von Myomesin in Zellextrakten (Abb. 3.7) überprüft.

Hierfür wurde zunächst Myomesin 4–5, das den phosphorylierbaren Serinrest 618 enthielt, durch gereinigte PKA *in vitro* wie unter 2.7.16 angegeben phosphoryliert. Zur Kontrolle wurde phosphoryliertes Protein mittels zweidimensionaler Elektrophorese (vgl. 2.7.18) und Immunblotting sowie durch radioaktive Markierung von My4–5 mit  $\gamma$ [<sup>33</sup>P] (siehe 2.7.16 und 2.7.17) sichtbar gemacht.

Für den Nachweis phosphorylierten Proteins mittels Elektrophorese und Immunblotting wurde rekombinantes My4–5 *in vitro* in drei verschiedenen Ansätzen inkubiert: (1) Kontrolle ohne ATP und PKA, (2) ohne ATP, mit PKA und (3) mit ATP und mit PKA. Abbildung 3.6 A zeigt das nach zweidimensionaler Elektrophorese und Immunblotting sichtbare My4–5. Nur in dem Ansatz mit ATP und PKA wurde My4–5 phosphoryliert und war als zusätzlicher immunreaktiver Fleck sichtbar. Die umrandete Pfeilspitze markiert die Position dieses phosphorylierten My4–5, das während der isoelektrischen Fokussierung weiter in den sauren Bereich des Kapillargels als das nicht phosphorylierte My4–5 (schwarze Pfeilspitze) gewandert ist.

Die Effizienz der Phosphorylierung des Myomesinfragmentes My4–5 durch den gewählten Phosphorylierungsansatz wurde zusätzlich durch Einbau radioaktiven Phosphors in das My4–5 Fragment überprüft (siehe 2.7.17). Zwei Ansätze, mit und ohne My4–5, wurden mit PKA in Gegenwart von  $\gamma$ [<sup>33</sup>P]ATP inkubiert. Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das getrocknete Gel autoradiographiert, um markiertes My4–5 sichtbar zu machen (Abbildung 3.6 B). In dem Ansatz mit My4–5 ist die radioaktive Markierung des rekombinanten Proteins vor dem Hintergrund schwächerer, radioaktiver Proteinbanden zu sehen.

Für die Inkubation mit dem unverdünnten Hybridomüberstand HG12A9 wurden jeweils 50 ng natives phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes My4–5 sowie BSA auf eine

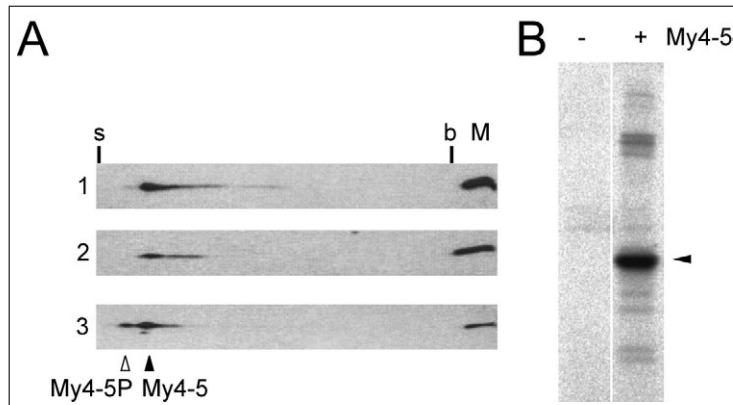


Abbildung 3.6: **Das Myomesinfragment My4–5 wird *in vitro* durch PKA phosphoryliert.** **A.** Durch zweidimensionale Elektrophorese wurde phosphoryliertes Myomesin My4–5 (umrandete Pfeilspitze) von nicht phosphoryliertem My4–5 (schwarze Pfeilspitze) abgetrennt und dann mittels Immunblotting mit dem Antikörper WO17 sichtbar gemacht. My4–5 wurde in PBS (1), mit PKA und ohne ATP in Phosphorylierungspuffer (2) und mit PKA und ATP (3) inkubiert. Der Verlauf des pH-Gradienten von sauer (s) nach basisch (b) im IEF-Gel (erste Dimension) und die Beladung der Markerspur (M) des SDS-Gels (zweite Dimension) mit nicht phosphoryliertem My4–5 als Kontrolle sind angegeben. **B.** Durch Autoradiographie wurden in Phosphorylierungsansätzen mit (+) und ohne (-) My4–5 mit  $^{33}\text{P}$  radioaktiv markiertes Protein (Pfeilspitze) nachgewiesen.

Nitrozellulosemembran getropft. Der Antikörper HG12 dekorierte nur das phosphorylierte Myomesinfragment My4–5, das nicht phosphorylierte My4–5 und BSA wurden nicht erkannt (Abbildung 3.7, A).

In einem weiteren Experiment wurde phosphoryliertes Myomesin in Zellextrakten humaner Skelettmuskelzellen (HSkM) nachgewiesen. Abbildung 3.7 B zeigt das Ergebnis der Immundetektion.

Mit dem Antikörper WO17 wurde eine im Verlaufe der induzierten Differenzierung der Zellen (siehe 2.9.1) zunehmende Expression des endogenen Myomesins verfolgt. Der phosphorylierungsabhängige Antikörper HG12A9 dekorierte in den Zellextrakten ebenfalls Myomesin, aber im Vergleich zu dem Antikörper WO17 später, ab dem zweiten Tag der Differenzierungsreihe, und deutlich sichtbar erst ab Tag vier. Das *in vivo* phosphorylierte Myomesin konnte nicht gleichzeitig mit dem nichtphosphorylierten Myomesin nachgewiesen werden, weil möglicherweise die Menge zu gering war. Das stärkste Signal trat erst in weit differenzierten Zellen (Tag sieben) auf.

Zusätzlich dekorierte der Antikörper HG12A9 in den untersuchten Zellextrakten neben phosphoryliertem Myomesin ein weiteres Protein, das im SDS-Gel als eine Bande von ungefähr 170 kDa Größe darstellbar war. Die Intensität dieser Bande war in nicht differenzierten Zellen (Tag 0) am stärksten, sie nahm im Verlaufe der Differenzierung ab. Das

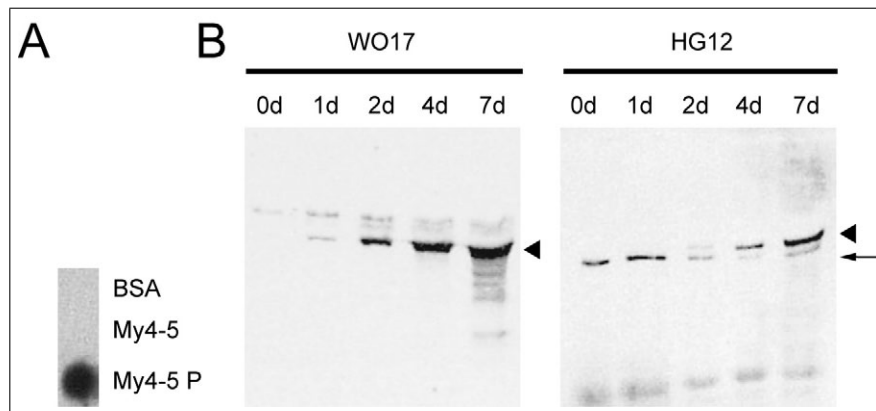


Abbildung 3.7: **Der Antikörper HG12A9 dekoriert phosphoryliertes My4–5 und Phosphomyomesin in Zellextrakten.** **A.** Rekombinantes My4–5 wurde *in vitro* durch PKA phosphoryliert und neben BSA und nicht phosphoryliertem My4–5 auf eine Nitrozellulosemembran getropft. Nur das phosphorylierte Protein wurde durch den monoklonalen Antikörper dekoriert, mit nicht phosphoryliertem My4–5 und BSA gab es keine Interaktion. **B.** Kultivierte Myoblasten wurden zur Differenzierung gebracht und nach den genannten Zeitpunkten extrahiert. Die zunehmende Expression endogenen Myomesins wurde mit dem Antikörper WO17 sichtbar gemacht. Myomesin war ab dem ersten Tag der Differenzierungsreihe und in Extrakten von Tag sieben am stärksten nachweisbar. Phosphomyomesin trat zeitlich verzögert, ab Tag zwei detektierbar, in den Extrakten auf. Eine weitere Proteinbande wurde durch den monoklonalen Antikörper HG12 dekoriert, deren zeitliches Erscheinen dem des Phosphomyomesin entgegengesetzt war (Pfeil). Das korrespondierende Protein ist bisher unbekannt.

dieser Bande entsprechende Protein ist unbekannt, es wurde aber nicht von dem Myomesinantikörper WO17 erkannt. Die Identität dieses Proteins ließ sich auch nicht durch eine Suche in einer Proteindatenbank erklären: Das das Serin 618 im humanen Myomesin flankierende Aminosäuremotiv KARLKSRRPSAPW wurde bei der Suche in der Internetdatenbank UniProt mit Programm NCBI BLASTP nur in Myomesin bzw. in dem mit Myomesin identischen Protein FLJ4332 gefunden. Ein Protein, das das Epitop des Antikörpers HG12A9 enthält und mit dem dieser Antikörper kreuzreaktiv sein könnte, ließ sich auf diese Weise nicht ermitteln.

Nachdem die Detektion phosphorylierten Myomesins in Zellextrakten erfolgreich war, wurden Gefrierschnitte von humanem Herzmuskelgewebe (hergestellt wie unter 2.10.1 beschrieben) mit dem Antikörper HG12A9 untersucht. Die Lokalisation des monoklonalen Antikörpers HG12A9 wurde mit der des polyklonalen Antikörpers WO17 verglichen. Die gleichzeitige Inkubation mit den Antikörpern T12 gegen Titin bzw. Ab653 gegen  $\alpha$ -Aktinin (siehe Tabelle 2.4) diente der Markierung der Z-Banden in den Sarkomeren. Abbildung 3.8 zeigt Fluoreszenzaufnahmen der gefärbten Schnitte. In dem Herzmuskelgewebe konnte mit dem Antikörper HG12A9 phosphoryliertes Myomesin nachgewiesen werden. Beide Myo-

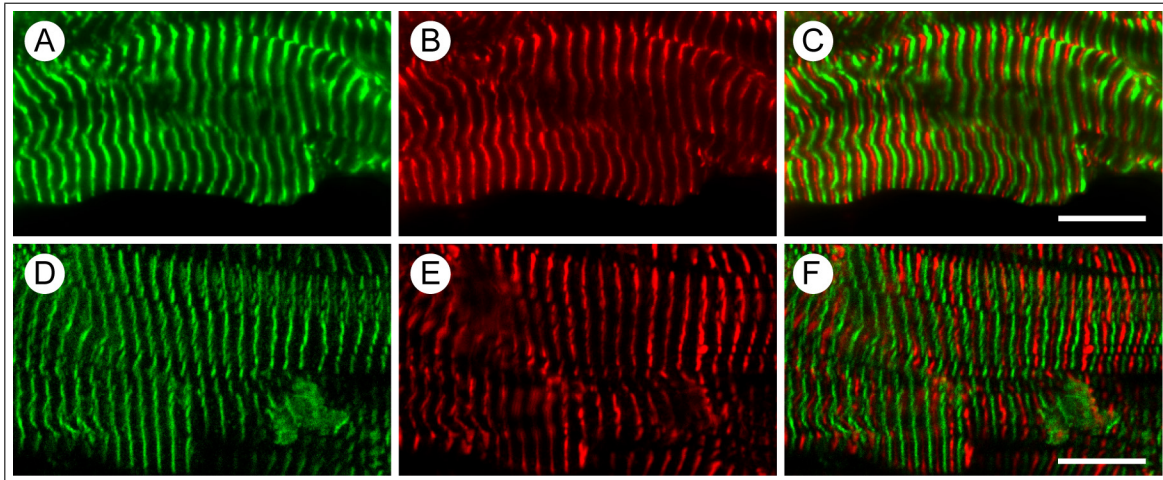


Abbildung 3.8: **In Gefrierschnitten von Herzmuskelgewebe ist phosphoryliertes Myomesin mit dem Antikörper HG12A9 nachweisbar.** Myomesin wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern und die Z-Bande mit Antikörpern gegen Titin (T12, B) und  $\alpha$ -Aktinin (Ab653, E) markiert. Der polyklonale Myomesinantikörper WO17 dekorierte die M-Bandregion (A), in der auch der phosphorylierungsabhängige Antikörper HG12A9 nachweisbar war (D). In den Überlagerungen der beiden Farbkanäle (C, F) ist das alternierende Bandenmuster von Z- und M-Bandenmarkierung deutlich zu sehen.  $\alpha$ -Aktinin wurde in der Z- und Myomesin in der M-Bande nachgewiesen. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

mesinantikörper dekorierten Epitope, die ausschließlich in der M-Bande lagen. Mit diesen Experimenten ließen sich aber keine quantitative Aussagen über das Verhältnis von phosphoryliertem zu nicht phosphoryliertem Myomesin treffen. Interessanterweise reagiert der Antikörper HG12A9 nicht mit Myomesin in Extrakten von murinem Muskelgewebe. Die murine Myomesinsequenz weist zwei Positionen vor dem Serin 618 einen Histidinrest auf, die Proteinsequenzen des humanen Myomesin enthält an dieser Position einen Argininrest. Möglicherweise beeinflusst das Histidin die Ausbildung eines Epitopes, das von dem Antikörper HG12A9 gebunden werden kann.

### 3.2.3 Phosphoryliertes Myomesin im hypertrophen Herzmuskel

In Kooperation mit zwei Kliniken, der Charite, Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, und dem Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Georgstrae 11, 32545 Bad Oeynhausen, konnten Herzmuskelgewebeproben von verschiedenen Patienten, die an einer Hypertrophen Kardiomyopathie (HCM, siehe 1.3) erkrankt waren, untersucht werden.

Die HCM-Patienten waren in den zwei genannten Kliniken in Behandlung und wurden daher für die folgende Untersuchung den Patientenkollektiven HCM 1 und 2 zugeordnet.



Diesen Patienten wurde im Rahmen einer Myektomie Muskelgewebe aus dem Septum entfernt, um eine krankheitsbedingte obstruktive Verengung im linken Ventrikel des Herzens zu beseitigen und so die Auswurfleistung des Herzenmuskels und damit den Gesundheitszustand zu verbessern. Kontrollproben entstammten abgelehnten Spenderherzen, die ursprünglich für eine Transplantation vorgesehen waren (Kontrollkollektiv).

In unserem Labor wurden die Gewebeprobe zu für die SDS-PAGE geeigneten Extrakten verarbeitet (siehe 2.7.6) und mittels Immunblotting analysiert. Die Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Proben und dazugehörige relevante Daten sowie die Reihenfolge der Probenauftragung auf verschiedene Polyacrylamidgele. Die aufzutragende Proteinmenge der Gewebeextrakte wurde durch Vorversuche auf ein vergleichbar starkes Signal für die  $\alpha$ -Aktinindetektion eingestellt. Diese Signalstärke wurde mittels densitometrischer Auswertung (siehe 2.7.11) des durch die ECl-Reaktion (siehe 2.7.11) belichteten Röntgenfilms ermittelt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Versuche, für die Beladungskontrolle die häufig verwendete Detektion eines Enzyms des Grundstoffwechsels, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, heranzuziehen, hatten sich bei den Proben als nicht durchführbar erwiesen, da die detektierbare Menge nicht reproduzierbar war. Daher wurde die Muskelisoform des  $\alpha$ -Aktinins für die Normierung ausgewählt, denn auf diese Weise wurde die Menge an Muskelproteinen aneinander angepaßt und eine durch den pathologischen Prozeß der Fibrose verminderte Muskelzellzahl pro Milligramm Gewebeprobe ausgeglichen. Für  $\alpha$ -Aktinin konnte zudem gezeigt werden, daß die Proteinmenge im Verhältnis zu Aktin zwischen gesundem, hypertrophem und terminal insuffizientem Herzmuskel nicht verändert ist (Aquila et al., 2004).

Der immunologische Nachweis des an Serin 618 phosphorylierten Myomesins zeigte, daß dessen Menge bei den HCM-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen deutlich vermindert war. Die Gesamtmenge an Myomesin dagegen war bei den auf gleiche Mengen an  $\alpha$ -Aktinin eingestellten Gewebeextrakten nicht verändert, wie die Detektion mit dem gegen den Aminoterminus von Myomesin gerichteten Antikörper WO6 ergab.

Zur statistischen Auswertung wurden die densitometrischen Daten für die Detektion von phosphoryliertem Myomesin (Antikörper HG12A9) und der Gesamtmenge an Myomesin (Antikörper WO6) sowie Myomesin (Antikörper WO6) und  $\alpha$ -Aktinin (Antikörper EA53) ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerte aus allen untersuchten Proben wurden als Säulendiagramm mit eingezeichnetem Fehlerindikator für Standardabweichung graphisch dargestellt (siehe Abbildung 3.10). Daneben wird die Verteilung der Einzelwerte gezeigt (schwarze Dreiecke), um die Streuung der Probenwerte zu verdeutlichen. Die Auswertung

Laufspur	Kollektiv	Geschlecht	Alter	Kode	Densitometrie		
					HG12	WO6	EA53
1	Kontr.	w	18	NF1	776,2	435,3	211,8
2	Kontr.	w	40	NF2	530,8	438,8	368,7
3	Kontr.	m	43	NF5	495,7	532,2	311,2
4	Kontr.	w	5	NF7	490,3	551,1	334,8
5	HCM1	w	72	HCM1	176,6	632,6	366,2
6	HCM1	m	42	HCM2	113,6	499,7	402,7
7	HCM1	m	59	HCM3	413,3	681,6	664,9
8	HCM1	m	53	HCM4	339,7	692,9	619,0
9	HCM1	m	36	HCM5	416,8	756,5	584,1
10	HCM1	m	66	HCM6	383,2	553,2	525,0
11	HCM1	m	73	HCM7	188,0	756,8	540,2
12	HCM2	m	43	1230	273,2	582,2	240,5
13	HCM2	m	58	1012	92,0	542,6	298,4
14	HCM2	w	69	1251	351,6	719,9	571,0
15	HCM2	w	65	1160	223,6	646,9	472,6
16	HCM2	w	24	1276	156,4	548,4	555,8
17	HCM2	w	68	1253	5,6	305,2	347,2
18	HCM2	w	85	1247	45,8	489,7	348,6
19	HCM2	m	30	1080	298,6	692,2	618,0
20	HCM2	m	71	1086	374,9	731,6	606,9
21	HCM2	w	70	1271	221,9	673,8	477,5

Tabelle 3.3: **Verwendete Herzmuskelproben verschiedener HCM-Patienten.** Herzmuskelgewebeproben wurden von drei verschiedenen Patientenkollektiven aufgearbeitet und für Immunblottingversuche verwendet, das Beladungsschema der verwendeten Polyacrylamidgele ist hier gezeigt (*Laufspur*). Neben Lebensalter und Geschlecht der Patienten werden die klinikinterne Probenkodierung und die Meßwerte der densitometrischen Auswertung für die einzelnen Antikörperdetektionen aufgeführt.

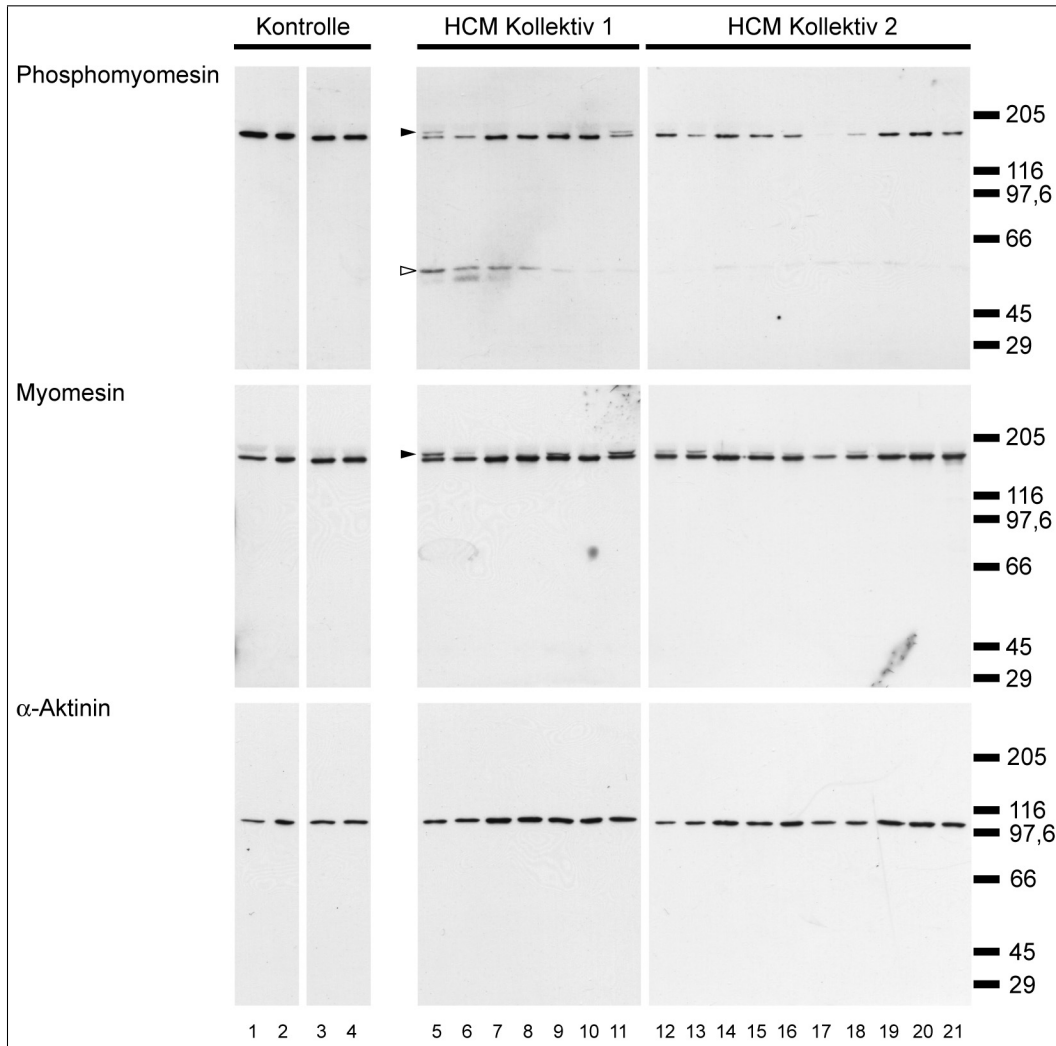


Abbildung 3.9: **Phosphoryliertes Myomesin ist in Herzmuskelgewebeproben von HCM-Patienten vermindert** Durch Immunoblotting wurden Gewebeextrakte von 17 HCM-Patienten, unterteilt in die Patientenkollektive 1 und 2, mit zwei verschiedenen Antikörpern analysiert. Septumgewebe nicht erkrankter Herzmuskel wurden als Kontrollen verwendet (Spuren 1–4). Die Immundetektion mit dem Phosphomyomesinantikörper HG12A9 zeigte bei beiden Patientenkollektiven eine verminderte Menge des phosphorylierten Myomesins bei nahezu unveränderter Gesamtmenge des Proteins (Myomesinantikörper WO6) in den Muskelproben. Die Auftragung gleicher Proteinmengen auf das Gel wurde mit dem  $\alpha$ -Aktininantikörper EA53 überprüft. Die schwarzen Pfeilspitzen deuten auf eine in einigen Proben (Spur 5, 9, 11, 18) mit den Myomesinantikörpern WO6 und HG12A9 markierte Bande höherer molekularer Masse hin, die der EH-Myomesinspleißvariante entsprechen könnte. In allen HCM-Proben konnte mit dem Antikörper HG12A9 eine kleinere Bande (umrahmte Pfeilspitze) sichtbar gemacht werden, in den Spuren 5–7 trat in dieser Region ein Duplett auf. Ein Molekularmassenstandard ist in kDa angegeben.

der Densitometriedaten bestätigt die verminderte Detektion des phosphorylierten Myomesins in den HCM-Kollektiven 1 und 2 (vgl. Abb. 3.10 A) und zeigt gleichzeitig, daß die Gesamtmenge an Myomesin in den HCM-Proben gegenüber den Kontrollen signifikant vermindert bleibt (vgl. Abb. 3.10 B).

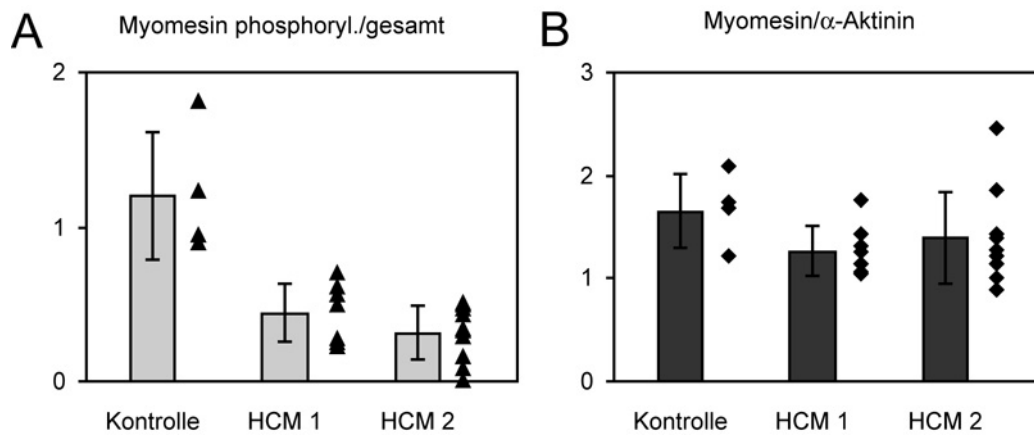


Abbildung 3.10: **Statistische Untersuchung zur verminderten Menge an Phosphomyomesin in HCM-Gewebeproben.** Die Daten aus der densitometrischen Auswertung der in Abbildung 3.9 gezeigten Immunblots wurden wie angegeben ins Verhältnis gesetzt, wobei Mittelwert und Standardabweichung als Balkendiagramm und die Verteilung der einzelnen Probenwerte als Dreiecke wiedergegeben sind. **A.** Phosphoryliertes Myomesin ist im Vergleich zu den Kontrollen bei den HCM-Kollektiven 1 und 2 deutlich vermindert. **B.** Die Kontrolle auf gleichgroße Proteinmengen im Gel zeigt, daß die Mengenverhältnisse von Myomesin gesamt und  $\alpha$ -Aktinin zwischen den drei Kollektiven Kontrolle, HCM 1, HCM 2 vergleichbar groß sind.

Interessanterweise konnte mit den beiden Myomesinantikörpern in einigen HCM-Proben eine immunreaktive Bande höherer molekularer Masse sichtbar gemacht werden, die von ihrer Größe der EH-Myomesinspleißvariante (siehe 1.1.2) entsprach. Der Größenunterschied zwischen den in Abbildung 3.9 wiedergegebenen Myomesinbanden wurde mittels  $R_f$ -Wertbestimmung ermittelt und beträgt 8 kDa. Dieser Wert paßt gut zu dem Größenunterschied von 10 kDa, der sich rechnerisch von den Aminosäuresequenzen beider humanen Myomesinisoformen ergibt. Die Immundetektion von Myomesin und EH-Myomesin in adulten und embryonalen Hühnchenkardiomyozyten ergab einen ähnlich großen Laufunterschied beider Isoformen im SDS-Gel (Agarkova et al., 2000). Bei einigen HCM-Erkrankungsfällen ist also die Reexpression der embryonalen EH-Myomesinisoform nachweisbar, diese Myomesinisoform ist *in vivo* ebenfalls am Serinrest 618 phosphoryliert.

Der monoklonale Antikörper HG12A9 reagierte bei einigen Proben, die zum Kollektiv HCM 1 gehörten, im Immunblot mit Banden von 58 kDa und 54 kDa Größe (siehe Abbildung 3.9). Der gegen die Myomesinkopfdomäne gerichtete Antikörper WO6 dekorierte

diese Banden nicht, es könnte sich eventuell um proteolytische Myomesinfragmente aus dem ersten Drittel des Moleküls, unter Einschluß der phosphorylierbaren Insertion zwischen den Domänen 4 und 5, handeln. Eine Kreuzreaktivität mit einem anderen Protein ist nicht auszuschließen, die Banden sind aber deutlich kleiner als die bei differenzierenden HSkM-Zellen beobachtete Nebenreaktion mit dem Antikörper HG12A9 (siehe 3.7).

### 3.3 Myomesin interagiert mit der muskelspezifischen Kreatinkinase Isoform

Mit dem Hefe-Doppelhybridsystem wurde aus einer cDNA-Bank von humanem Skelettmuskel die muskelspezifische Isoform der Kreatinkinase (MM-CK) als Bindungspartner für das humane Myomesinfragment 6–8 identifiziert, das die Fibronectindomänen 3–5 des Proteins umfaßt (Hornemann et al., 2003). In der genannten Arbeit wurde darüber hinaus gezeigt, daß MM-CK auch an ein kürzeres Myomesinfragment (My7–8), nicht aber an die Fibronectindomänen von My4–6, an die Ig-Domänen von My9–11, My11–13 oder an die einzelnen FN-Domänen 6, 7, 8 bindet. Die korrespondierende Region in M-Protein (Mp6–8) bindet *in vitro* ebenfalls MM-CK. Die Interaktion zwischen Myomesin und MM-CK ist stark speziesspezifisch (Hornemann et al., 2003).

Mit einem wie unter 2.6.16 beschriebenen gezielten Hefe-Doppelhybridversuch habe ich überprüft, ob die MM-CK mit verschiedenen Titinfragmenten wechselwirken kann. Diese humanen Titinkonstrukte enthielten Ig-Domänen und entsprachen Abschnitten des Titinmoleküls in der Sarkomere, die in der Z-Bande (hTz1–z3, hTz7–8), der A-Bande (hTa1–a4) und der M-Bande (hTm1–m3) liegen. Wechselwirkungen zwischen den rekombinanten Proteinen wurden mit dem  $\beta$ -Galaktosidaseversuch und dem Wachstumstest auf Mangelmedium (-LWH) identifiziert (siehe 2.6.16). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt.

<b>Köder</b>	<b>hMM-CK</b>				
<b>Beute</b>	<b>hTz1–z3</b>	<b>hTz7–z8</b>	<b>hTa1–a4</b>	<b>hTm1–m3</b>	<b>hMy6–8</b>
<b><math>\beta</math>-Gal</b>	-	-	-	-	+
<b>-LWH</b>	-	-	-	-	+

Tabelle 3.4: **MM-CK interagiert nicht mit Titinkonstrukten.** Nach Kotransformation von Hefen mit hMM-CK (Köder) und humanen Titinkonstrukten oder dem humanen Myomesinfragment My6–8 (Beutekonstrukte) wurden Tests auf Aktivierung der Reportergene durchgeführt, deren Ergebnis mit + (Interaktion) und - (keine Interaktion) wiedergegeben ist. Verwendete Abkürzungen:  $\beta$ -Gal,  $\beta$ -Galaktosidaseversuch; -LWH, DOB-Agarplatten ohne Leuzin, Tryptophan und Histidin

Während die bereits beschriebene Interaktion zwischen My6–8 und der Kreatinkinase in diesem Experiment bestätigt werden konnte, wurde keine Bindung von MM-CK an die Titinkonstrukte beobachtet. Die Lokalisation der MM-CK in der M-Banden des sarkomeren Muskels ist daher nicht von der Bindung an das verwendete Titinfragment hTm1–m3 abhängig. Die Fixierung des Enzyms an Strukturen des Zytoskeletts wird offenbar durch Myomesin sowie in schnellen Muskelfasern zusätzlich durch M-Protein ermöglicht.

### **3.4 Myomesin dimerisiert am Carboxyterminus**

#### **3.4.1 Myomesin-Selbstassoziation im Hefe-Doppelhybridsystem**

Die Suche nach weiteren Bindungspartnern von Myomesin wurde in unserem Labor mit dem Konstrukt My9–13 fortgesetzt, das die letzten fünf Ig-Domänen am Carboxyterminus umfaßt. Dieses Konstrukt wurde als Köder verwendet, um mit dem Hefe-Doppelhybridsystem in einer Herzmuskel cDNA-Bank nach Interaktionspartnern zu suchen. Die gefundenen Klone kodierten für C-terminale Abschnitte von Myomesin selbst und erstreckten sich von Myomesindomäne 11 bis zu Domäne 13. Dies wurde als Hinweis gesehen, daß Myomesin im Bereich seines Carboxyterminus dimerisieren könnte.

#### **3.4.2 Biochemische Charakterisierung der Dimerisierung**

Die Möglichkeit einer Selbstassoziation des Myomesinmoleküls sollte durch die im folgenden beschriebenen biochemischen Versuche bestätigt und näher untersucht werden.

#### **Rekombinante Myomesindimere lassen sich chemisch quervernetzen**

Für Quervernetzungsexperimente wurden verschiedene humane Myomesinkonstrukte hergestellt, die von der Anzahl der Ig-Domänen den mit dem Hefe-Doppelhybridsystem gefundenen Myomesinfragmenten entsprachen (My11–13) oder die aminoterminal angrenzenden Domänen 9–11 umfassten bzw. die kürzer waren (My11–12, My12–13 sowie My13). Diese carboxyterminalen Myomesinfragmente wurden von der vervollständigten Myomesin cDNA oder von einer humanen Skelettmuskel cDNA-Bank (Firma Clontech) mittels PCR amplifiziert (siehe 2.6.1) und wie in Kapitel 2 beschrieben in Vektoren für die Proteinexpression in Bakterien kloniert. Gereinigte rekombinante Proteine wurden für Quervernetzungsexperimente (siehe 2.7.14) verwendet, um Myomesindimere kovalent zu verknüpfen und durch SDS-PAGE und Immunblotting zu analysieren.

Abbildung 3.11 zeigt die durch Immundetektion sichtbar gemachten Reaktionsprodukte einer chemischen Quervernetzung verschiedener Myomesinfragmente. Die für die SDS-PAGE denaturierten Proteine konnten in den Kontrollen ohne den Quervernetzer EGS als Monomere nachgewiesen werden. Mit EGS wurden Myomesindimere in Lösung kovalent verbunden und liefen dann im Gel mit einer höheren apparenten Masse als die Monomere. Das Laufverhalten der vernetzten Dimere unterschied sich durch die Beladung mit Quervernetzermolekülen von den theoretisch als Stäbchen wandernden Protein-SDS-Komplexen, sodaß die molekulare Masse der vernetzten Dimere nicht in jedem Fall der doppelten Masse eines Monomers entsprach. Oft wurden auch keine distinkten Dimerbanden, sondern breitere Banden in dem entsprechenden Massenbereich beobachtet.

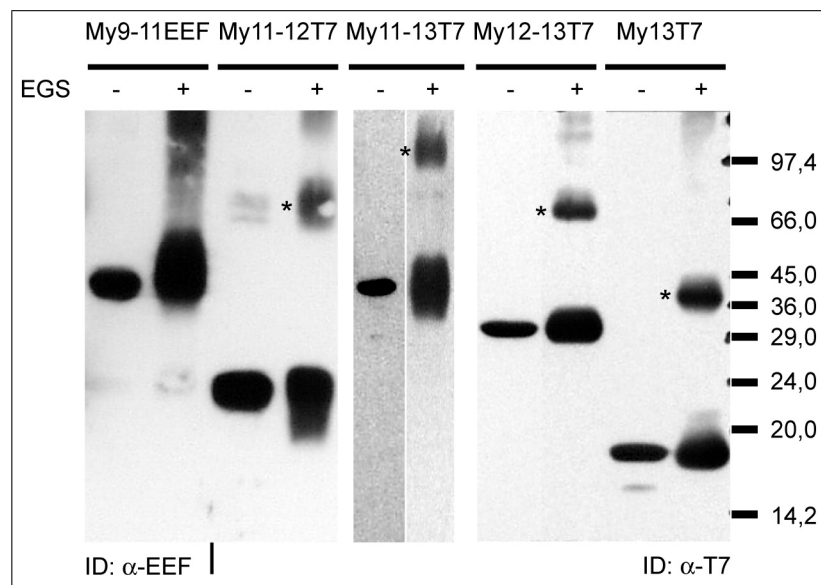


Abbildung 3.11: **Chemische Quervernetzung von rekombinanten Myomesinfragmenten.** Die Myomesinkonstrukte My9-11EEF, My11-12T7, My11-13T7, My12-13T7 und My13T7 wurden mit (+) und ohne (-) dem Quervernetzer EGS wie angegeben inkubiert. Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden mittels Immunblotting analysiert; die zur Detektion von Monomeren und Dimeren (mit einem Stern markiert) verwendeten Antikörper sind angeführt (ID). Bei allen Myomesinfragmenten, die die carboxyterminale Domäne 13 enthalten, konnten Dimere durch Quervernetzung dargestellt werden. Dimere wurden auch bei My11-12 gefunden, obgleich hier die Ausbeute deutlich geringer war als bei den Konstrukten, die Domäne 13 enthielten. Keine Dimerbildung konnte bei My9-11 nachgewiesen werden. Die Markerbandenpositionen sind mit Zahlen in kDa beschriftet.

Das im Hefe-Doppelhybridsystem als Myomesininteraktionspartner identifizierte Fragment My11-13 konnte zu einem gewissen Teil als Dimer quervernetzt werden. Darüber hinaus konnte der Dimerisierungsbereich mit den verwendeten Myomesinkonstrukten näher eingegrenzt werden: Dimere wurden ebenfalls mit den Zweidomänenkonstrukt My12-13 und der einzelnen Domäne My13 gefunden. Die letzte Ig-Domäne des Myomesinmoleküls

allein ist offenbar für die Dimerbildung ausreichend. Aber auch das Myomesinfragment My11–12, das diese Domäne nicht enthielt, verfügte interessanterweise über die Fähigkeit zur Selbstassoziation, wenngleich die Ausbeute an quervernetztem Dimer nicht so groß war wie bei den Fragmenten, die Domäne 13 enthielten. Eine weitere Stelle für die C-terminale Dimerisierung von Myomesin ist offenbar im Bereich der Domäne 12 vorhanden, die aber eine deutlich niedrigere Affinität zur Selbstassoziation aufweist als die Domäne 13. Mit einem Konstrukt ohne diese beiden Domänen, My9–11, konnte eine Dimerbildung unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Die Ig-Domänen 9, 10 und 11 sind für die Bildung von Myomesindimeren nicht erforderlich.

Alternativ wurden Myomesindimere mit dem *zero length* Quervernetzer EDC untersucht, um auszuschließen, daß das im vorherigen Versuch verwendete EGS auf Grund seiner Molekülgröße bestimmte Interaktionsbereiche zwischen den Monomeren nicht erreichen und somit nicht jede Art von Dimer sichtbar gemacht werden konnte. In Abbildung 3.12 ist das Ergebnis dieses Quervernetzungsexperimentes wiedergegeben. Die für die carboxyterminale Dimerisierung von Myomesin mindestens erforderliche Domäne 13 ließ sich mit EDC ebenso quervernetzen wie das mit EGS gefunden wurde (siehe oben). Das Proteinfragment My11–12 zeigte auch in diesem Versuch eine Dimerbildung, die durch chemische Quervernetzung sichtbar gemacht werden konnte. Unter der Monomerbande von My11–12 war im SDS-Gel ein Schmier zu beobachten, aus dem eine Bande hervortrat. Möglicherweise sind durch Quervernetzung innerhalb des Monomers Moleküle entstanden, bei denen die räumliche Gestalt des (im SDS-Gel denaturierten) Moleküls im Vergleich zum intakten Monomer verkürzt wurde und die daher ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE aufwies. Mit EDC konnte das Myomesinfragment My9–11, dem die beiden an der Dimerbildung beteiligten Ig-Domänen 12 und 13 fehlten, nicht quervernetzt werden.

### **Myomesindimere sind *in vitro* sehr stabil**

Der Mechanismus der Myomesin-Dimerisierung sollte biochemisch etwas näher charakterisiert werden. Mit Hilfe von Quervernetzungsexperimenten wurde der Einfluß einer ansteigenden Salzkonzentration auf die Stabilität von Dimeren des Myomesinfragmentes My11–13 untersucht. Eine chemische Quervernetzung mit diesem Konstrukt wurde wie in 2.7.14 beschrieben durchgeführt, die Konzentration von KCl im Ansatz wurde aber von 0 auf 1,2 M stufenweise erhöht. Mit einer indirekten Immundetektion wurden Myomesinmonomere und Dimere sichtbar gemacht wie in Abbildung 3.13 gezeigt. Über den gesamten Konzentrationsbereich konnten quervernetzte Dimere detektiert werden, deren Menge mit



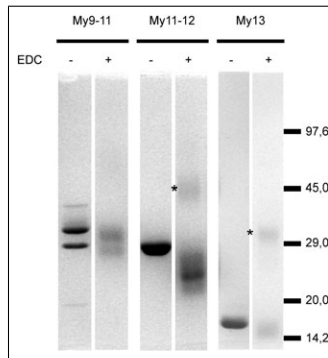


Abbildung 3.12: **Quervernetzung von rekombinanten Myomesinfragmenten mit EDC.** Die Myomesin-konstrukte My9-11EEF, My11-12T7 und My13T7 wurden mit (+) und ohne (-) dem Quervernetzer EDC inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Mit dem verwendeten *zero length* Quervernetzer EDC konnten Dimere von My13T7 und von My11-12T7 kovalent verknüpft werden. Die Dimerausbeute war in beiden Fällen gleich groß. Bei dem Myomesinfragment 9-11EEF konnte eine Dimerbildung mit EDC nicht nachgewiesen werden (Angaben für den Marker in kDa).

steigender Salzkonzentration nicht nennenswert ab- oder zunahm (in der letzten Laufspur ist insgesamt weniger Protein aufgetragen worden, die Signalintensitäten für Monomer und Dimer sind aber im gleichen Verhältnis wie bei den anderen Proben). Die Dimerisierung ließ sich somit nicht durch eine erhöhte Ionenkonzentration beeinflussen. Die Selbstassoziation im Bereich des Myomesincarboxyterminus könnte deshalb auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen.

### Western Blot und Dot Blot Overlay

Die mit den oben genannten Quervernetzungsexperimenten näher charakterisierte Myomesindimerisierung sollte mit einer Methode, die unabhängig von chemischen Modifikationen der Bindungspartner funktioniert, nachvollzogen werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Wege gewählt: Für das Western Blot Overlay Experiment wurde rekombinantes Myomesin mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Pro Laufspur wurden mehrere unterschiedlich große Myomesinfragmente aufgetragen, deren Position auf dem Blot zur Kontrolle mit dem EEF-Antikörper kenntlich gemacht wurde (siehe 2.7.15). Die transferierten Proteine durchliefen allerdings eine Abfolge von Denaturierung (SDS-Elektrophorese/Transfer) und Rückfaltung (auf der Membran). Zum Vergleich wurde natives Protein im Dot Blot Verfahren direkt auf trockene Nitrozellulosemembran getropft, um auszuschließen, daß die Bindungsfähigkeit der Proteine auf der Western Blot-Membran durch eine unvollständige Renaturierung beeinträchtigt wurde. In

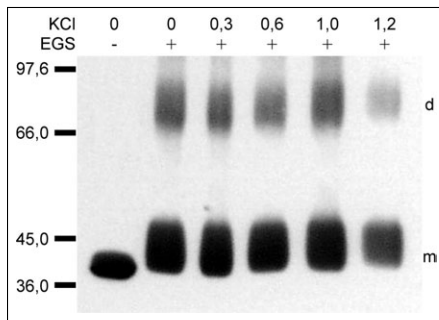


Abbildung 3.13: **Die Dimerisierung des Myomesinfragments My11–13 ist unabhängig von der Salzkonzentration im Reaktionsansatz.** Das Proteinfragment My11–13T7 wurde mit (+) und ohne (-) EGS und mit steigender Konzentration an KCl im Ansatz inkubiert wie angegeben. Mittels indirekter Immundetektion wurden die Reaktionsprodukte nachgewiesen. Die Ausbeute an quervernetzten Dimeren war unabhängig von der Salzkonzentration gleich. Die Position von Monomer (m) und Dimer (d) sowie der Markerproteine ist markiert. Die Zahlen sind in kDa angegeben.

beiden Fällen wurden Membranstreifen mit My11-13T7 Proteinlösung inkubiert wie in 2.7.15 beschrieben. Gebundenes Protein ließ sich mittels Immundetektion nachweisen (siehe 2.7.11).

Wie in Abbildung 3.14 in A gezeigt, wurden im Western Blot Overlay Experiment verschiedene Myomesinfragmente auf der Membran mit My11-13T7 dekoriert. Eine Bindung konnte an die Konstrukte My11-13EEF, My12-13EEF und My13EEF beobachtet werden, wobei die stärkste Wechselwirkung zwischen My12-13EEF und My11-13T7 auftrat. Auch in diesem Experiment war die letzte Domäne am Carboxyterminus des Myomesinmoleküls allein ausreichend für die Dimerisierung. Das Zweidomänenkonstrukt My11-12EEF ohne die letzte Ig-Domäne wies in dem Versuch eine schwächere Dekoration mit My11-13T7 als die vorgenannten Myomesinfragmente auf. Die Domäne 12 einschließlich der Aminosäuren, die die Verknüpfung zwischen dieser und Domäne 11 bilden, stellt offenbar eine weitere Bindungsstelle für die Selbstassoziation von Myomesin dar. An das Konstrukt My9-11EEF hat das C-terminale Myomesinfragment My11-13T7 nicht gebunden.

Ein proteolytisches immunreaktives Fragment von My11-13EEF konnte von My11-13T7 nicht gebunden werden. Auch nach längerer Exposition des Röntgenfilms konnte keine Bindung von My11-13T7 an dieses Spaltprodukt nachgewiesen werden. Auf Grund seiner apparenten molekularen Masse von 33 kDa, die rechnerisch ermittelt wurde und des Vorhandenseins des EEF-Immuntags am C-Terminus wurde angenommen, daß eine proteolytische Abspaltung von ungefähr 54 Aminosäuren beginnend vom Aminoterminus stattgefunden hat. Das wären die Aminosäuren, die die  $\beta$ -Stränge A, B und C in der  $\beta$ -Faltblattstruktur einer Ig-Domäne aufbauen. Die Spaltung könnte im Bereich der Verbindung von Strang C zu Strang D erfolgt sein, was eine destrukturierte Ig-Domäne zur Folge hätte, die möglicherweise die Bindung von My11-13T7 an die Domänen 12 und 13 in dem proteolytischen Fragment (sterisch) behindert.

Die Bindungseigenschaften von Myomesinfragmenten konnten auch mit nativem Pro-

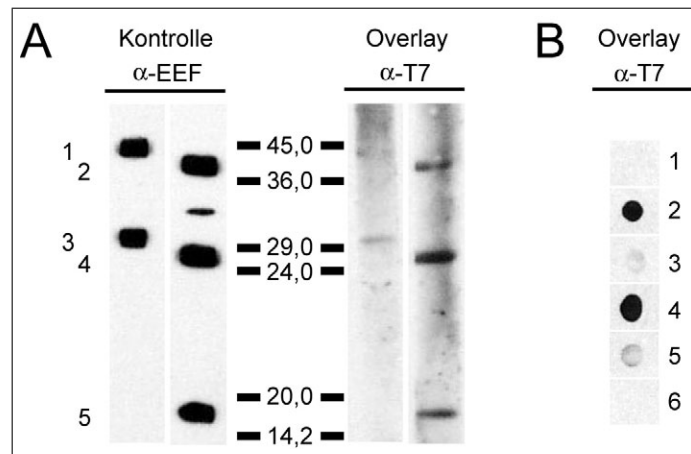


Abbildung 3.14: **Myomesindimerisierung im Flüssig-Festphasenversuch.** **A.)** Bakteriell exprimierte Myomesinfragmente (1, My9-11EEF; 2, My11-13EEF; 3, My11-12EEF; 4, My12-13EEF; 5, My13EEF) wurden mittels SDS-PAGE getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Myomesinfragment M11-13T7 inkubiert. Die Position der Proteine auf der Membran wurde zur Kontrolle mit EEF-Antikörper nachgewiesen, gebundenes My11-13T7 wurde mit T7-Antikörper detektiert (in der Abbildung mit „Overlay“ bezeichnet). Dieses Konstrukt zeigte eine Dekoration der Myomesinfragmente M11-13EEF, My12-13EEF und My13EEF, während die Bindung an My11-12EEF deutlich schwächer und an My9-11EEF nicht nachweisbar war. Die Masse der Markerbanden ist in kDa angegeben.

**B.)** Native Myomesinfragmente (1-5 wie unter A.) und zur Kontrolle BSA (6) wurden in einer Konzentration von 1 µg/µl auf Nitrozellulose getropft und mit 50 µg My11-13T7 inkubiert. Gebundenes Protein wurde durch Immundetektion mit dem T7-Antikörper nachgewiesen. Am stärksten dekoriert wurden My11-13EEF und M12-13EEF, wohingegen My11-13T7 schwach My13EEF gebunden hatte. Eine noch geringere Affinität wies My11-12EEF auf. Keine Bindung erfolgte an My9-11EEF und an BSA.

tein auf Nitrozellulosemembran, wie in Abbildung 3.14 B dargestellt, bestätigt werden. Eine eindeutige Dekoration mit My11-13T7 zeigten die Myomesinfragmente 11-13EEF und 12-13EEF, wobei My12-13 das stärkere Signal gab. Die Bindung an die einzelne carboxyterminale Domäne My13EEF war im Vergleich zu den vorgenannten Drei - bzw. Zweidomänenkonstrukten schwächer. Entweder hat an die isolierte Domäne 13 weniger Protein gebunden oder durch das Waschen im Verlaufe der Immundetektion wurde gebundenes My11-13T7 zum Teil wieder entfernt. Die schwächste Interaktion von My11-13T7 konnte mit My11-12EEF beobachtet werden.

In dem Versuch mit nativem Protein konnte somit die Domäne 12 ebenfalls als weitere Bindungsstelle für die Myomesindimerisierung, mit allerdings niedrigerer Affinität zu My11-13 als Domäne 13, identifiziert werden. Weder das Myomesinfragment My9-11EEF noch Rinderserumalbumin wurden von My11-13T7 gebunden, was für die Spezifität der beobachteten Wechselwirkungen zwischen den rekombinanten Myomesinfragmenten spricht. Die Dimerisierung am Carboxyterminus des Myomesins ist von der letzten Domäne des

Moleküls, My13, abhängig und erfordert für eine stabilere Bindung die Interaktion mit Domäne 12.

### **Quervernetzung des phosphorylierten Myomesincarboxyterminus**

Durch die Reaktion mit einem phosphorylierungsspezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, daß natives Myomesin am Carboxyterminus im Bereich der letzten 60 Aminosäuren phosphoryliert ist (Obermann et al., 1995).

In *E. coli* rekombinant hergestellte Myomesinfragmente, die die Domäne My13 enthielten, sollten dagegen nicht phosphoryliert sein, da Prokaryonten zwar auch über z. B. Serin/Threonin-Proteinkinasen verfügen, diese aber soweit bekannt eukaryotische Phosphorylierungsstellen nicht erkennen und die entsprechenden Aminosäuren nicht phosphorylieren (Kennelly, 2003).

Mit einem Phosphorylierungsexperiment wurde untersucht, ob die für die Dimerisierung von Myomesin ausreichende Domäne 13 mit Muskelzellextrakt phosphoryliert werden kann und ob die Phosphorylierung die Dimerbildung beeinflusst.

Gereinigtes rekombinantes Protein wurde mit Extrakten aus Skelettmuskelzellen verschiedener Differenzierungsstadien (L6-Zelllinie, vgl. 2.9.1) und nachfolgend mit und ohne den Quervernetzer EGS inkubiert (siehe Abschnitt 2.7.17). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der Einbau von radioaktivem Phosphor durch Autoradiographie sichtbar gemacht, wie in Abbildung 3.15 dargestellt.

In den ersten beiden Laufspuren des Gels sind radioaktiv markierte Proteine aus dem Zellextrakt zu sehen. Diese Proteine wurden mit EGS zu größeren Aggregaten vernetzt, die am oberen Rand des Trenngels sichtbar sind (Spur 2), weil sie nicht weiter wandern konnten.

Vor dem zellulären Hintergrund ist das radioaktiv markierte Monomer der Domäne 13 deutlich zu erkennen (Spur 3), die in dem Extrakt vorhandenen Proteinkinasen waren demnach in der Lage, das rekombinante Protein zu phosphorylieren. Das phosphorylierte Myomesinfragment My13 konnte ebenfalls quervernetzt werden (Spur 4). Das Intensitätsverhältnis von radioaktiv markiertem Monomer und Dimer war in etwa gleich, ebenso wie das bei den oben beschriebenen Quervernetzungsexperimenten mit nicht phosphorylierten Myomesinfragmenten beobachtet wurde.

. Demnach wird die Dimerisierung von Myomesin durch den Phosphorylierungsstatus der Domäne 13 nicht beeinflusst.

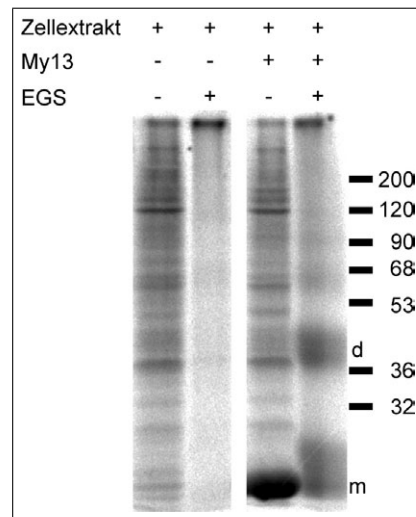


Abbildung 3.15: **Die phosphorylierte Myomesindomäne 13 bildet Dimere.** Extrakte aus der Skelettmuskellinie L6 wurde für die Proteinphosphorylierung mit  $\gamma$ [ $^{32}\text{P}$ ]ATP verwendet. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes Protein durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Zellextrakt wurde zur Kontrolle ohne Myomesin und nachfolgend mit (+) und ohne (-) Quervernetzter EGS wie angegeben inkubiert. Viele phosphorylierte Proteine aus dem Zellextrakt konnten sichtbar gemacht werden (Laufspur 1), die nach Inkubation mit EGS zu großen Aggregaten so vernetzt wurden, daß sie nicht mehr in das Trenngel eindringen konnten (Spur 2). Das Myomesinfragment My13 wurde mit Zellextrakt und danach mit (+) und ohne (-) Quervernetzer inkubiert. Phosphoryliertes Myomesinmonomer (m) und das phosphorylierte, quervernetzte Dimer (d) konnten in dem Autoradiogramm eindeutig identifiziert werden. Die korrespondierenden Molekularmassen des Markers sind in kDa angegeben.

### 3.5 Wechselwirkungen zwischen Myosin und Myomesin

Biochemische Bindungsexperimente haben gezeigt, daß der Aminoterminus des humanen Myomesins *in vitro* mit dem Myosinfragment LMM wechselwirken kann (Obermann et al., 1996): My1–3 bindet an auf einer Nitrozellulosemembran immobilisierten Myosin und LMM, My2–3, My4–8 und My9–13 nicht. Weiter zeigte ein proteolytisches Spaltstück des Rindermyomesins, das die Domänen My1 und My2 umfaßte, eine Bindung an Myosin-Rod und LMM (Obermann et al., 1995). Myomesin kann daher der Gruppe myosinbindender Proteine zugeordnet werden.

Die Identifizierung des aminoterminalen Kopfstückes als Myosinbindungsdomäne in Myomesin war aber mit rekombinanten Proteinfragmenten nur indirekt erfolgt, und die verwendeten Konstrukte umfaßten die bis dahin bekannte Aminosäuresequenz, die kürzer ist als die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte komplette Sequenz der Domäne My1 (siehe 3.1.1). Mit dem proteolytischen Myomesinfragment aus Rinderskelettmuskel konnte

die Myosinbindung nur auf die beiden ersten Domänen, My1–2, des Moleküls eingegrenzt werden.

### 3.5.1 Biochemische Untersuchung der Myosin Myomesin Wechselwirkung

Durch die Klonierung der kompletten cDNA des humanen Myomesins wurde das Molekül am Aminoterminus vervollständigt (siehe 3.1.1), so daß die neue Kopfdomäne nun als rekombinantes Protein hergestellt werden konnte. Die Reinigung dieses Myomesinfragmentes erforderte ein von der Anleitung des Herstellers abweichendes Protokoll, denn My1 war unter nativen Reinigungsbedingungen nicht löslich. Daher wurde das Bakterienpellet einer My1-Expressionkultur denaturierend aufgeschlossen und das rekombinante Protein via His-Tag an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarosekügelchen gebunden. Durch mehrmaliges Waschen mit nativem Waschpuffer wurde das Protein schnell zu einer Form zurückgefaltet, die in dem verwendeten Elutionspuffer und bei Lagerung auf Eis über mehrere Tage stabil in Lösung blieb.

Mit biochemischen Bindungsversuchen wurde die Interaktion zwischen Myosin und dem kompletten Myomesinkopf untersucht. In Abbildung 3.16 wird das Ergebnis eines Flüssig-Festphasenbindungsexperimentes vorgestellt.

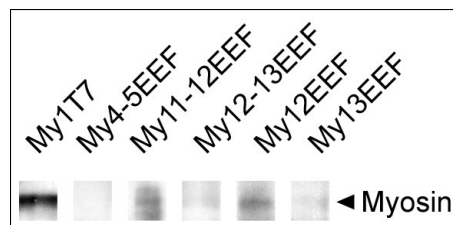


Abbildung 3.16: **Die komplettierte Kopfdomäne des humanen Myomesins bindet an Myosin.** Gereinigtes Myosin aus Rinderskelettmuskel wurde nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit verschiedenen rekombinanten Myomesinfragmenten überschichtet. Die neu klonierte, komplette Myomesinkopfdomäne bindet deutlich sichtbar an Myosin.

Auch der komplette Myomesinkopf bindet *in vitro* an Myosin schwere Kette, wie die Immunodetektion des rekombinanten Proteins zeigt. Die Myomesinkonstrukte My4–5, My11–12, My12–13, My12 und My13 zeigten bis auf eine Ausnahme keine Interaktion mit Myosin: My12 dekorierte ebenfalls, wenn auch schwächer als My1, das immobilisierte Myosin.

Die Bindung eines carboxyterminalen Myomesinfragmentes an Myosin wurde bisher nicht beobachtet und wurde in vorausgegangenen Untersuchungen für das Konstrukt My9–13 mittels ähnlicher Experimente ausgeschlossen (Obermann et al., 1997). Diese putative

Myosinbindungsstelle am Carboxyterminus des Myomesins wurde durch weitere Experimente näher untersucht, wie im folgenden beschrieben.

### 3.5.2 Charakterisierung einer weiteren Myosinbindungsstelle in Myomesin

Die neue Myosinbindungsstelle in Domäne 12 des humanen Myomesins wurde mit zwei weiteren biochemischen Experimenten näher untersucht. Für einen Western Blot Overlay wurde aus Rinderskelettmuskel gereinigtes Myosin (siehe 2.7.7) nach SDS-PAGE mit dem Tankblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Alternativ wurden Myosinfilamente auf Nitrozellulosestreifen getropft.

In beiden Fällen folgte ein Inkubation der Nitrozellulosemembranen mit Proteinlösungen, die verschiedene rekombinante Myomesinfragmente enthielten, wie in Abbildung 3.17 angegeben.

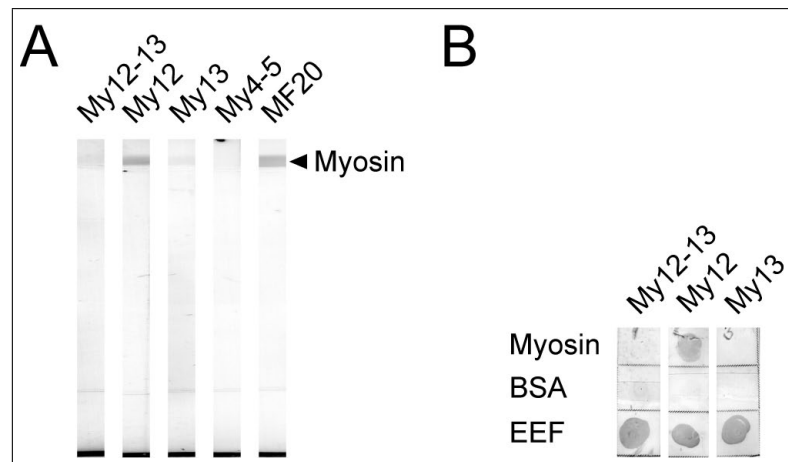


Abbildung 3.17: **Die Domäne 12 des humanen Myomesins interagiert mit Myosin.** **A.** Aus Rinderskelettmuskel gereinigtes Myosin wurde nach SDS-PAGE auf Nitrozellulose geblottet und mit angegebenen Myomesinfragmenten inkubiert, deren Bindung an Myosin mittels Immundetektion gezeigt wurde. My12 bindet deutlich sichtbar an Myosin, das von My12-13 und My13 nicht dekoriert wird. My4-5 bindet nicht an das geblottete Myosin. Die Position der Myosinbande wurde mit einem Antikörper (MF20) sichtbar gemacht. **B.** Auf Nitrozellulosestreifen wurden Myosinfilamente (*Myosin*), Rinderserumalbumin (*BSA*) und die Myomesinfragmente My12-13, My12 und My13 (*EEF*) getropft. Die Streifen wurden mit genannten Myomesinfragmenten inkubiert und gebundenes Myomesin wurde mittels Immundetektion sichtbar gemacht. Das Myomesinfragment My12 hat an die immobilisierten Myosinfilamente gebunden, My12-13 und My13 nicht. Mit BSA konnte keine Interaktion festgestellt werden. Die Immunmarkierung der zur Kontrolle aufgetropften Myomesinfragmente war nachweisbar (*EEF*).

Durch Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran immobilisiertes Myosin wurde deut-

lich sichtbar mit rekombinantem Myomesin My12 dekoriert, nur sehr schwach von My12–13 und nicht nachweisbar von der Dimerisierungsdomäne My13 oder dem weiter aminoterminal gelegenen Myomesinfragment My4–5 (siehe Abbildung 3.17, A).

Native Myosinfilamente haben im Dot Blot Overlay nur My12 und nicht My12–13 und My13 gebunden, wie in Abbildung 3.17, B zu sehen. Die Myomesin-Myosin-Interaktion an Domäne 12 hängt offenbar nicht von der Anwesenheit nativer Myosinfilamente ab, wurde aber durch die Dimerisierungsdomäne My13 gestört, wie bei My12–13 zu beobachten war.

### 3.5.3 Rekombinante Myomesindimere binden Myosin in COS-Zellen

Zwei wesentliche neue Eigenschaften des humanen Myomesins wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefunden: Myomesin dimerisiert am Carboxyterminus und dort könnte eine weitere Myosinbindungsstelle liegen. Diese Befunde sollten durch Transfektionsstudien in transfizierten eukaryontischer Zellen validiert werden, denn so konnte eine korrekte Faltung der rekombinanten Proteine gefördert und eine posttranslationale Modifizierung der Proteinfragmente ermöglicht werden. Hinweise auf solche Modifikationen liegen bisher nicht vor, ließen sich aber nicht ausschließen.

Nachdem mit biochemischen Versuchen die Dimerisierung von rekombinanten Myomesinfragmenten gezeigt werden konnte (siehe 3.4.2), sollte die Myomesinselbstassoziation durch eine weitere Methode untersucht werden. Dafür wurde ein experimenteller Ansatz ausgewählt, der sich an einen für C-Protein (*Myosin binding protein C*, MyBP-C) beschriebenen Transfektionsversuch anlehnt, mit dem die Dimerisierung von C-Protein und gleichzeitig die Bindung an Myosin belegt werden konnte (Welikson und Fischman, 2002).

Ausgehend von der Beobachtung, daß die heterolog exprimierte muskelspezifische Isoform der Myosin II schwere Kette (*myosin heavy chain*, MHC) in COS-Zellen, einer Nicht-muskelzelllinie, die Fähigkeit besitzt, im Zytoplasma der transfizierten Zellen Myosinfilamente zu bilden, wurde mit Doppeltransfektionen untersucht, ob das MyBP-C mit diesen Filamenten assoziiert (Seiler et al., 1996). Die Myosinbindungsstelle in MyBP-C war in diesem Experiment ursächlich für die beobachtete Kolokalisation mit den Myosinfilamenten in COS-Zellen, und da MyBP-C am Carboxyterminus dimerisieren kann (Winegrad, 1999) wurden darüber hinaus die Myosinfilamente zu kabelartigen Gebilden quervernetzt (Seiler et al., 1996).

Dieser Versuch wurde ausgewählt, um die Dimerisierung von rekombinantem Myomesin in einer eukaryontischen Zelllinie indirekt durch die Quervernetzung von Myosinfilamenten



zu beweisen. Dazu wurden drei verschiedene Konstrukte unter Verwendung der neu klonierten humanen Myomesin cDNA hergestellt: rekombinantes Myomesin voller Länge (My1–13) sowie die Teilstücke My1–9 und My9–13, die jeweils in die Expressionsplasmide pMyP-M (aminoterminal mit c-myc Immuntag fusioniert) und pMyP-G (carboxyterminal mit GFP fusioniert) kloniert wurden. COS-Zellen wurden mit einem Myosin cDNA-Konstrukt ( $\alpha$ -MHC, Ratte) und verschiedenen humanen Myomesinkonstrukten einzeln sowie doppelt transfiziert.

COS-Zellen, die nur das rekombinante Myosin exprimierten, wiesen im Zytoplasma spindelförmige Myosinfilamente auf, die mit dem Muskelmyosinantikörper MF20 (Bader et al., 1982) detektiert wurden (siehe Abbildung 3.18).

Die Morphologie der Myosinspindeln in den transfizierten COS-Zellen entsprach den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Vikstrom et al., 1993; Moncman et al., 1993). Die rekombinanten Myosinfilamente waren morphologisch durch indirekte Fluoreszenzmikroskopie nicht von den bei differenzierenden Myoblasten auftretenden endogenen Filamenten zu unterscheiden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben aber ergeben, daß die Länge der artifiziellen Filamente variabler und in vielen Fällen größer als bei endogenen Myosinfilamenten ist (Vikstrom et al., 1993).

In BHK-21/C13 Zellen, putativen Myofibroblasten (siehe 2.9.1), konnte die Myofibrillogenese anhand der Färbung des Muskelmyosins (und anderer Markerproteine) und die Zusammenlagerung der einzelnen Myosinspindeln, wie sie auch in Abbildung 3.18 B zu sehen sind, zu Prämyofibrillen verfolgt werden (van der Ven und Fürst, 1998). Dieser Vorgang wird in Abbildung 3.18 D und E am Beispiel differenzierender HSkM-Zellen gezeigt.

Veränderungen der Morphologie der überexprimierten Myosinspindeln dienten bei den folgenden Experimenten als indirekter Hinweis auf eine Interaktion zwischen Myomesindimeren und Myosin, wie für MyBP-C beschrieben (Seiler et al., 1996). Die Ergebnisse einer transienten Doppeltransfektion von COS-Zellen mit verschiedenen Myomesinfragmenten und rekombinantem Myosin (MHC) sind in Abbildung 3.19 zu sehen.

Das komplette rekombinante Myomesin, My1–13, wurde fast vollständig in den Zellkern der COS-Zellen transportiert, und das im Zytoplasma in sehr geringem Maße detektierbare My1–13 zeigte keine Kolo-kalisation mit MHC-Filamenten, wie in Abbildung 3.19 gezeigt. Auch das Myomesinfragment My1–9 konnte fast ausschließlich nur im Zellkern der transfizierten Zellen nachgewiesen werden und interagierte nicht mit den Myosinfilamenten im Zytoplasma (Abb. 3.19). Beide Myomesinkonstrukte enthalten die durch Obermann et al. (1997) identifizierte Myosinbindungsregion, Domäne 1, die aber in diesen transfizierten

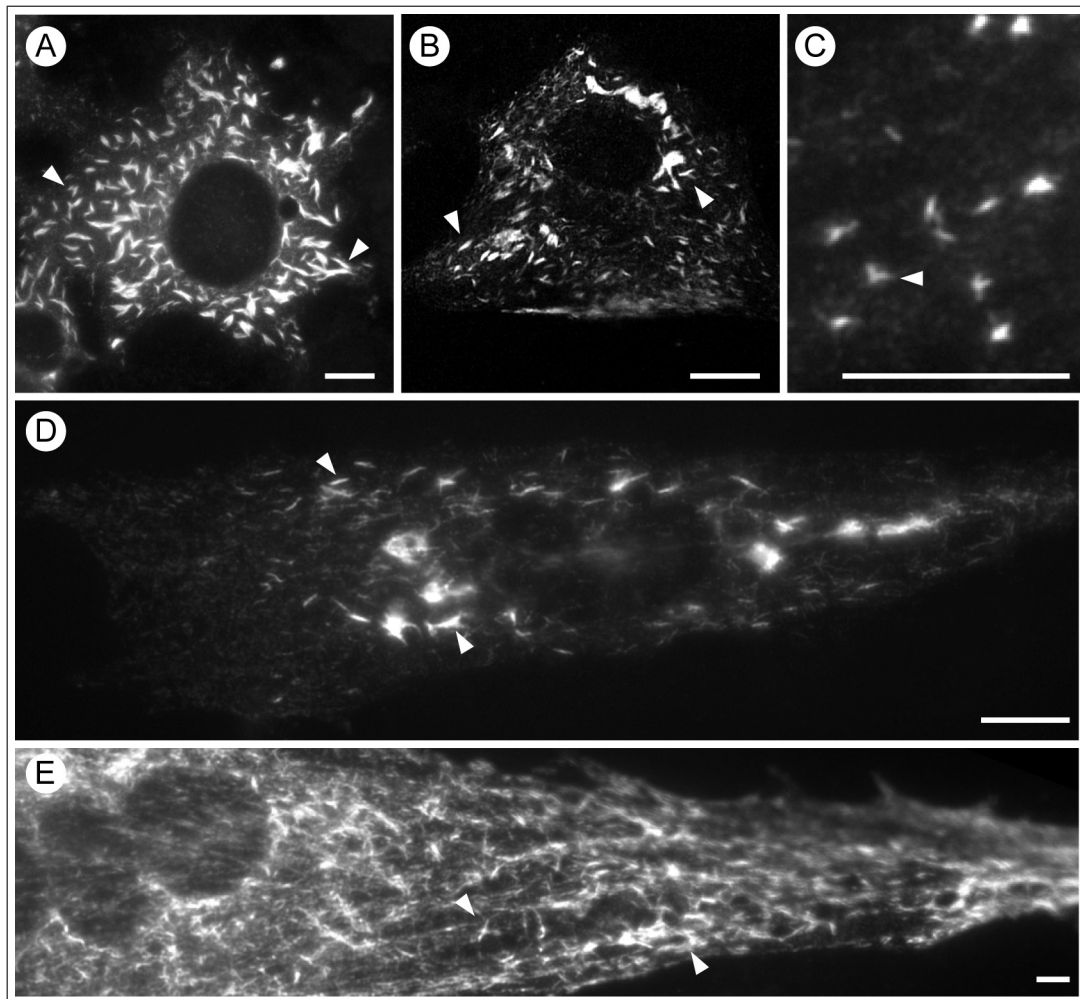


Abbildung 3.18: **Endogenes und rekombinantes Myosin bildet spindelförmige Filamente in verschiedenen Zelltypen.** Mit einem MHC-Konstrukt transfizierte COS-Zellen exprimierten Muskelmyosin, das spindelförmige Filamente bildete (A). Myosinfilamente dieser Art wurden auch durch Markierung des endogenen muskelspezifischen Myosins in differenzierenden BHK- (B, 0d) und HSkM-Zellen (C, D, 0d; E, 1d) beobachtet. Die Pfeilspitzen deuten auf Myosinsspindeln hin (siehe besonders C), die sich zu Beginn der Differenzierung um den Zellkern zu größeren Komplexen zusammenlagerten (D) und später in Prämyofibrillen auftraten (E). Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

Zellen nicht mit dem rekombinanten Myosin wechselwirken kann.

Das Myomesinfragment My9–13 wurde bei diesen Versuchen als Kontrolle verwendet, die zwar am Carboxyterminus dimerisieren kann, aber die aminoternale Myosinbindungsstelle My1 nicht enthält und Myosin daher nicht quervernetzen sollte. Interessanterweise assoziierte My9–13 mit den MHC-Filamenten und bewirkte eine Bündelung der Myosinfilamente zu langen, kabelartigen Strukturen, die sich um den Zellkern herum erstreckten und in denen Myomesin und Myosin eindeutig kolokalisierten (Abb. 3.19, I). Die Ausbildung die-

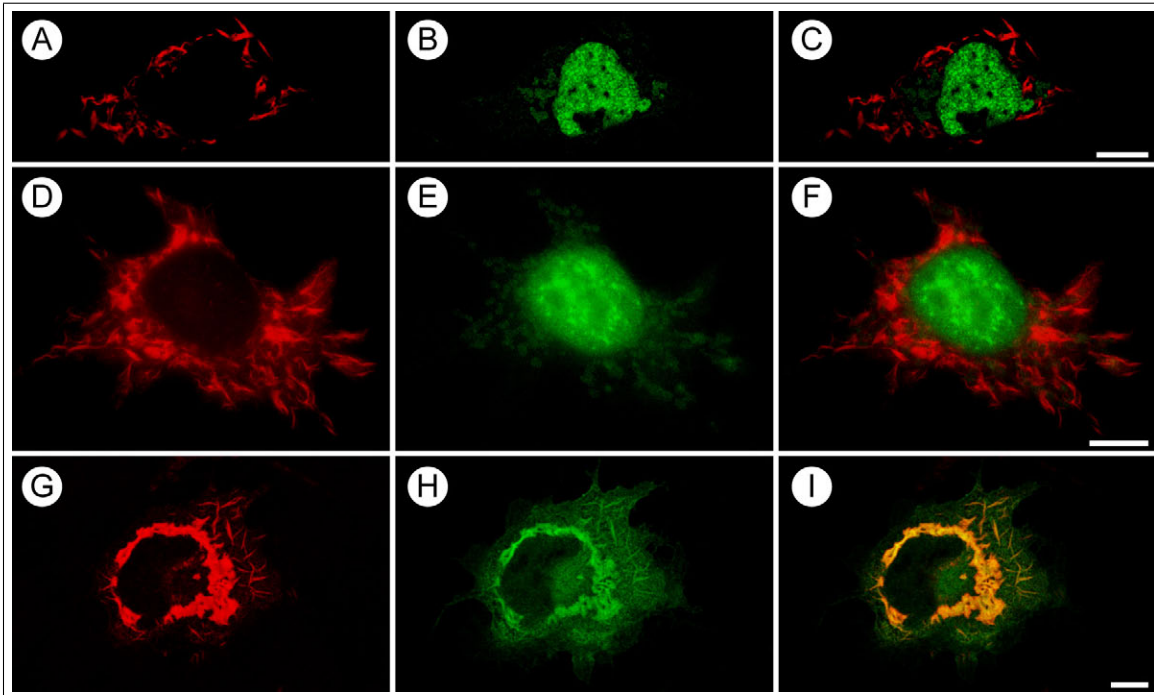


Abbildung 3.19: **Verschiedene Myomesinfragmente kolokalisieren unterschiedlich mit rekombinantem Myosin in COS-Zellen.** Die Doppelexpression von mit rekombinantem Myosin (MHC) und verschiedenen Myomesinkonstrukten (My1–13myc (A, B, C), My1–9GFP (D, E, F) und My7–13myc (G, H, I)) transfizierten COS-Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Die exprimierten Proteine wurden mit dem Antikörper MF20 gegen MHC (A, D, G) und durch Markierung mit anti-myc Immunotag Antikörper (B, H) bzw. durch die Fluoreszenz des GFP (E) dargestellt. Die Überlagerung der Kanäle Rot und Grün (C, F, I) macht die unterschiedliche Lokalisation des rekombinanten Myomesins (My1–13, C) sowie von My1–9 (F) im Vergleich zu den spindelförmigen MHC-Filamenten deutlich: My1–13 und My1–9 wurden in den Zellkern transportiert und assoziierten nicht mit den MHC-Filamenten im Zytoplasma. Das carboxyterminale Myomesinfragment My7–13 wies eine ausschließliche zytoplasmatische Verteilung auf und kolokalisierte dort mit den MHC-Filamenten. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

ser Myosinkabel war reproduzierbar und unabhängig vom verwendeten Fusionsanteil (myc-Immuntag, T7-Immuntag, GFP) und vom Promotor (Myomesin- bzw. CMV-Promotor), durch den die Expression gesteuert wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Beobachtung bestätigte auf das Vorhandensein einer zusätzlichen, bisher nicht beschriebenen Myosinbindungsstelle im carboxyterminalen Teil des Myomesins.

Mit den Konstrukten My1, My1–3 und My2–3 wurden kürzere Myomesinfragmente in Anlehnung an die beschriebenen Transfektionsexperimente mit Kardiomyozyten verwendet (Auerbach et al., 1999), um die Myosinbindungsdomäne My1 in COS-Zellen näher zu charakterisieren. My1–3 und die singuläre Kopfdomäne, My1, wurden in doppelt transfizierten Zellen ebenfalls in den Zellkern transportiert und kolokalisierten nicht mit den

MHC-Filamenten (vgl. Abbildung 3.20).

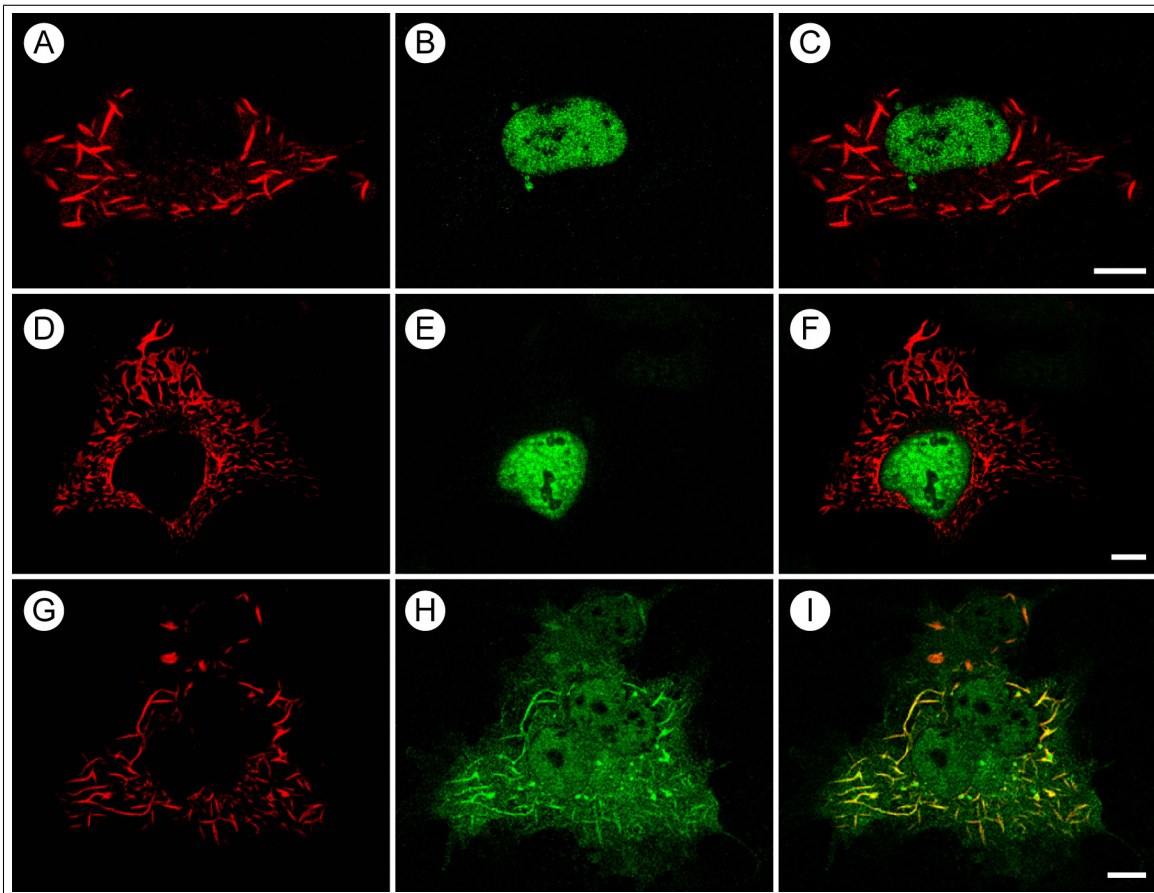


Abbildung 3.20: **Rekombinante Myomesinkonstrukte, die die aminoterminalen Myosinbindungsstelle enthalten, kolokalisieren nicht mit überexprimiertem Myosin in COS-Zellen.** Durch transiente Doppelexpression und indirekte Immunfluoreszenz wurde die Bindung von rekombinantem My1-3myc (A, B, C), My1myc (D, E, F) und My2-3myc (G, H, I) an die Myosin schwere Kette (MHC) untersucht. Während die spindelförmigen MHC-Filamente im Zytoplasma klar dekoriert werden konnten (A, D), ließen sich die aminoterminalen Myomesinfragmente My1-3 und My1 nur im Zellkern der transfizierten Zellen nachweisen (C, E). Die unterschiedliche Verteilung der überexprimierten Proteine ist in der Überlagerung der Kanäle Rot und Grün (C, F) erkennbar. Das Myomesinkonstrukt My2-3 wurde dagegen mit ungefähr gleicher Signalstärke im Zellkern und im Zytoplasma detektiert. Im Zytoplasma kolokalisierten My2-3 und MHC-Filamente, wobei My2-3 zusätzlich eine diffuse Verteilung im Zytoplasma aufwies. Die Anordnung der MHC-Filamente war im Vergleich zu der Einzelexpression von MHC in COS-Zellen durch My2-3 nicht verändert. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m

Die Bindung von My1 an Myosin ließ sich mit diesem Transfektionsexperiment in eukaryontischen Zellen nicht beweisen, da das exprimierte Protein hauptsächlich in den Zellkern transportiert wurde und das im Zytoplasma verbliebene rekombinante Protein nicht mit Myosin interagiert. Gleiche Beobachtungen wurden mit My1 auch in anderen Nicht-muskelzelllinien (HeLa, PtK) gemacht (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Konstrukt My2-3

wies in COS-Zellen eine gleichermaßen zytoplasmatische wie nukleäre Verteilung auf und kolokalisierte mit den Myosinfilamenten (Abb. 3.20). Die Assoziation von My2–3 mit Myosin war aber schwach ausgeprägt und unterschied sich deutlich von den Myosinkabeln, die durch rekombinantes MyBP-C erzeugt werden konnten (Seiler et al., 1996).

Eine weiterführende Untersuchung der Myosinbindung des Myomesincarboxyterminus wurde mit den Konstrukten My9–11 und My11–13 vorgenommen. In transfizierten Zellen war My9–11 diffus in der Zelle verteilt und zeigte keine Assoziation mit dem rekombinanten Myosin (Abb. 3.21, A–C). My11–13 dagegen kolokalisierte mit Myosin, das durch das Myomesinfragment gebündelt wurde (Abb. 3.21, D–F). Zum Vergleich ist in der Abbildung 3.21 eine mit MHC und My9–13 transfizierte Zelle gezeigt, die filigrane Myosinkabel in der unmittelbaren Peripherie des Zellkerns aufwies, die sich von den Myosinfilamentbündeln, die durch My11–13 entstanden sind, deutlich unterscheiden. Die Myosinbindungsstelle liegt innerhalb des Fragmentes My11–13 und ist die Domäne My12.

In Abbildung 3.22 werden Immunfluoreszenzmikrophotographien von drei verschiedene, doppelt transfizierten COS-Zellen gezeigt, die nach 12, 24 und 48 Stunden fixiert wurden und eine unterschiedlich starke Ausbildung von durch My9–13 erzeugte Myosinkabeln zeigen. Die MHC-Filamente wurden in diesen Zellen durch die My9–13-Dimeren zu großen, kabelartigen Gebilden von unterschiedlicher Ausprägung quervernetzt. In einem frühem Stadium, nach 12 Stunden Expressionsdauer, bildeten My9–13 (A) und MHC (B) in unmittelbarer Nähe des Zellkerns und auch im Zytoplasma größere Aggregate aus zusammengefügten MHC-Filamenten. Nach 24 Stunden sind alle MHC-Filamente zu einem kabelartigen Geflecht vernetzt worden (D), in dem auch My9–13 nachweisbar war (E, F). Bei noch längerer Expressionsdauer starben die transfizierten Zellen, wie hier am Beispiel einer toten Zelle gezeigt (G, H, I). MHC (G) und Myomesin 9–13 (H) kolokalisierten in großen Komplexen um den Zellkern herum, daneben zogen feine kabelartige MHC-Filamente ins Zytoplasma hinein.

#### **3.5.4 Lokalisation rekombinanter Myomesinfragmente in C2C12-Zellen**

Durch in vitro Bindungsversuche wurden Hinweise auf mindestens zwei Myosinbindungsstellen im humanen Myomesinmolekül gewonnen: Die Bindung der aminoterminalen Kopfdomäne an Myosin wurde indirekt (Obermann et al., 1997) und direkt (siehe 3.5.1) durch Dot-Blot Experimente gezeigt. Das carboxyterminale Myomesinfragment My9–13 assoziiert in COS-Zellen mit überexprimiertem Muskelmyosin und quervernetzt diese Myosinfi-

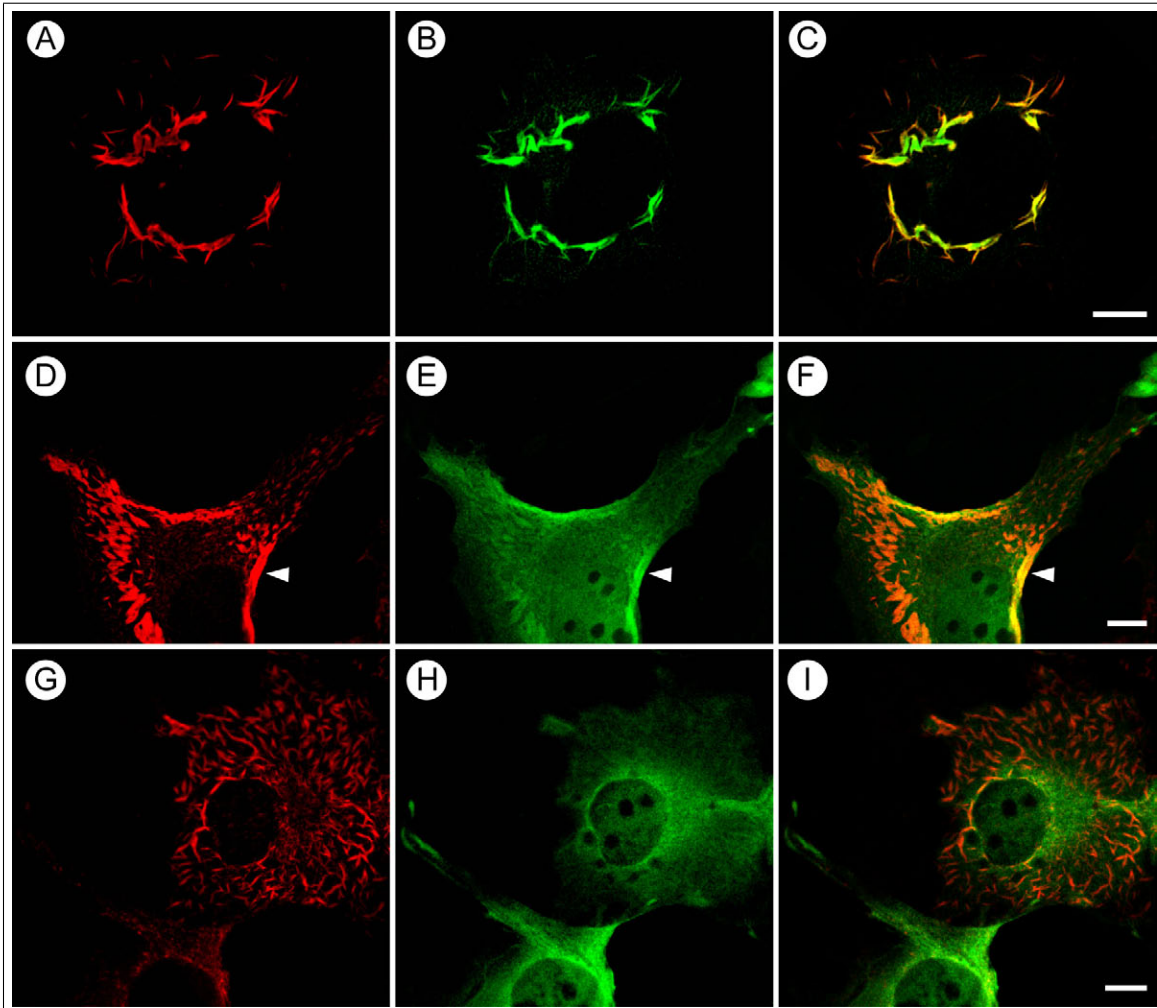


Abbildung 3.21: **Carboxyterminale Myomesinfragmente kolokalisieren mit Myosin in COS-Zellen.** Transiente Doppeltransfektionen von COS-Zellen mit rekombinantem Myosin (MHC), roter Kanal (A, D, G), und den carboxyterminalen Myomesinkonstrukten My9–11myc (B), My11–13myc (E) sowie My9–13myc (H), grüner Kanal, wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Eine Kolokalisation der Fluoreszenzsignale zeigt die Überlagerung beider Kanäle (C, F, I). Das überexprimierte Myomesinfragment M9–11 wurde im Zellkern und diffus im Zytoplasma nachgewiesen und kolokalisierte nicht mit den MHC-Spindeln im Zytoplasma der Zelle (C). My11–13 dekorierte die zytoplasmatischen MHC-Filamente und wurde zudem im Zellkern detektiert (E, F). Die Pfeilspitze (D, E, F) weist auf eine stärkere Akkumulation rekombinanten Myosins und My11–13 hin. Die Koexpression der MHC mit My9–13 veränderte die Morphologie der MHC-Filamente: lange, kabelförmige Strukturen bildeten einen perinukleären Ring, in dem MHC und My9–13 kolokalisierten (G, H, I). Im Zellkern war kein My9–13 nachweisbar (H). Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

lamente zu perinukleären Geflechten (siehe 3.5.3).

Im folgenden habe ich die Frage untersucht, ob die putative carboxyterminale Myosinbindungsstelle in Myomesin die zielgerichtete Lokalisation von rekombinantem Myomesin

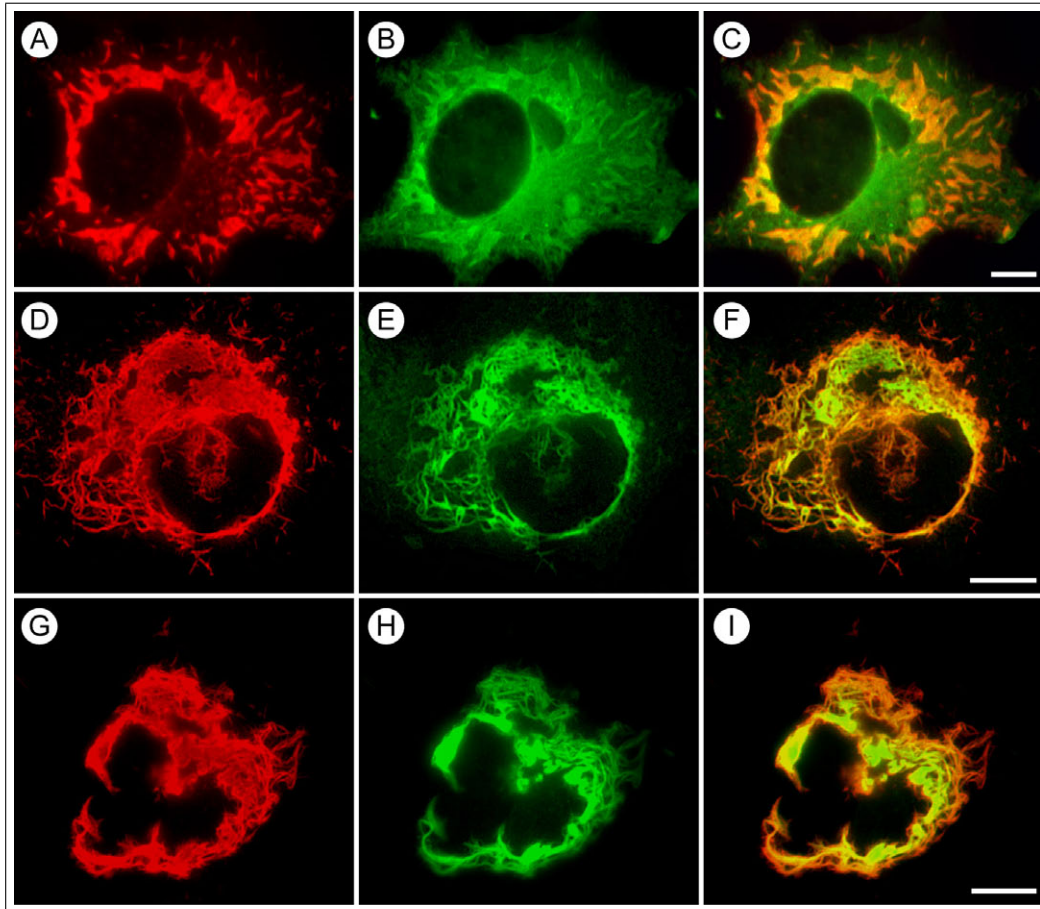


Abbildung 3.22: **Das carboxyterminale Myomesinfragment My9–13 bindet in COS-Zellen an rekombinante Myosin schwere Kette und quervernetzt dieses Myosin zu kabelartigen Strukturen.** Die hier wiedergegebenen Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen mit rekombinantem Myomesin 9–13myc und Myosin schwere Kette (MHC) doppelt transfizierte COS-Zellen, die 12 Stunden (A, B, C), 24 Stunden (D, E, F) und 48 Stunden (G, H, I) *post transfectionem* fixiert wurden. Das Fluoreszenzsignal für die durch indirekte Immunfärbung nachgewiesene MHC ist im roten Kanal (A, D, G), das Signal für das Myomesin konstrukt im grünen Kanal (B, E, H) wiedergegeben. In den Bildern der überlagerten Kanäle (C, F, I) ist die Kolokalisation der beiden exprimierten Protein deutlich zu erkennen. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

in transfizierten Muskelzellen beeinflussen kann. Experimente mit trunkierten Myomesin-konstrukten aus Ratte und Huhn haben gezeigt, daß die Lokalisation dieser Proteinfragmente in Kardiomyozyten speziesspezifische Unterschiede aufweist: die überexprimierte Kopfdomäne des Rattenmyomesins war in neonatalen Rattenkardiomyozyten im Bereich der A-Bande lokalisiert, die Kopfdomäne des Hühnchenmyomesins in Hühnerkardiomyozyten aber diffus im Zytoplasma verteilt vorlag (Auerbach et al., 1999).

In der genannten Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die erste immunglo-

bulinartige Domäne, My2, in transfizierten Zellen bei beiden Spezies eine deutliche M-Bandenlokalisation aufwies und daß das exprimierte Konstrukt My1–3 des Hühnermyomesins in die M-Bande von Rattenkardiomyozyten eingebaut wurde. Zusätzlich bestätigten biochemische Bindungsversuche mit dem Myosinfragment LMM die beschriebene Interaktion der Kopfdomäne des Myomesins mit Myosin (Obermann et al., 1997) und ergaben zudem Hinweise auf eine strukturstabilisierende Wirkung der nachfolgenden Ig-Domäne My2 auf das rekombinante Konstrukt My1, die sich in einer verstärkten Dekoration des Myosins im Bindungsversuch ausdrückte. Für die geplanten Transfektionstudien wurde daher ein murines Myomesinfragment verwendet, das sich von der Kopfdomäne bis zur Domäne 9 erstreckte, um die N-terminale Myosinbindungsstelle in einem erweiterten Kontext untersuchen zu können.

Transfektionsexperimente mit dem carboxyterminalen Myomesinfragment My9–13 in neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigte interessanterweise vor dem Hintergrund einer hauptsächlich diffusen zytoplasmatischen Verteilung eine schwache Querstreifung in den Myofibrillen (Auerbach et al., 1999). Mit murinen Myomesinfragmenten wurde deshalb überprüft, ob My1–9 und My9–13 in Muskelzellen der gleichen Spezies eine Lokalisation in der sarkomeren M-Bande zeigen. Beide murinen Myomesinfragmente wurden in Myoblasten der Zelllinie C2C12 (murine Skelettmuskelzellen, siehe 2.9.1) als GFP-Fusionsproteine unter der Kontrolle des Myomesinpromotors (Vektor pMyP-M, siehe 2.5.2) exprimiert.

In den Myozyoten wurden mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Aktinin die Z-Banden der Sarkomeren sichtbar gemacht und wie in Abbildung 3.23 wiedergegeben dem Fluoreszenzsignal der GFP-Markierung der überexprimierten Myomesinkonstrukte gegenübergestellt. Das aminoternale Myomesinfragment My1–9 war diffus im Zytoplasma verteilt, konnte aber auch in einigen Myofibrillen im Bereich der M-Bande nachgewiesen werden (Fig. 3.23, B und C).

Die bereits beschriebene Rekrutierung aminoterminaler Myomesinfragmente, die die Domäne My2 enthielten, an die M-Bande (Auerbach et al., 1999) konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für Mausmyomesin in murinen Skelettmuskelzellen bestätigt werden. Die Menge des in die M-Bande inkorporierten Myomesins war bei allen transfizierten Myozyoten niedriger als die des rekombinanten Myomesins im Zytoplasma. Eine deutliche Kernlokalisation von My1–9 konnte im Gegensatz zu den transfizierten COS-Zellen (siehe Abbildung 3.19) nicht beobachtet werden.

Das trunkierte Myomesin My9–13 wies neben einer diffusen zytoplasmatischen Verteilung keine M-Bandenlokalisation auf (Fig. 3.23, E und F). Das My9–13 Polypeptid, das



in transfizierten Nichtmuskelzellen mit Myosinfilamenten kolokalisierte und diese quervernetzte, wurde während der Differenzierung der C2C12-Zellen offenbar nicht in die M-Bande eingebaut und konnte mit dem sarkomeren Myosin unter den gewählten Bedingungen nicht interagieren. Das Vorhandensein einer carboxyterminalen Myosinbindungsstelle in Myomesin konnte mit dem vorgestellten Transfektionsexperiment nicht bewiesen werden.

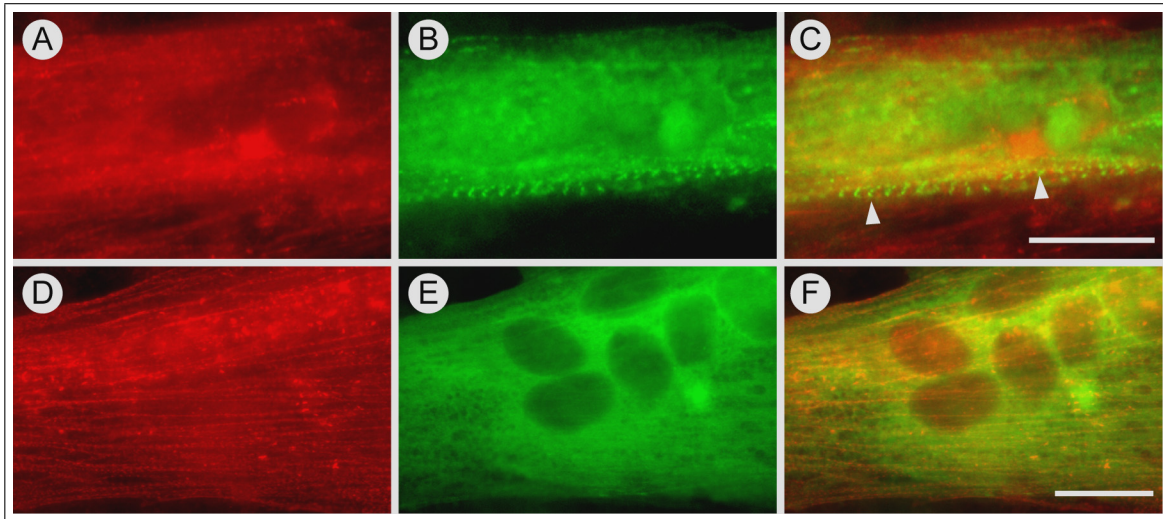


Abbildung 3.23: **Das murine Myomesinkonstrukt 1–9 bindet in differenzierten C2C12-Zellen an die M-Bande, Myomesin 9–13 nicht.** Myoblasten der murinen Skelettmuskelzelllinie C2C12 wurden mit den murinen Myomesinkonstrukten My1–9GFP (A, B, C) und My9–13GFP (D, E, F) transfiziert, zur Differenzierung angeregt und nach fünf Tagen fixiert. Im roten Kanal wird die Markierung von  $\alpha$ -Aktinin (Darstellung der Z-Bande, A, D) und das Signal für GFP im grünen Kanal (B, E) sowie die Überlagerung der beiden Kanäle (C, F) gezeigt. Das Myomesinfragment My1–9 dekorierte die M-Bande (Pfeilspitzen) und ergab ein mit  $\alpha$ -Aktinin alternierendes Bandenmuster (B, C). Das carboxyterminale Fragment My9–13 wies eine ausschließlich diffuse Lokalisation im Zytoplasma auf (E, F). Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

### 3.6 Analyse einer Mutation des humanen Myomesingens

Bei einem Patienten, der an der Hypertrophen Kardiomyopathie erkrankt war, wurde im Rahmen einer Hochdurchsatzsuche nach putativen Krankheitsgenen durch unsere klinischen Kooperationspartner eine Punktmutation in Exon 32 des Myomesingens gefunden. Es konnte ein Stammbaum der Familie des betroffenen Patienten erstellt werden, der 16 Familienmitglieder, deren klinische Daten verfügbar waren, umfaßte.

Sechs Personen der Familie konnte durch gezielte DNA-Sequenzierung des Exons 32

als Träger der Mutation identifiziert werden, fünf Personen hatten weder die Mutation im Myomesingen noch waren sie kardiologisch auffällig und von den restlichen fünf Familienmitgliedern lagen keine DNA-Proben vor.

Drei der sechs Merkmalsträger wiesen Symptome der HCM auf. Die drei anderen Familienmitglieder hatten ebenfalls die Mutation im Myomesingen waren aber klinisch unauffällig. Ihr Lebensalter lag mit 23, 26 und 23 Jahren deutlich unter dem Alter der erkrankten Familienmitgliedern waren zum Zeitpunkt der DNA-Isolierung aus ihren Blutproben 51, 55 und 75 Jahren. Daher ist es denkbar, daß bei ihnen die Krankheit erst in einem höheren Lebensalter auftreten wird.

Die Mutation verändert im Myomesingen das Triplet, das für den Valinrest 1394 kodiert, durch Basenaustausch von **GTT** nach **ATT**, wodurch an die Position 1394 Isoleuzin in die Polypeptidkette eingebaut wird. Zusätzlich wird die an dieser Stelle liegende Erkennungssequenz **GTTAAC** der Restriktionsendonuklease Hinc II durch die Mutation zerstört. Das Verschwinden der Hinc II-Restriktionsschnittstelle wurde in dem beteiligten klinischen Labor ausgenutzt, um durch Restriktionsanalyse von 285 anonymisierten Blutspenderproben und 317 Proben von DCM-Patienten einen Polymorphismus auszuschließen. Auf diese Weise wurde das Vorliegen einer Missensemutation statistisch abgesichert. Bei den untersuchten Familienmitglieder war nur das eine Allel von der Mutation betroffen.

Im Myomesingen kodieren die Exons 32–34 für Domäne 12, bei der durch die Punktmutation der Aminosäureaustausch von Valin 1394 nach Isoleuzin im  $\beta$ -Strang C der Immunoglobulin-domäne erfolgte (markiert in der humanen Myomesinsequenz, vgl. Anhang D). Da Myomesin am Carboxyterminus dimerisiert (vgl. 3.4) und mit Domäne 12 an Myosin bindet (vgl. 3.5), wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Mutation in Domäne 12 die beschriebenen Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflusst.

Hierzu wurde mit verschiedenen experimentellen Ansätzen die Proteinfaltung der mutierten Ig-Domäne analysiert, die Fähigkeit zur Selbstassoziation am Carboxyterminus untersucht und die Myosinbindung mutierter Myomesinfragmente mit dem Wildtyp verglichen.

### 3.6.1 Spektroskopische Untersuchungen mutierter Myomesinfragmente

Durch Messung des Circular dichroismus von gereinigtem Myomesin wurde gezeigt, daß Myomesin ein Protein mit überwiegendem Anteil an  $\beta$ -Faltblattstruktur ist (Obermann et al., 1995). Für einzelne Myomesindomänen waren aber bisher keine CD-Spektren gemessen worden. Die Struktur der einzelnen Domänen wurde durch Analyse der bekannten

Primärsequenz den Fibronectin- und Immunglobulinfaltungsmotiven FNIII und IgI zugeordnet (siehe EINLEITUNG).

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit zum einen die Sekundärstruktur der carboxyterminalen Dimiersierungsdomäne charakterisiert und zum anderen die Faltung der mutierten Domäne 12 untersucht.

Verschiedene Myomesinfragmente, die in Domäne 12 den Valin-Isoleuzin-Austausch enthielten, wurden mittels PCR durch gezielte Mutagenese hergestellt (zur Verfügung gestellt von Dr. K. Hayeß).

Zur spektroskopischen Untersuchung des Myomesincarboxyterminus wurden die drei verschiedenen Konstrukte My9–11, My11–12 und My12–13 verwendet, die spektroskopisch untersucht wurden. In Abbildung 3.24 wird das Spektrum von My9–11 gezeigt, das charakteristische Merkmale eines  $\beta$ -Proteinspektrums aufweist: ein Minimum bei 215 nm und ein Maximum im kürzerwelligen Bereich (192 nm), siehe Abb. 3.24 A.

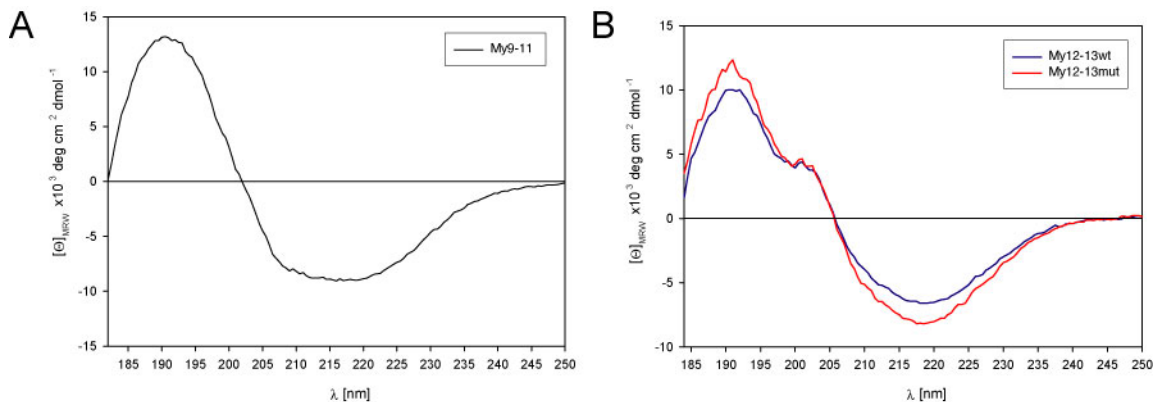


Abbildung 3.24: **My9–11 hat wie My12–13  $\beta$ -Faltblattstruktur, die zwischen Wildtyp und Mutante von My12–13 nicht verändert ist.** **A.** Das Myomesinfragment My9–11, das die mutierte Domäne 12 nicht enthielt, wies im fernen UV-Bereich ein CD-Spektrum mit einem Minimum 215 nm und einem Maximum bei 192 nm auf, wie es für ein Protein mit  $\beta$ -Faltblattstruktur zu erwarten war. **B.** Der Wildtyp und die Mutante von My11–12 ergaben annähernd gleiche CD-Spektren, die Amplituden im Minimum (218 nm und Maximum (192 nm) waren bei der Mutante etwas vermindert. Im Gegensatz zu My9–11 gaben die Myomesinfragmente My12–13 im Spektrum ein zweites Maximum bei 203 nm.

Die CD-Spektren des Wildtyps und der Mutante von My12–13 deuten ebenfalls auf eine  $\beta$ -Sekundärstruktur hin, die Lage des Minimums (218 nm) war leicht verschoben, daneben trat ein zusätzliches Maximum bei 203 nm auf (vgl. 3.24 B). Beide Myomesinkonstrukte ergaben das annähernd gleiche CD-Spektrum, die Amplitudenhöhe des Wildtyps war aber etwas geringer als bei der Mutante.

Rekombinantes Myomesin My11–12 wurde alternativ zu dem Konstrukt My12–13 mittels CD-Spektroskopie untersucht, um einen möglichen Einfluß der Dimerisierungsdomäne

auf die Stabilität der mutierten Domäne 12 und damit das Meßsignal auszuschließen. Beide Konstrukte lieferten im Fern-UV fast deckungsgleiche Spektren, die von denen für My12–13 erhaltenen Spektren durch eine leichte Verschiebung der Minima auf 220 nm und eine höhere Amplitude unterschiedlich waren (siehe Abbildung 3.25, A).

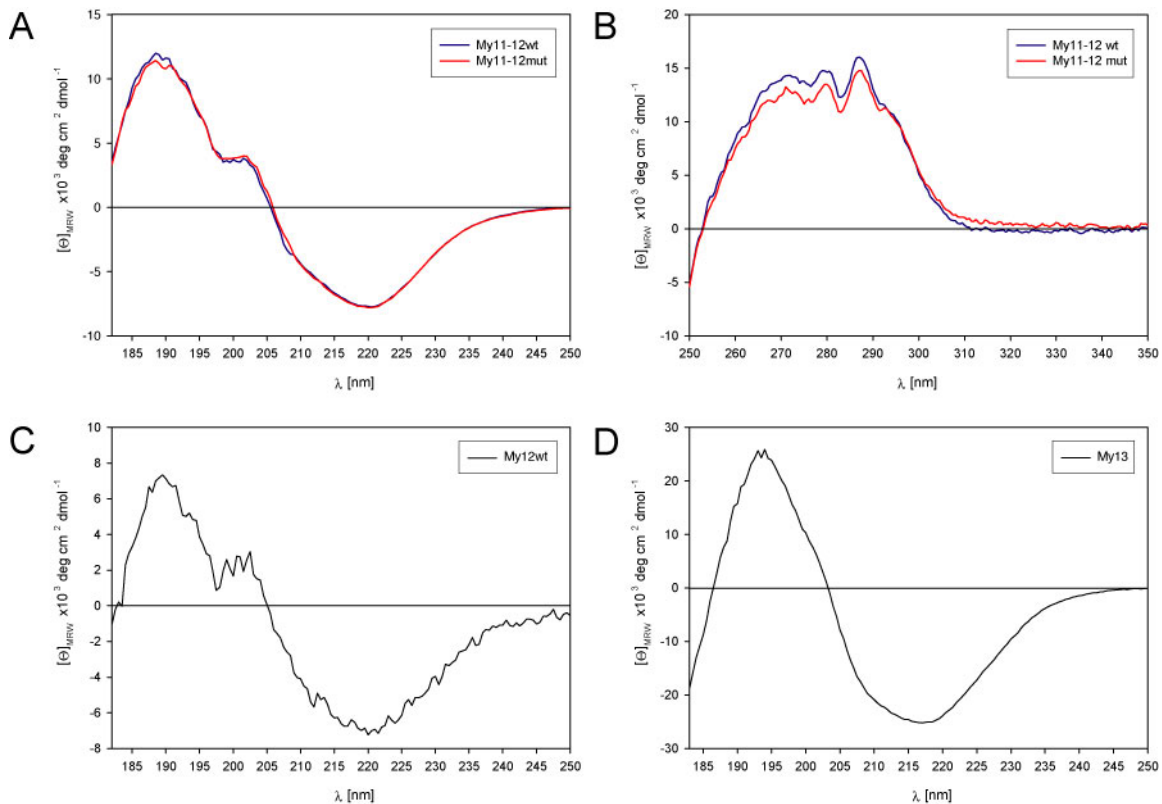


Abbildung 3.25: **Carboxyterminale Myomesinfragmente haben die gleiche Sekundärstruktur, aber unterschiedliche CD-Spektren.** **A.** Die Mutation in Domäne 12 hat keinen Einfluß auf die Sekundärstruktur des Proteins, denn das CD-Spektrum der Mutante My11–12 gleicht im fernen UV-Bereich dem des Wildtyps von My11–12. **B.** Nah-UV-Spektren zeigen, daß die Tertiärstruktur der beiden Proteinfragmente ebenfalls identisch ist. Das Wildtypfragment weist leicht höhere Amplituden auf. **C.** Die Domäne 12 hat ein von den Myomesinkonstrukten My9–11 (vgl. Abb. 3.24) und My13 (D) abweichendes CD-Spektrum, das durch ein zweites Maximum bei 202 nm gekennzeichnet ist. **D.** Das CD-Spektrum von My13 zeigt hohe Amplituden und ähnelt im Verlauf dem Spektrum von My9–11.

Im Nah-UV-Bereich wurden deutliche Signale für Wildtyp und Mutante von My11–12 erhalten, was auf das Vorhandensein einer Tertiärstruktur hindeutete (siehe Abbildung 3.25 B). Der Wildtyp wies eine etwas höhere Amplitude auf. Der Spektrenverlauf war bei Wildtyp und Mutante fast gleich. Beide Varianten von My11–12 lagen demnach gefaltet und mit  $\beta$ -Sekundärstruktur vor.

Die einzelne Domäne 12 konnte nur unter denaturierenden Bedingungen und mit geringerer Ausbeute als beispielsweise My13 gereinigt werden. Die beiden Spektren in Abbil-

dung 3.25 C und D zeigen, daß sich My12 und My13 spektroskopisch deutlich unterscheiden. Während die Dimerisierungsdomäne My13 ein konventionelles  $\beta$ -Spektrum (mit vergleichsweise hohen Amplituden) aufwies, war in dem Spektrum von My12 das zweite Maximum um 202 nm auffällig. Diese Schulter in der Flanke des zunehmenden CD-Signals im kurzwelligen Bereich wurde in den Spektren von My11–12 und My12–13 ebenfalls beobachtet, wurde aber offensichtlich allein durch Domäne 12 verursacht.

Die CD-Spektroskopie ergab insgesamt keine Hinweise auf eine veränderte Sekundärstruktur der mutierten Immunglobulindomäne My12. Deshalb wurde mittleres Fluoreszenzspektroskopie untersucht, ob die Entfaltung der Ig-Domänen von Wildtyp und Mutante durch Guanidiniumchlorid mit unterschiedlicher Geschwindigkeit verläuft (siehe 2.8.2).

Ein Vorexperiment zeigte bereits, daß die Entfaltung beider Ig-Domänen durch 6 M Guanidiniumchlorid innerhalb von 60 s vollständig erfolgte, denn das Fluoreszenzsignal änderte sich innerhalb der nächsten 30 min nicht mehr. Die Entfaltung beider Myomesinfragmente lief mit gleicher Geschwindigkeit ab, wie eine Auftragung des Fluoreszenzsignals (in *counts per seconds*) gegen die Zeit ergab (Ergebnisse nicht gezeigt). Da auch mit dieser Methode keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante zu erwarten waren, wurde auf ausführlichere Messungen verzichtet.

Mit den hier vorgestellten biophysikalischen Methoden konnten keine Unterschiede zwischen My12 Wildtyp und Mutante ermittelt werden.

### 3.6.2 Biochemische Experimente mit mutiertem Myomesin

Die spektroskopische Analyse erbrachte also keine Hinweise auf einen veränderte Faltung der mutierten Domäne 12 in Myomesin. Daher wurde im folgenden die Frage untersucht, ob der mutationsbedingte Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleuzin die Bindungseigenschaften des Proteins beeinflusst. Dazu wurden die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Dimerisierung am Carboxyterminus des Myomesinmoleküls und die Myosin-Myomesin-Interaktion an Domäne 12 mit mutierten Myomesinkonstrukten untersucht.

Die Dimerbildung konnte durch ein Quervernetzungs experiment bei Wildtyp und Mutante des Konstruktes My12–13 mit vergleichbarer Effizienz beobachtet werden, wie in Abbildung 3.26 A gezeigt. Die Myomesindimerisierung wird durch den Aminosäureaustausch V1394I nicht gestört.

Für die Analyse der Myosinbindung wurden native Myosinfilamente auf Nitrozellulose immobilisiert und mit My12 Wildtyp und Mutante inkubiert. Beide Konstrukte dekorierten Myosin auf der Membran, die Mutante hat etwas schwächer an Myosin gebunden (siehe

Abbildung 3.26 B). Dieser Unterschied in der Bindung war detektierbar, wenn die Konzentration des rekombinanten Myomesinfragmentes bei 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  im Ansatz lag und sonst nicht. Für mutiertes Myomesin kann eine moderate Beeinträchtigung der Wechselwirkung mit Myosin vermittelt durch die zusätzliche Myosinbindungsstelle in My12 daher nicht ausgeschlossen werden.

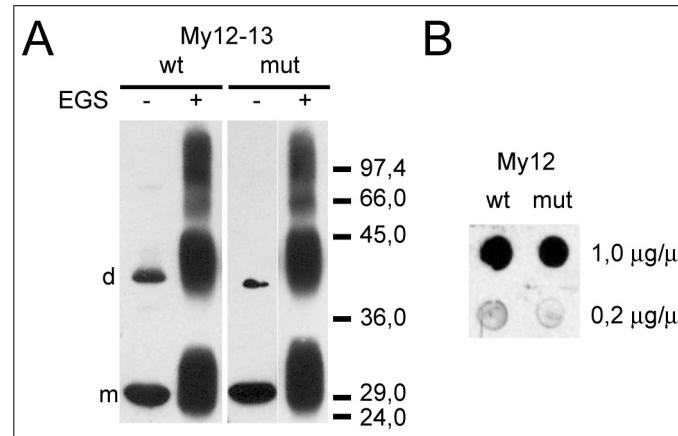


Abbildung 3.26: **Mutierte Myomesinkonstrukte dimerisieren und binden Myosin.** **A.** Quervernetzungsexperimente wurden mittels Immunblotting und ECL-Reaktion ausgewertet. Die Mutante von My12–13 wurde mit gleicher Effizienz wie der Wildtyp quervernetzt. In beiden Proben war eine geringe Menge Dimer bereits in den Kontrollen ohne Quervernetzer nachweisbar. Monomer- (m) und Dimerbanden (d) sind markiert. **B.** Für einen Flüssig-Festphasenversuch wurden 15  $\mu\text{g}$  native Myosinfilamente auf Nitrozellulosestreifen immobilisiert und mit zwei verschiedenen Konzentrationen von My12 Wildtyp und Mutante wie angegeben inkubiert. Beide Myomesinfragmente dekorierten Myosin auf der Membran, die Mutante hat etwas schwächer an die Myosinfilamente gebunden, wie bei der niedrigeren Konzentration von My12 im Ansatz zu beobachten war.

### 3.6.3 Molekularbiologische Analyse des mutierten Myomesins

Mit biophysikalischen und biochemischen Methoden konnte kein deutlicher Einfluß der Mutation auf die Faltung und Bindungseigenschaften des rekombinanten Myomesins beobachtet werden. Bei der spinalen Muskelatrophie konnte indes gezeigt werden, daß eine auf Aminosäureebene stumme Mutation trotzdem krankheitsverursachend war.

Durch die Mutation wurde eine für das korrekte Spleißen wichtige Sequenz regulatorische Sequenz in dem betroffenen Exon zerstört, und der Verlust dieses *exonic splicing enhancers* (ESE) führte zu einem Auslassen des Exons beim Spleißen der Prä-mRNA (Lorson et al., 1999). Das translatierte Protein war trunziert und erfüllte seine biologische Funktion nicht mehr.

Die Punktmutation in Exon 32 des humanen Myomesingens wurde deshalb in Richtung der Frage hin untersucht, ob sie die Reifung der mRNA beeinflusst. Zunächst wurde eine Vorhersage über das Auftreten von ESE-Sequenzen in der Sequenz des Exons 32 mit der RESCUE-ESE Datenbank (Fairbrother et al., 2002) erstellt.

In dieser Datenbank sind 238 experimentell bestätigte ESE-Sequenzmotiven hinterlegt. Die Abfrage in der Datenbank ergab für den Wildtyp des Exons 32 13 Treffer in der Datenbank, wie in Abbildung 3.27 wiedergegeben.



Abbildung 3.27: **In Exon 32 des humanen Myomesingens sind putative *exon splicing enhancer* Sequenzmotive.** Die DNA-Sequenzen des Wildtyps und der Mutante von Exon 32 sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Über diesen Sequenzen werden die mittels der RESCUE-ESE Datenbank identifizierten ESE-Motive in Exon 32 dargestellt. **A.** Im Wildtyp des Exons 32 wurden mehrere putative ESE gefunden. Eines dieser Sequenzmotive lag am 3'-Ende des Exons 32 und endete mit der Base, die durch die Punktmutation im Myomesingen verändert wird. **B.** Die Mutation in Exon 32 zerstörte das ESE-Motiv des Wildtyps, erzeugte aber gleichzeitig ein neues ESE-Motiv mit fast identischer Position am Ende des Exons. Die durch die Punktmutation veränderte Base ist hervorgehoben und in den gezeigten Sequenzen umrahmt.

Sieben dieser 13 Motiven treten am 5'-Ende und fünf am 3'-Ende des Exons gehäuft auf (vgl. Abbildung 3.27). Diese Verteilung paßt gut zu den bisherigen Erkenntnissen ESE, denn *exonic splicing enhancer* sind in der Nähe der Erkennungssequenzen für das Spleißen stärker repräsentiert an den Flanken eines Exons (Berget, 1995).

In Anlehnung an die für das SMN2-Gen vorgestellten Experimente zum Nachweis der Zerstörung eines ESE-Motives durch eine Punktmutation (siehe Lorson et al. (1999)) wurden Myomesinminigene konstruiert. Sie enthielten die folgende Exons und Introns aus der genomischen Sequenz des humanen Myomesins: Exon 31, Intron 31, Exon 32, Intron 32 und Exon 33. Die Abbildung 3.28 A gibt das schematisch wieder.

Die gereinigte genomische DNA aus der Blutprobe (Kennnummer 1654) eines der Mitglieder der von der HCM betroffenen Familie, wurde als Matritze für eine PCR-Reaktion

gewählt. Durch Amplifikation mit den Primern Myom ex31fwd und Myom ex33rev wurden beide Minigensspezies, Wildtyp und Mutante, in einem Ansatz erhalten, da die Mutation heterozygot ist.

Die Mischung der Amplifikate wurde in das Plasmid pCMV5-T7 kloniert und durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym Hinc II ließen sich Klone, die dem Wildtyp (Hinc II Erkennungssequenz vorhanden) bzw. der Mutante (Hinc II Erkennungssequenz zerstört) des Myomesinminigens entsprechen, identifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Klone wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Die unterschiedliche Prozessierung des Wildtyps und der Mutante des Myomesinminigens wurde in transfizierten BHK- und HeLa-Zellen untersucht. BHK-Zellen wurden kurz vor der Transfektion zur Differenzierung angeregt, um die Reifung der rekombinanten Prä-mRNA in einer Muskelzellumgebung zu überprüfen. In der humanen HeLa-Zelllinie wurde überprüft, ob es einen speziesspezifischen Unterschied beim Spleißen der Minigene gibt.

Die gespleißten Transkripte der Myomesinminigene wurden in RNA-Extrakten mittels RT-PCR und unter Verwendung der beiden Primer Myom ex31fwd und Myom ex33rev sichtbar gemacht (siehe Abbildung 3.28 C). Es zeigte sich, daß die RT-PCR Amplifikate

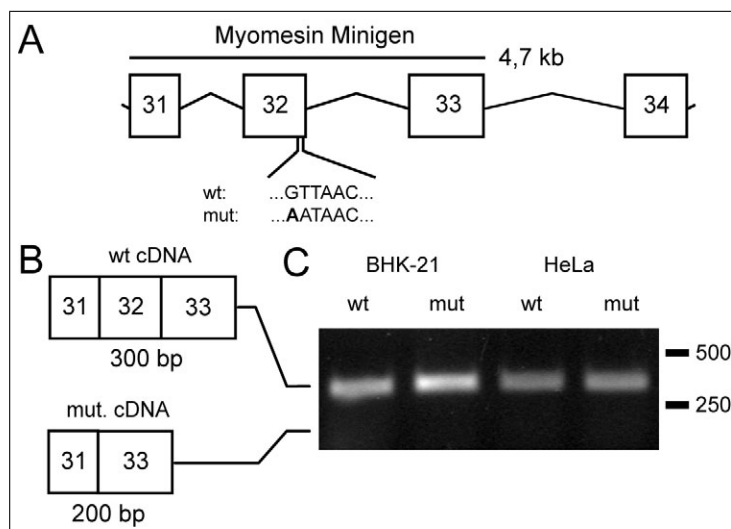


Abbildung 3.28: **Die Punktmutation hat keinen Einfluß auf das Spleißen eines Myomesinminigens.** **A.** Ein Ausschnitt der Genstruktur des humanen Myomesins zeigt Exons (Kästchen) und Introns (Linien). Die Exons 32–34 kodieren für die Domäne My12. Die mutierte DNA-Sequenz in Exon 32 ist angegeben. Wildtyp und Mutante Minigenkonstrukte enthielten die Exons 31 bis 33 sowie die beiden dazwischenliegenden Introns und waren 4,7 kb groß. **B.** Die zwei möglichen Spleißprodukte der Minigene unterscheiden sich durch das Auslassen des Exons 32 bei der Mutante um 100 bp. **C.** Die Spleißprodukte der Minigene wurden in RNA-Extrakten transfizierter BHK- und HeLa-Zellen mittels RT-PCR amplifiziert. Nur korrekt gespleißte Transskripte wurden nachgewiesen.



exakt die für den Wildtyp erwartete Fragmentgröße aufwiesen. Die Punktmutation hat demnach keinen Einfluß auf das Spleißen des Exons 32 in differenzierenden Myofibroblasten (BHK-Zellen) oder in humanen Epithelzellen (HeLa-Zellen).

Eine Beitrag der Myomesinmutation auf molekularbiologischer Ebene zum Pathomechanismus der Hypertrophen Kardiomyopathie konnte daher nicht gefunden werden.

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Die vollständige Aminosäuresequenz des humanen Myomesins zeigt neue Eigenschaften des Proteins auf.

Im Zuge des humanen Genomprojektes wurden DNA-Sequenzen verfügbar, die Hinweise auf zwei bisher nicht bekannte Exone am 5'-Ende des humanen Myomesingens lieferten. Aus einem RNA-Extrakt kultivierter HSkM-Zellen konnte tatsächlich ein diesem Bereich entsprechendes cDNA-Fragment amplifiziert werden, das mit anderen Myomesinfragmenten zur kompletten Myomesin cDNA zusammengesetzt wurde (siehe 3.1.1). Diese cDNA war eine wichtige Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen längerer Myomesinkonstrukte.

Erstmals stand somit die komplette cDNA-Sequenz des humanen Myomesins zur Verfügung. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die Divergenz zwischen der humanen und murinen Proteinsequenz am Aminoternus (Steiner, 1997) weniger stark ist, als bisher angenommen (vgl. 3.1.1).

Ein Grund für das Fehlen von Fragmenten am 5'-Ende des Myomesin in cDNA-Banken könnte der hohe GC-Gehalt in dieser Region und die dadurch möglicher Bildung von Sekundärstrukturen sein, die die RT-Reaktion bei der Herstellung der cDNA-Banken behindern.

### 4.1.1 Die vollständige Kopfdomäne des humanen Myomesins

Ein wichtiges Ergebnis der Klonierung der Myomesin cDNA war die Vervollständigung der Sequenz am 5'-Ende. Die Kopfdomäne des humanen Myomesins entspricht in ihrer Größe nun den Domänen My1 aus Maus, Ratte und Huhn. Die nähere Betrachtung dieser neuen Sequenz erlaubt einige Interpretation der Funktion des Myomesins in der Sarkomere.

Die Regulation der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Myomesin und Titin beruht auf der Phosphorylierung des Serinrestes 618 in Myomesin (Obermann et al., 1997). Ähnliche Regulationsmechanismen könnten in der vollständigen Kopfdomäne eine Rolle spielen. Vorausgegangene Phosphorylierungsexperimente mit der rekombinanten Domäne My1, die noch unvollständig war, hatten aber keine Hinweise auf eine Kinaseaktivität in Skelettmuskelextrakt geliefert, die das aminoternale Fragment *in vitro* phosphorylieren könnte (Obermann, 1996).

In der nun vollständigen Proteinsequenz konnten in einer Datenbank (CBSA, 2004) mehrere putative Erkennungssequenzen identifiziert werden, die den Aminoterminus des Myomesins als Substrat verschiedener Proteinkinasen in Frage kommen lassen. Zu diesen Kinasen gehören PKA, PKC und PKG sowie die CaM-Kinase II und die Caseinkinase II. Die genaue Position dieser Erkennungssequenzen wird in der Tabelle F.1 im Anhang wiedergegeben.

Mit den in der vorliegenden Arbeit etablierten experimentellen Ansätzen sollte sich eine Phosphorylierung des rekombinanten Myomesinfragmentes My1 überprüfen und die Kinaseaktivität genauer eingrenzen lassen. Tatsächlich deuten erste Versuche auf wenigstens zwei verschiedene Kinaseaktivitäten in Muskelzellextrakten hin, die cAMP-stimulierbar und cAMP-unabhängig My1 phosphorylieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Eine bisher nicht entdeckte Phosphorylierungsstelle in der Domäne My1 könnte die unterschiedliche Lokalisation der rekombinanten Kopfdomäne in transfizierten Zellen erklären. Die Beobachtung, daß humane Myomesinkonstrukte, die den Aminoterminus enthalten, bei *in vitro* Transfektionsstudien mit Nichtmuskelzellen in den Zellkern transportiert werden (vgl. Abbildung 3.19), wirft die Frage auf, ob in differenzierenden Muskelzellen Kernlokalisierungssequenzen in My1 durch Phosphorylierung inaktiviert werden. In der vollständigen Aminosäuresequenz der Kopfdomäne des humanen Myomesins wurde zwar kein konventionelle Kernlokalisierungssequenz identifiziert, aber das repetitive Sequenzmotiv STAS[K/R]Q in My1 könnte durch die Häufung basischer Aminosäuren als nicht konventionelles Kerntransportsignal fungieren. Die Kernlokalisierung in transfizierten COS-Zellen könnte aber auch auf fehlende Bindungspartner hindeuten, mit denen Myomesin

im Zytoplasma einer Muskelzelle interagieren würde. Transfektionsstudien in verschiedenen Zelltypen ergaben ein relativ heterogenes Bild bezüglich der Lokalisation von My1, wie Tabelle 4.1 zeigt. Die in der Tabelle 4.1 vorgestellten Transfektionsstudien belegen,

Konstrukt	Spezies	Zelltyp	Lokalisation	Zitat
My1	Mensch	COS	Zellkern	1
My1-3	Mensch	COS	Zellkern	1
My1-13	Mensch	COS	Zellkern	1
My1-9	Maus	C2C12	M-Bande	1
My1	Ratte	NRC	A-Bande	2
My1	Huhn	NRC	Zytoplasma/Zellkern	2
My1-3	Huhn	NRC	M-Bande	2
My1-14	Huhn	NRC	M-Bande	2
My1	Huhn	NCC	Zytoplasma	2

Tabelle 4.1: **Die aminoterminalen Kopfdomäne allein ist für die M-Banden-Lokalisation rekombinanter Myomesinfragmente nicht ausreichend.** In der Tabelle werden transfizierte Myomesinkonstrukte, die mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht wurden, aufgeführt. Die verwendeten Zelltypen waren: COS (Fibroblasten, Affe), C2C12 (Skelettmuskel, Maus), neonatale Rattenkardiomyozyten (NRC) und neonatale Hühnerkardiomyozyten (NCC). Die Ergebnisse wurden vorgestellt in: (1) dieser Arbeit; (2) Auerbach et al. (1999). Die kardiale Myomesinisoform des Huhns weist eine C-terminale Extension auf, die als Domäne 14 bezeichnet wird.

daß die singuläre Kopfdomäne des Myomesins in Nichtmuskelzellen in den Zellkern transportiert wird und in neonatalen Kardiomyozyten vor allem diffus im Zytoplasma verteilt ist. Dagegen dekorierte My1 der Ratte in neonatalen Rattenkardiomyozyten den Bereich der A-Bande (Auerbach et al., 1999), nicht aber speziell die M-Bande, in der endogenes Myomesin lokalisiert ist.

Eine ähnliche Situation ergab sich mit aminoterminalen M-Proteinfragmenten. Das humane Konstrukt Mp1-3 zeigte fast ausschließlich eine Kernlokalisation in transfizierten BHK- und C2C12-Zellen (Obermann et al., 1998). Die Myosinbindungsstelle Mp2-Mp3 konnte den Einbau von Mp1-3 in die M-Bande nicht vermitteln.

In Muskelzellen dekorierten aminoterminalen Myomesinfragmente, die mindestens Domäne 2 und 3 enthalten, die M-Bande (Auerbach et al., 1999), wie der Tabelle 4.1 zu entnehmen ist. In transfizierten Nichtmuskelzellen interagierten dagegen auch diese längeren aminoterminalen Myomesinkonstrukte nicht mit dem rekombinanten Myosin im Zytoplasma, sondern wurden in den Zellkern transportiert.

Interessanterweise konnten Auerbach et al. (1999) eine Lokalisation aminoterminaler Myomesinfragmente in der M-Bande neonataler Kardiomyozyten zeigen, wenn die Im-

munglobulindomäne My2 enthalten war. Die einzelne Domäne My2 wurde ebenfalls in die M-Bande inkorporiert.

Mit einem Dot Blot Overlay Experiment wurde die Bindung von My1 von Ratte und Huhn an Myosin demonstriert. My2 zeigte unter diesen Bedingungen keine Interaktion mit Myosin (Auerbach et al., 1999). Für den Einbau des Myomesins in die sarkomere M-Bande dagegen ist in Kardiomyozyten offenbar nur die Domäne My2 erforderlich. Die durch die Kopfdomäne vermittelte Myosinbindung spielt zu diesem Zeitpunkt keine Rolle. Die Immunglobulindomäne My2 ist für die *in vivo* Lokalisation des Myomesin in der M-Bande verantwortlich.

In dieser Arbeit wird erstmals die M-Bandenlokalisation eines transfizierten Myomesinfragmentes, My1–9, in differenzierenden Skelettmuskelzellen gezeigt (siehe Abbildung 3.23). Offensichtlich ist die korrekte Lokalisation aminoterminaler Myomesin- und M-Proteinfragmente in transfizierten Zellen auch stark speziesspezifisch, wie hier am Beispiel eines murinen Myomesinfragmentes in Skelettmuskelzellen aus der Maus gezeigt. Diese Speziesspezifität wäre essentiell bei der Planung weiterer Transfektionsexperimente.

Die hier vorgestellten Beobachtungen zeigen, daß die Myomesindomäne My1 alleine offenbar nicht für die M-Bandenlokalisation des Myomesins verantwortlich ist. Die Kopfdomänen der beiden M-Bandenproteine Myomesin und M-Protein könnten ein starkes Signal für den Transport in den Zellkern enthalten, das aber in der differenzierten Muskelzelle reprimiert wird, wie die Transfektionsdaten von My1 der Ratte in NRC belegen (Auerbach et al., 1999).

## 4.2 Myomesin wird *in vitro* und *in vivo* durch PKA phosphoryliert.

Biochemische Versuche hatten bereits auf eine PKA-abhängige *in vitro* Phosphorylierung rekombinanter Myomesinfragmente hingewiesen (Obermann et al., 1997). Die Proteinkinase A wurde deshalb mit verschiedenen Stimulatoren und Inhibitoren als die Kinase eindeutig identifiziert, die Myomesin an Serin 618 phosphoryliert. Weitere Versuche sollten die Beteiligung der Proteinkinase A an der *in vivo* Phosphorylierung des humanen Myomesins zeigen und Hinweise auf den Mechanismus der Aktivierung dieser Kinaseaktivität bezüglich der Phosphorylierung des Myomesins in Zellen geben. Es konnte gezeigt werden, daß Myomesin *in vitro* an Serin 618 durch Proteinkinase A aus Skelettmuskelzellextrakten phosphoryliert werden, und diese Phosphorylierung ist mit dem spezifischen PKA-Inhibitor

PKI hemmbar (siehe Abbildung 3.4). Die Stimulierung der PKA-vermittelten Phosphorylierung des Myomesins *in vivo* wurde durch gezielte Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade in differenzierten Skelettmuskelzellen näher untersucht. Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase und bewirkte eine verstärkte Phosphorylierung des Myomesins innerhalb von fünf Minuten. Isoprenalin und Clenbuterol stimulieren  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren und zeigten einen starken Effekt auf die *in vivo* Phosphorylierung des Myomesins (vgl. Abbildung 3.4). Die Wirkung setzte im Vergleich zur Isoprenalin-stimulierten Phosphorylierung des M-Proteins, die innerhalb einer Minute ihren Maximalwert erreicht hatte (Hartzell und Titus, 1982), später ein. Diese Phosphorylierungsexperimente mit M-Protein wurden an isoliertem Muskelgewebe (Atrium) aus dem Froschherz durchgeführt

Die Strukturen in der Z- und M-Bande der Sarkomere werden wahrscheinlich nicht absolut statisch sein, sondern unterliegen zum einen räumlichen Ausdehnungsprozessen, die während der Kontraktion auftreten (Atmen der Sarkomere), und reagieren zum anderen auf externe Stimuli, die durch Umbau dieser hochgeordneten Struktur eine Anpassung an erhöhte Belastungen oder an Krankheitsgeschehen erfordern. Die Phosphorylierung von Myomesin durch PKA könnte dazu beitragen, die Eigenschaften der M-Bande zu modulieren, sie vielleicht flexibler zu machen, indem die Bindung von Myomesin an Titin durch diese Phosphorylierung destabilisiert wird. Auf diese Weise können Proteinphosphorylierungen (und Dephosphorylierungen) in Antwort auf hormonelle Signale die Eigenschaften der M-Bande den konkreten Erfordernissen anpassen.

Die Kontrolle der Muskeltätigkeit ist von physiologischen Parametern abhängig, die aber nicht isoliert vom sarkomeren Zytoskelett betrachtet werden können. Ein wichtiges Prinzip ist die Kompartimentierung von Prozessen, die am Ende zu einer physiologischen Antwort des Muskels führen. Das Zytoskelett ist das Gerüst, mit dem diese lokalen Funktionseinheiten zusammengehalten werden.

Die Kontraktion eines Muskels wird durch Nervenimpulse angeregt, die indirekt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führen und so kontraktionsauslösend wirken (näher beschrieben unter 1.1). Eine Anpassung der Leistungskraft des Herzmuskels an den situationsbedingten Bedarf (Ruhe, Arbeit) kann durch Hormone erfolgen. Katecholamine werden durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems verstärkt ausgeschüttet und wirken über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren positiv auf die Kontraktionskraft (inotrope Wirkung) und die Herzschlagrate (chronotrope Wirkung).

Diese gesteigerte Kontraktionsleistung wird erbracht, indem unter anderem die Relaxation des Muskels und die Absenkung der intrazellulären Kalziumkonzentration schneller

erfolgen. An diesen Prozessen sind in Kardiomyozyten einige der bisher bekannten Substrate der Proteinkinase A beteiligt.

Im Troponinkomplex wird durch Phosphorylierung von TnI die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des TnC herabgesetzt (Robertson et al., 1982) und strukturelle Interaktionen zwischen TnI und TnC in diesem Komplex verändert (Finley et al., 1999; Heller et al., 2003). Die Phosphorylierung von TnI durch PKA verursacht in isolierten Myofibrillen eine parallele Expansion der Myofilamente (Konhilas et al., 2003). Die kardiale Titinisoform wird durch PKA in der N2B-Region phosphoryliert, wodurch die Elastizität dieses Moleküls herabgesetzt und die passive Spannung der Herzmuskelzelle verringert wird (Yamasaki et al., 2002). Die Phosphorylierung von Phospholamban hebt dessen inhibitorische Wirkung auf die sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) auf (Kirchberger et al., 1974).

Die PKA-vermittelte Modulation der Aktivierung an der Erregungs-Kontraktionskopplung beteiligter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Kardiomyozyten ist ein gutes Beispiel für das lokale Zusammenwirken von verschiedenen Komponenten, Membranproteinen, Adapterproteinen und Enzymen, in den Sarkomeren benachbarten Strukturen.

Durch verschiedene Stimuli kann die intrazelluläre cAMP-Konzentration angehoben werden, aber nur die Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren führt selektiv zu einer positiv inotropen und chronotropen Wirkung auf den Herzmuskel. Das wird erreicht durch lokal sehr begrenzte cAMP-Konzentrationserhöhungen, die nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation in Mikrodomänen auftreten. Innerhalb dieser Mikrodomänen (oder Mikrokompartimente) können cAMP-Moleküle maximal eine Strecke von 1  $\mu\text{m}$  durch Diffusion zurücklegen (Zaccolo und Pozzan, 2002). Zum Vergleich: Die Längenausdehnung einer einzelnen Sarkomere in Ruhe beträgt 2–3  $\mu\text{m}$ ! Für die Aufrechterhaltung dieses scharfen Konzentrationsgradienten ist die Phosphodiesterase verantwortlich. (Zaccolo und Pozzan, 2002).

Diese lokalen cAMP-Erhöhungen treten im Bereich der Triaden auf und treffen hier auf Proteinkinase A, die durch spezielle Adapterproteine (*A kinase anchoring proteins*, AKAP), an der Zellmembran oder an Zytoskelettstrukturen fixiert ist (Diviani und Scott, 2001). Damit wird eine enge räumliche Kopplung zwischen dem *second messenger* cAMP und seinem Ziel, der PKA, geschaffen, die ihrerseits wiederum in unmittelbarer Nähe ihrer wichtigsten Substrate fixiert ist. Die cAMP-abbauende Phosphodiesterase kann zudem an einige AKAP-Isoformen binden, was die strukturelle Basis für die Schaffung der cAMP-Mikrodomänen sein könnte.

Die Phosphorylierung des Myomesins findet etwas weiter entfernt im Zentrum der Sarkomere statt und kann von ihrem zeitlichen Verlauf her, wie er sich aus den Stimulierungs-

experimenten in dieser Arbeit ergab, funktionell nicht mit der Steigerung der Kontraktionsleistung gekoppelt sein, die innerhalb von Sekunden abläuft. Die Bedeutung dieser Phosphorylierung könnte in der Regulation des Umbaus der Sarkomere während hypertropher oder regenerativer Prozesse liegen.

Bei einer dauerhaften Stimulierung des  $\beta$ -adrenergen Systems, wie sie z. B. bei der Dilatativen Kardiomyopathie beobachtet wird, könnten die Mechanismen, die die Phosphorylierung des Myomesin in kultivierten Zellen so stark verzögert hatten, durch die Dauerbelastung überwunden werden. Ein Kandidat hierfür wäre die Phosphodiesterase, die die ständig erhöhte cAMP-Konzentration in der Zelle nicht verringern könnte. Dadurch wäre die Phosphorylierung des Myomesins und damit die Signaltransduktion in die M-Bande hinein möglich, die im gesunden Muskel unterdrückt bliebe. Das könnte an der Entstehung einer Hypertrophie beteiligt sein, wenn Myomesin als Sensor den Umbau der Sarkomere einleitet. Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung im intakten Muskel wäre zu untersuchen.

#### **4.2.1 PKA ist an der Entwicklung von Herzmuskelerkrankungen beteiligt**

Die Rolle der PKA bei Herzmuskelerkrankungen wurde durch Analyse der PKA-Aktivität oder durch die Untersuchung von PKA-stimulierenden Signalkaskaden charakterisiert.

In einem Mausmodell wurde durch Überexprimierung der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A der Einfluß konstitutiv aktiver PKA auf die Entwicklung des Herzmuskels untersucht (Antos et al., 2001). Die Tiere zeigten nach 13 Wochen deutliche Anzeichen einer Dilatativen Kardiomyopathie. Eine Hyperphosphorylierung des Ryanodinrezeptors und von Phospholamban konnte ebenfalls festgestellt werden. In RNA-Extrakten aus Herzmuskelgewebeprobe transgener Tiere wurde Transkripte von Markergenen für Hypertrophie gefunden (Antos et al., 2001). Die Aktivität der PKA ist bei der Dilatativen Kardiomyopathie aber nicht generell gesteigert (Kirchhefer et al., 1999). Interessanterweise führt die Überexprimierung der Adenylatzyklase in einem anderen Mausmodell nicht zu dem gleichen Krankheitsbild, sondern erhöht die Kontraktionsleistung des Herzens (Gao et al., 1999). Das verdeutlicht die Komplexität des  $\beta$ -adrenergen Systems, denn möglicherweise wird die gesteigerte Aktivität der Adenylatzyklase durch noch unbekannte Komponenten wieder eingeschränkt oder der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration durch verstärkte cAMP-Hydrolyse (vermittelt z. B. durch die Phosphodiesterase) kompensiert. Die überexprimierte aktive PKA kann in den Kardiomyozyten aber offenbar nicht



effizient inhibiert werden.

Myomesin wird *in vivo* durch die Stimulierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren phosphoryliert, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt (siehe 3.2.1). Diese membranständigen Rezeptoren werden durch die Bindung eines Liganden (z. B. Noradrenalin) stimuliert. Aktivierte adrenerge Rezeptoren vollziehen eine Konformationsänderung und können dadurch mit einem heterotrimeren G-Proteinkomplex koppeln, der durch diese Interaktion seinerseits aktiviert wird. Dieser Komplex dissoziiert nachfolgend in die  $G_\alpha$ - und  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten, die die Aktivität verschiedener Effektormoleküle in der Zelle modulieren. So kontrollieren  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren die Aktivität der membranständigen Adenylatzyklase durch Wechselwirkung mit stimulierenden ( $G_s$ ) oder inhibitorischen ( $G_i$ ) G-Proteinen.

Im Herzmuskel werden drei verschiedene Isoformen ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ ) des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors exprimiert. Während über die Funktion der  $\beta_3$ -Rezeptoren noch keine eindeutigen Ergebnisse vorliegen, ist für die anderen beiden Isoformen gezeigt, daß das Verhältnis  $\beta_1/\beta_2$  in humanen Kardiomyozyten zugunsten der  $\beta_1$ -Rezeptoren verschoben ist. Krankheitsbedingt kann sich dieses Verhältnis verändern. Beim chronischen Herzversagen ist die Anzahl an  $\beta_1$ -Rezeptoren deutlich verringert und liegt unter der der  $\beta_2$ -Rezeptoren (Bristow et al., 1986). Der verminderten Leistungskraft des erkrankten Herzmuskels wird durch eine vermehrte Katecholaminausschüttung gegengesteuert. Die dauerhaft erhöhte Konzentration von Katecholaminen im Blut bewirkt aber eine Desensibilisierung und Herunterregulation der  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren (siehe Übersichtsartikel von Bristow (1998)).

Die Verminderung der Anzahl stimulierbarer  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren hat Auswirkungen auf die Phosphorylierung intrazellulärer Substrate, die für die Kontraktionsleistung des Myokards wichtig sind. Denn die vorhandenen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren können die andere Rezeptorisoform in ihrer Funktion nicht ersetzen. Die durch  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren vermittelte Signalkaskade wirkt auf zytoplasmatische Proteine und aktiviert Proteinkinase A, die dort Substrate wie Phospholamban oder Troponin I phosphoryliert und damit an der Erhöhung der Kontraktionskraft des Herzmuskels beteiligt ist. Der Weg der über die Aktivierung der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren verlaufenden Signalkaskade führt nicht in das Zytoplasma hinein, sondern bleibt lokal beschränkt und wirkt auf die Typ-L-Kalziumkanäle in der Plasmamembran (Xiao et al., 1994, 1999). Die Ursache hierfür liegt in der Schaffung von Mikrodomänen, in denen in Zellmembrannähe die Komponenten zusammengeführt werden, die für die Regulation des Kalziumioneneinstroms in die Zelle während der Muskelaktivität nötig sind.

Die bei den HCM-Patienten beobachtete Verminderung der PKA-vermittelten Phos-

phorylierung des Myomesins (vgl. Abbildung 3.9) kann mehrere verschiedene Ursachen haben. Zur Behandlung der Hypertrophen Kardiomyopathie gehörte unter anderem die Gabe von  $\beta$ -Blockern, Medikamenten, die  $\beta$ -Rezeptoren inhibieren. Damit sollte die krankheitsbedingt gesteigerte Katecholaminausschüttung kompensiert werden. Durch diese Behandlung kann die Überregulation des  $\beta$ -adrenergen Systems wieder rückgängig gemacht werden. Die Blockierung der  $\beta$ -adrenergen Stimulation könnte die Phosphorylierung des Myomesins durch PKA vermindert haben. Die beobachteten Unterschiede in der Menge an phosphoryliertem Myomesin sind demnach nicht Folge der Hypertrophen Kardiomyopathie, sondern der medikamentösen Behandlung. Durch die Gabe von  $\beta$ -Blockern könnten krankheitsbedingte Einflüsse auf die für die Phosphorylierung des Myomesins verantwortliche(n) Signalkaskade(n) zudem maskiert werden. Die Analyse der Phosphorylierungsereignisse an Serin 618 kann in einem HCM-Tiermodell zur Untersuchung dieser Frage herangezogen werden. Die Behandlung der Tiere läßt sich genau den Erfordernissen des Experimentes anpassen und in Extrakten des Herzmuskelgewebes ließe sich phosphoryliertes Myomesin mit dem in dieser Arbeit vorgestellten monoklonalen Antikörper analysieren.

### 4.3 Kreatinkinase bindet an Myomesin und nicht an Titin

Die Analyse der M-Bande mittels Immunelektronenmikroskopie brachte schon früh Hinweise auf eine Lokalisation der muskelspezifischen Kreatinkinase im Bereich der M4/4'-Linie (Wallimann et al., 1983; Strehler et al., 1983). Die Funktion des Enzyms MM-CK ist die rasche Regenerierung von ATP durch Phosphatgruppentransfer von Phosphokreatin auf ADP während einer erhöhten Muskeltätigkeit.

In allen bisher untersuchten Muskelfasern wurde, selbst wenn die M1-Linie fehlte, die M4/4'-Linie nachgewiesen. Es war deshalb klar, daß die MM-CK ein konstitutiver Bestandteil der M-Bande ist. Unklar blieb aber die Funktion dieses Proteins für die M-Bandenstruktur, da die MM-CK entweder an Strukturproteine in der M-Bande gebunden sein könnte oder neben der enzymatischen noch eine strukturelle Funktion ausübt, indem Myosinfilamente direkt verbindet.

Durch Hefedoppelhybridexperimente und biochemische Versuche konnte gezeigt werden, daß die MM-CK *in vitro* an die Domänen 7–8 von Myomesin und die Domänen 6–8 von M-Protein bindet (Hornemann et al., 2003). Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten ergab eine stärkere Bindung zwischen Myomesin und der MM-CK.

Als weiterer möglicher Bindungspartner der MM-CK in der M-Bande wäre aber auch Titin denkbar, dessen Carboxytermini die M1-Linie von beiden Seiten der Sarkomere kommend überqueren. Die Immunglobulindomänen m1–m3 am carboxyterminalen Ende des Titins liegen in der Nähe der M4/4'-Linie und mußten daher als möglicher Bindungspartner der MM-CK in der M-Bande in betracht gezogen werden.

Mit einem gezielten Hefendoppelhybridexperiment konnte die Interaktion zwischen dem Myomesinfragment My6–8 und der MM-CK belegt und eine Wechselwirkung der MM-CK mit Titin-Immunglobulindomänen aus vier verschiedenen Regionen der Sarkomere ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 3.4). Myomesin kommt in allen Muskelfasertypen vor, in denen auch Kreatinkinase in Form der M4/M4'-Linie nachweisbar ist. Für die Immobilisierung der MM-CK in der M-Bande wird Myomesin daher der entscheidende Bindungspartner sein.

Neben der MM-CK konnte in der M-Bande das Enzym  $\beta$ -Enolase identifiziert werden (Foucault et al., 1999). Die Fixierung nicht nur eines in den Energiestoffwechsel der Muskelzelle involvierten Enzyms im Bereich der M-Bande kann als ein Prinzip interpretiert werden, Enzyme, deren Produkte wieder Substrate für andere Enzyme darstellen, die an dem gleichen Stoffwechselprozeß beteiligte, in dichter räumlicher Nähe zu halten, um die Herstellung eines bestimmten Produktes in sehr kurzer Zeit zu ermöglichen. Dieser als *substrate channeling* bezeichnete Vorgang könnte durch die transiente Interaktion, die die  $\beta$ -Enolase mit der Pyruvatkinase einzugehen vermag, in der M-Bande wichtige glykolytische Enzyme mit der MM-CK koppeln und so für eine schnelle Nachführung von ATP in der zentralen M-Bande verantwortlich sein (Foucault et al., 1999).

## 4.4 Myomesin bildet *in vitro* Dimere

Im Rahmen der Suche nach neuen Bindungspartner des humanen Myomesins wurde die Dimerisierung dieses M-Bandenproteins entdeckt. Die biochemische Analyse der Selbstassoziation rekombinanter Myomesinfragmente führte zu der Charakterisierung der letzten Domäne in Myomesin, Domäne 13, als das allein ausreichende Dimerisierungsmodul.

Interessanterweise konnte auch eine deutlich schwächere Interaktion zwischen Myomesinfragmenten ohne Domäne 13 beobachtet werden, wenn Domäne 12 enthalten war. Diese Situation ähnelt der Dimerisierung des Z-Bandenproteins Filamin, das ebenfalls vermittelt durch die letzte carboxyterminale Ig-Domäne im Molekül dimerisiert, aber *in vitro* eine stärkere Interaktion rekombinanter Proteinfragmente zeigt, wenn die Linker-Sequenz und

die vorletzte Ig-Domäne vorhanden sind (Himmel et al., 2003). Gründe hierfür könnten eine Strukturstabilisierung einzelner Ig-Domänen in einem größeren Kontext sein. Auch ein kooperativer Bindungsmechanismus wäre denkbar, bei dem sich die Domänen 12 und 13 teilweise überlappen und so das Dimerisierungsmodul am Carboxyterminus bilden. Durch die Anwendung von Fluoreszenztechniken konnte weiterhin gezeigt werden, daß Myomesin wahrscheinlich antiparallel dimerisiert (Lange et al., 2005).

Das Modell zum molekularen Aufbau der zentralen M-Bande aus Obermann et al. (1997), das die Anordnung verschiedener Domänen der M-Bandenproteine Myomesin, M-Protein und Titin beschreibt, diente als Grundlage für die Konstruktion des dreidimensionalen M-Bandenmodells. Die bereits bekannten Daten wurden um die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Dimerisierung von Myomesin erweitert. Damit ergab sich erstmals die Möglichkeit, einen Modellvorschlag zu entwickeln, der die *räumliche* Anordnung ausgewählter Proteine in der zentralen M-Bande unter Einbeziehung der elektronenmikroskopischen Daten und der Ergebnisse biochemischer Bindungsstudien beschreibt. Dieses räumliche Modell<sup>1</sup> ist in Abbildung 4.1 wiedergegeben.

Myomesin bindet in diesem Modell mit der Kopfdomäne an die parallel verlaufenden Myosinfilamente etwas außerhalb der M4/M4'-Linien und die Carboxytermini von zwei Myomesinmolekülen dimerisieren antiparallel in Höhe der M1-Linie. In diesem Modell erstrecken sich die Carboxytermini von zwei gegenläufigen Titinmolekülen in die M-Bande hinein und weisen einen räumlichen Abstand zu den Myosinfilamenten auf. Myomesin bindet mit den Domänen My4–6 an die Ig-Domäne m4 des Titins. An dieser Stelle könnte durch die beiden aneinander gebundenen Proteine die Elektronendichte höher sein als in der Umgebung. Das könnte das Aussehen der M-Filamente mit ihren zentralen Verdickungen (siehe Abbildung 1.3) plausibel erklären.

Die Myosinfilamente wurden in das dreidimensionale Modell als Zylinder eingezeichnet, da keine Daten über ihre genaue Struktur im Bereich der zentralen M-Bande vorliegen. Eine Vorstellung ist, daß sich die antiparallelen Myosin Rods umeinander winden und von der M4- zur M4'-Linie eine Drehung um 40 ° vollziehen (siehe Luther et al. (1981) und das darin gezeigte räumliche Modell). Der Einfluß einer solchen Konformation auf die Bindung des Myomesinkopfes an die Myosinfilamente ist unbekannt, aber es entstünden möglicherweise genau in der Mitte der M-Bande andere Ladungsverteilungsmuster auf der Oberfläche der Myosinfilamente, die elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Myomesinkopf ermöglichen, als wenn die Myosinschäfte geradlinig die M-Bande durchzögen. Vielleicht wird auf

---

<sup>1</sup>Das Modell wurde von Stephan Lange erstellt.

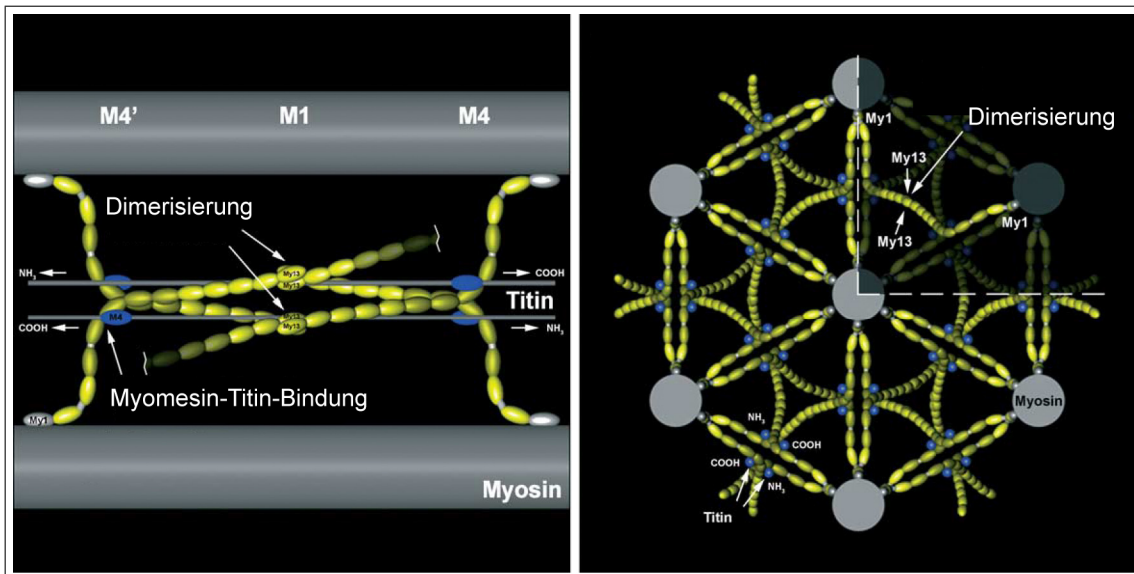


Abbildung 4.1: **Molekulares Modell der zentralen M-Bande.** **A.** Ein Längsschnitt durch die M-Bande zeigt die Position der Myomesindimere, die dort die M1-Linie kreuzen und benachbarte Myosinfilamente vernetzen. Die antiparallelen Carboxytermini von zwei Titinmolekülen sind ebenfalls eingezeichnet, an deren Domäne m4 (blau markiert) Myomesin 4–6 bindet. Die Interaktion zwischen Myomesin My7–8 und der MM-CK ist nicht eingezeichnet. **B.** Im Querschnitt ist die hexagonale Anordnung der Myosinfilamente und die zwischen ihnen verlaufenden Myomesindimere zu sehen. Rechts oben sind bei einem Myomesindimer die Positionen der Aminotermini (My1) und der Carboxytermini (My13) hervorgehoben. Entnommen aus (Lange et al., 2005).

diese Weise die genaue Positionierung des Myomesins im Zentrum der M-Bande festgelegt.

Nach dem M-Bandenmodell von Varriano-Marston et al. (1984) könnten Myomesin und Titin aber dichter am Myosinfilament lokalisiert sein und die von den Autoren beschriebene Proteinhülle um die dicken Filamente darstellen. In diesem Fall wäre eine direkte Wechselwirkung der carboxyterminalen Myosinbindungsstelle My12 des Myomesins mit den Myosinfilamenten möglich.

Im Gegensatz zu Myomesin dimerisiert das nah verwandte M-Protein offenbar nicht durch Wechselwirkung der Carboxytermini (Lange et al., 2005). Allerdings liegt trotz der gleichen Domänenorganisation die Sequenzidentität zwischen Myomesin und M-Protein nur bei etwa 45 %, wie ein Vergleich der beiden letzten Ig-Domänen von Myomesin und M-Protein zeigt (siehe Abbildung 4.2).

Für die Faltung einer Ig-Domäne sind nur wenige konservierte Aminosäuren an bestimmten Positionen notwendig, die Ausbildung der gleichen Sekundärstrukturen in Myomesin und M-Protein ist demnach leicht erklärbar. Für die Myomesindomäne My13 wurde der  $\beta$ -Faltungstyp experimentell bestätigt (siehe Abbildung 3.25), über Faltung der

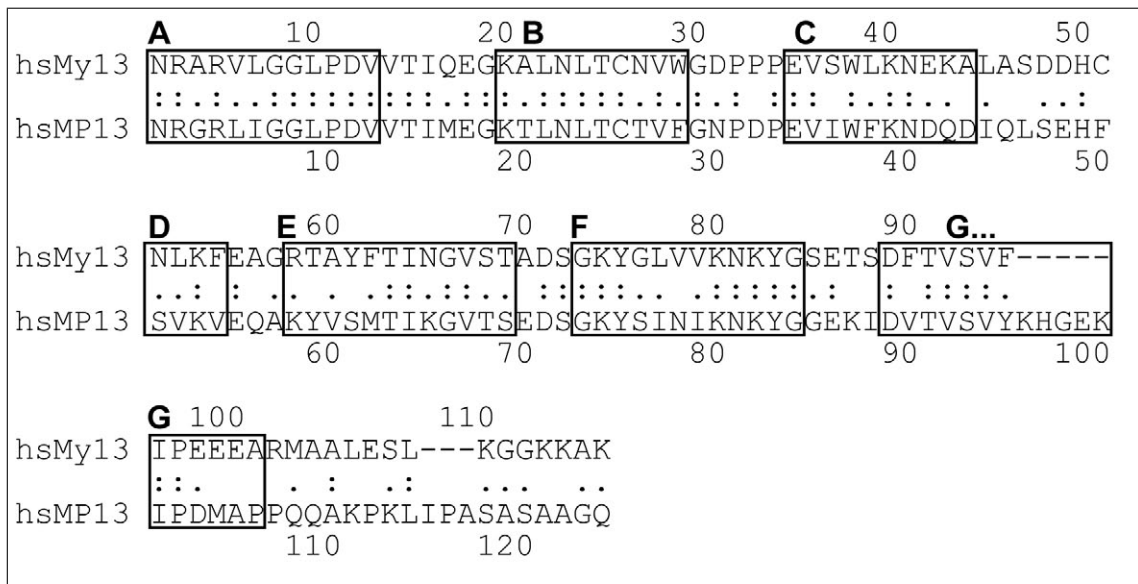


Abbildung 4.2: Die carboxyterminalen Domänen 13 von Myomesin und M-Protein weisen Sequenzunterschiede auf. Die letzte Ig-Domäne des humanen (hs) Myomesins (My) und M-Proteins (Mp) unterscheiden sich in ihrer Primärsequenz. Die Sequenzidentität zwischen beiden Domänen beträgt 45 % und die Ähnlichkeit 65 %. Die Position der  $\beta$ -Stränge ist eingezeichnet. Gleiche Aminosäuren sind durch zwei Punkte, ähnliche mit einem Punkt markiert und nicht identische Aminosäuren sind durch Striche angedeutet. Die Nummerierung bezieht sich nur auf die Domänen 13.

Domäne 13 des M-Proteins liegen bisher noch keine experimentellen Daten vor.

Im Gegensatz dazu hängen Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung von Domänen des Immunglobulin-Faltungsmotives von den variablen Aminosäuren ab, die unterschiedliche Bindungsmotive auf der Oberfläche einer solchen Domäne erzeugen können. Eine Ligandenbindung an die Linker-Sequenzen in My2–3 bzw. My4–5 ist ebenfalls möglich, wie am Beispiel der Myomesin-PKA-Interaktion gezeigt.

Die Dimerisierung des Myomesins könnte im Verlauf der Myofibrillogenese eine entscheidende Rolle bei der Quervernetzung der Carboxytermini des Titins spielen. Nach Assemblierung der *dense bodies*, den Vorläuferstrukturen der Z-Banden, werden die dort verankerten Aminotermini von Titin ausgerichtet, wie durch die Umorganisation von Titin-epitopen während der Myofibrillogenese gezeigt wurde (Fürst et al., 1989). Darauf folgt die Entfaltung und Organisation der Carboxytermini von Titin, die sich von zwei benachbarten *dense bodies* aufeinander zu bewegen bzw. durch die Kraft von Motorproteinen bewegt werden. Der Mechanismus der Entfaltung und Ausrichtung des Titinmoleküles ist bisher nicht bekannt. Mögliche Bindungspartner wären MURF-2, das als Adapter für Myosin, Titin und das Mikrotubulussystem während der Myofibrillogenese fungieren könnte (McElhinny et al., 2004), und Obscurin, das zu frühen Zeitpunkten der Myofibrillogene auftritt und an

der Verankerung der A-Banden in die naszierende Myofibrille beteiligt sein könnte (Borisov et al., 2004). Systematische Untersuchungen dieser transienten Proteininteraktionen stehen erst am Anfang, aber die Beobachtung, daß eine gezielte Herunterregulation von MURF-2 in kultivierten Zellen einen negativen Effekt auf die Sarkomerstabilität und dabei das Verteilungsmuster des endogenen Myomesins beeinflussen (McElhinny et al., 2004), lassen neue interessante Erkenntnisse über die Proteinmaschinerie erwarten, die an der Assemblierung der Myofibrillen beteiligt sind.

In der naszierenden M-Bande überlappen sich die antiparallel ausgerichteten Carboxytermini der Titinmoleküle (Ehler et al., 1999).

Myomesin tritt in *non-striated myofibrils* (NSMF) mit einem punktförmigen Verteilungsmuster auf, wobei die Abstände zwischen diesen Punkten in etwa bereits denen entsprechen, die die M-Banden in der reifen Myofibrille haben (van der Ven et al., 1999). Myomesindimere könnten in diesem Stadium an der Verankerung antiparalleler Titinmoleküle in der entstehenden M-Bande beteiligt sein. Ohne die M-Bandenregion des Titins ist die Assemblierung der Myofibrille gestört und Myomesin und MyBP-C kolokalisieren nicht mit den Myosinfilamenten im Zytoplasma einer Zelle, die nur eine extrem trunkierte Variante des Titins exprimiert (van der Ven et al., 1999). Die Interaktion zwischen Titin und Myomesin könnte daher für die Bestimmung der zukünftigen Position der M-Bande wichtig sein und sie ermöglicht den Einbau der Myosinfilamente in die Myofibrille.

Da diese Myomesin-Titin-Interaktion durch Phosphorylierung des Myomesins durch PKA blockiert werden kann, liegt die Funktion dieser Phosphorylierung möglicherweise in der Regulation des Zusammenbaus der M-Bande in diesem frühen Stadium der Myofibrillogenese. Erst wenn die Titincarboxytermini in Nachbarschaft zu ihrer Bindungsstelle in Myomesin stehen könnte die Phosphorylierung durch Proteinphosphatasen aufgehoben werden. Damit ließe sich der Zeitpunkt der Interaktion beider Moleküle definieren.

Die Phosphorylierung des Myomesins könnte stimuliert werden, wenn Umbauprozesse der Myofibrille die Aufhebung der M-Bandstruktur erfordern. Bei pathologischen Zustandsveränderungen wäre der Phosphorylierungsstatus des Myomesins ein Indikator für diese Prozesse.

Hinweise auf eine Beeinflussung der Dimerisierung des Myomesin durch Phosphorylierungsereignisse in Domäne 13 ergeben sich bisher nicht, da sowohl das phosphorylierte als auch das nicht phosphorylierte Myomesinfragment My13 *in vitro* dimerisierte (vgl. Abbildung 3.15). Eine Regulation der Myomesindimerisierung *in vivo* durch Phosphorylierungsereignisse am Carboxyterminus des Moleküls kann aber nicht ausgeschlossen werden.

## 4.5 Myomesin kann durch zwei Bindungsstellen mit Myosin interagieren

In dieser Arbeit gelang erstmals der direkte Nachweis, daß die aminoternale Kopfdomäne allein ausreichend für eine Bindung an Myosin ist (vgl. Abbildung 3.16). Die Verwendung carboxyterminaler Myomesinfragmente als Kontrolle führte zu der Entdeckung einer weiteren Myosinbindungsstelle, die auf die Domäne 12 eingegrenzt werden konnte (siehe Abbildung 3.17).

In transfizierten Nichtmuskelzellen wurden rekombinante Myosinfilamente durch Myomesinfragmente quervernetzt. Eine Quervernetzung des Myosins war mit dem mindestens die Domänen 13 (Dimerisierung) und 12 (Myosinbindung) erforderlich, und das kürzeste Myomesinfragment, das untersucht wurde, enthielt zusätzlich Domäne 11 (siehe 3.5.3 und Abbildung 3.21). Mit den hier vorgestellten Experimenten konnten die Bildung von Myomesindimeren in transfizierten Zellen und das Vorliegen einer zweiten Myosinbindungsstelle im Myomesincarboxyterminus durch das Auftreten der Myosinkabel in den Zellen eindeutig bestätigt werden.

Damit verfügt der Myomesincarboxyterminus interessanterweise über die gleichen Eigenschaften wie MyBP-C, das einen ähnlichen strukturellen Aufbau von alternierenden Ig- und FN-Domänen hat und ebenfalls Myosin bindet (Flashman et al., 2004).

Experimente zur Untersuchung der Myosinbindung von Myomesin in vorausgegangenen Arbeiten wurden nur mit dem Myomesinfragment My9–13 durchgeführt, das *in vitro* keine Interaktion mit Myosin einging (Obermann et al., 1997). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Bindungsversuche deuten jedoch darauf hin, daß die Dimerisierungsdomäne My13 die Bindung von My12 an immobilisiertes Myosin blockiert (vgl. Abbildung 3.17). Die Domäne My11 stört dagegen die Myosin-Myomesin-Interaktion nicht (vgl. Abbildung 3.16). Die carboxyterminale Myosinbindungsstelle mußte demnach in der Bindungsversuchen von Obermann et al. (1997) mit My9–13 verborgen bleiben.

Da die Dimerisierungsdomäne My13 die Bindung der Domäne My12 an Myosin *in vitro* verhindert, existieren in der Zelle offenbar Regulationsmöglichkeiten, die die gleichzeitige Ausnützung beider Funktionalitäten je nach den Erfordernissen zulassen oder verhindern. Möglicherweise wird die kryptische Myosinbindungsstelle am carboxyterminalen Ende des Myomesins nur zur bestimmten Zeitpunkt aktiviert. Das könnten Ereignisse im Verlaufe der Myofibrillogenese sein, zu denen die bereits fertig assembliert vorliegenden Myosinfilamente in die naszierende Myofibrille eingebaut werden. Myomesin ist durch die Wech-



selwirkung mit Titin an der Stelle der reifenden Myofibrille verankert, die der Position des Zentrums der zukünftigen M-Bande und damit dem Zentrum der *bar zone* der Myosinfilamente entspricht. Die Funktion der carboxyterminalen Myosinbindungsstelle könnte das Binden und Heranführen von Myosinfilamenten sein, die dann durch die Interaktion mit der Myomesinkopfdomäne in der M-Bande fixiert werden. Wenn die M-Bande weitgehend assembliert ist, könnte die carboxyterminale Myosinbindung wieder aufgehoben werden. Myomesindimere verankern dann Myosin am Titinfilamentsystem der Sarkomere. Mit überexprimierten Myomesinkonstrukten, bei denen durch zielgerichtete Mutation die Myosinbindung in Domäne 12 aufgehoben wurde, könnten in Muskelzellen die Auswirkungen dieser fehlenden Protein-Protein-Interaktion auf die Myofibrillogenese untersucht werden.

Die Abbildung 4.3 gibt einen Überblick über die Interaktionen, die Myomesin mit anderen Proteinen eingehen kann. Die Dimerisierung des Myomesinmoleküls dürfte von zentraler Bedeutung für den Aufbau der M-Bande sein, die spiegelsymmetrisch ist, d. h., daß die M1-Linie auf der linken wie auf der rechten Seite von den gleichen Strukturen, sichtbar durch die M-Linien, umgeben ist. Ein antiparallel dimerisierendes Molekül als Adapter stellt für den Aufbau einer solchen Struktur die ideale Voraussetzung dar.

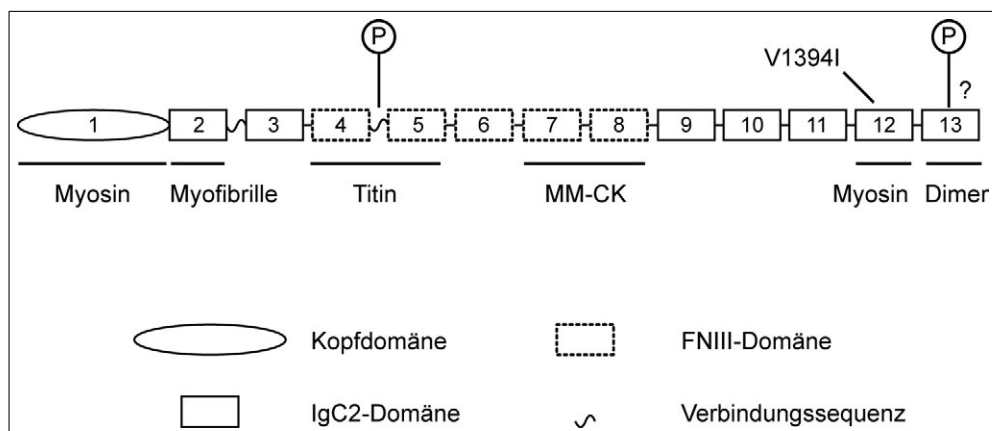


Abbildung 4.3: **Schematische Darstellung der etablierten und der neuen Bindungspartner des humanen Myomesins.** Myomesin ist Teil der M-Bandenstruktur, aber auch ein Adaptermolekül, das Proteine mit unterschiedlichen Funktionen in der M-Bande fixiert. Das Schema gibt die Lokalisation von Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb des Myomesinmoleküls wieder. Die in Domäne My13 phosphorylierten Aminosäuren sind bisher nicht bekannt.

## 4.6 Eine Änderung der Eigenschaften des mutierten Myomesins ist *in vitro* nicht nachweisbar

Myomesin wird in allen Muskelfasertypen exprimiert und scheint daher wegen seiner ubiquitären Verteilung eine wichtige Funktion für die Sarkomere zu haben. Daher lag es nahe, nach Mutationen im Myomesingen zu suchen, die wahrscheinlich krankheitsauslösend sein würden. Durch systematische Reihenuntersuchungen bestimmter Kandidatengene für eine HCM wurde die erste bisher bekannte Mutation im Myomesingen entdeckt. Es handelte sich dabei nur um einen konservativen Aminosäureaustausch, dessen in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Die bei den HCM-Patienten gefundene Punktmutation führte zu einem konservativem Aminosäureaustausch von Valin nach Isoleuzin an einer Position in Domäne 12, die in Myomesin aus verschiedenen Spezies ausschließlich einen Valinrest aufweist.

### 4.6.1 Faltung der mutierten Domäne 12

Die Analyse der Sekundärstruktur ergab keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp, wie mittels CD-Spektroskopie gezeigt wurde (siehe 3.6.1). Ein Sequenzvergleich der Domäne 12 von verschiedenen Spezies zeigt den hohen Anteil an identischen Aminosäuren, zu denen auch Valin 1394 gehört.

Das immunglobulinähnliche Faltungsmuster umfaßt eine Domäne von ungefähr 100 Aminosäuren Länge und ist eines der häufigsten Strukturelemente und tritt in Proteinen auf, die verschiedene Lokalisationen und Funktionen haben. Darunter finden sich neben den Immunglobulinen Vertreter der extrazellulären Matrix (z. B. Fibronectin), Zelloberflächenrezeptoren (z. B. CD2), einige Enzyme (z. B. Myosin Leichte Kette Kinase) und Zytoskelettproteine (z. B. Filamin). Diese Proteine gehören zur Immunglobulin-Superfamilie deren Mitglieder anhand ähnlicher Sequenzen eingeordnet werden (Bork et al., 1994).

Bei allen Ig-Domänen ist der prinzipielle Aufbau gleich: Zwei antiparallele  $\beta$ -Blätter sind gegeneinander gepackt, die eine Anzahl von bis zu 11  $\beta$ -Strängen haben. Die Position der peripher gelegenen Stränge kann verschieden sein, aber das Zentrum der Domäne, der hydrophobe Kern, wird durch die  $\beta$ -Stränge B und E in dem einen  $\beta$ -Blatt und durch die Stränge C, F und G in dem anderen Blatt gebildet. Beide Blätter werden durch Schleifen zwischen den Strängen B und C sowie E und F miteinander verbunden. Die Stabilisierung dieser Struktur erfolgt durch die Ausbildung des hydrophoben Kerns und durch Wasser-

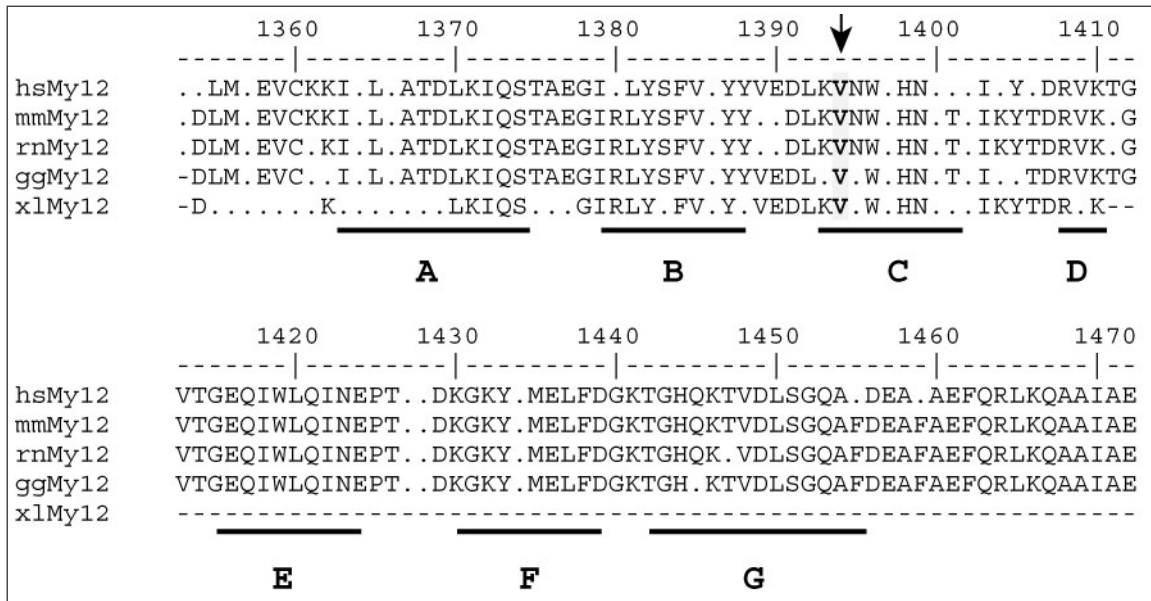


Abbildung 4.4: **In Myomesin aus verschiedenen Spezies ist Valin 1394 hoch konserviert.** Der dargestellte Sequenzvergleich zwischen der Aminosäuresequenz der Domäne 12 von Myomesinen aus Mensch (hs), Maus, (mm), Ratte (rn), Huhn (gg) und Krallenfrosch (xl) zeigt die konservierten Aminosäuren. Ähnliche Aminosäuren werden durch Punkte, voneinander abweichende durch Striche markiert. Es ist deutlich zu sehen, daß Valin 1394, das bei den untersuchten HCM-Patienten durch Punktmutation gegen Isoleuzin ausgetauscht ist, hoch konserviert ist (siehe Pfeil). Die angegebene Position der Aminosäuren bezieht sich auf humanes Myomesin, zusätzlich ist die wahrscheinliche Lage der  $\beta$ -Stränge A–G eingezeichnet. Die Sequenz für Myomesin aus dem Krallenfrosch ist nicht vollständig verfügbar (angedeutet durch Striche).

stoffbrückenbindungen zwischen den Strängen. In Abbildung 4.5 wird die Struktur einer Immunglobulindomäne exemplarisch am Beispiel der Titin-Domäne I27 wiedergegeben.

Der Amino- und Carboxyterminus befinden sich am Anfang und am Ende der Ig-Domäne, sodaß durch Aneinanderreihung einzelner Ig-Domänen eine lineare Molekülstruktur entstehen kann, die der Überbrückung größerer räumlicher Abstände bei der Verbindung verschiedener, z. B. mit dem Zytoskelett assoziierter Proteine, dient.

Die bei den HCM-Patienten gefundene Punktmutation hätte durch den Wechsel von Valin zu Isoleuzin die Faltung der Domäne 12 des Myomesins beeinflussen können, da die räumliche Ausdehnung dieser Seitenkette eine andere ist als die des Valins. Die Faltung einer Ig-Domäne hängt von der Bildung eines Faltungskerns ab, der das hydrophobe Innere der Ig-Domäne entstehen läßt, in dem dann bestimmte aromatische und hydrophobe Seitenketten miteinander in Wechselwirkung treten. Für die Ig-Domäne I27 des Titins konnte durch NMR-Spektroskopie ihre Struktur und der Aufbau des hydrophoben Kerns bestimmt werden (Improta et al., 1996). Abbildung 4.6 zeigt diese Struktur.

Die Sekundärstruktur der mutierten Immunglobulindomäne My12 wurde überprüft,

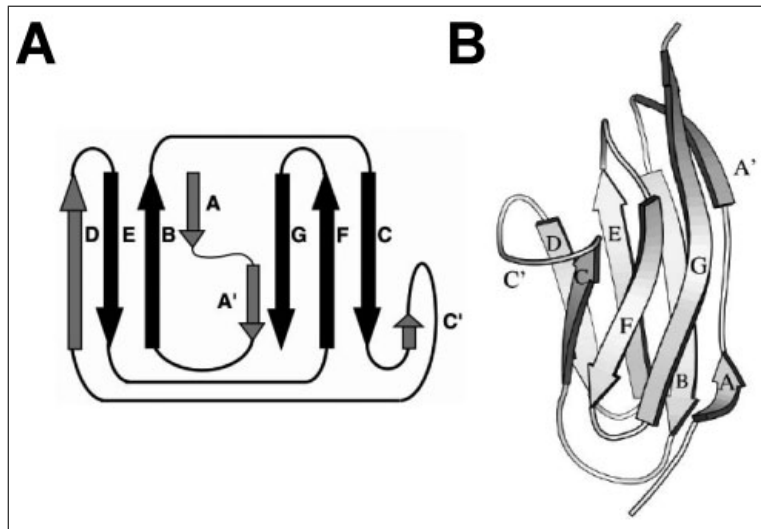


Abbildung 4.5: **Die Struktur einer Ig-Domäne wird am Beispiel des Titins gezeigt.** Die Immunglobulin-domäne I27 des Titinmoleküls liegt im I-Bandenbereich und wird dem Typ Ig I (*intermediate*) zugeordnet. Die Anzahl der  $\beta$ -Stränge einer Ig-Domäne unterscheidet sich von der für Myomesin vorhergesagten durch die zusätzlichen  $\beta$ -Stränge A' und C'. **A.** Die Polypeptidkette verläuft vor und zurück durch die beiden  $\beta$ -Blätter der Ig-Domäne, deren  $\beta$ -Stränge (Pfeilsymbole) durch Schleifen verbunden sind. **B.** In der räumlichen Darstellung der Ig-Domänenstruktur sind die am Anfang (unten) und Ende (oben) der Domäne gelegenen Amino- und Carboxytermini zu sehen. Entnommen aus Fowler und Clarke (2001).

weil eine veränderte Faltung dieses Myomesinabschnitts als mögliche molekulare Krankheitsursache nicht auszuschließen war. Die biochemischen Bindungsversuche mit der mutierten Domäne My12 und Myosin erbrachten keine eindeutigen Hinweise eine gestörte Interaktion zwischen diesen beiden Muskelproteinen (vgl. Abbildung 3.26). Weiterführende Experimente mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz könnten die Dissoziationskonstanten von Wildtyp und Mutante des Myomesinfragmentes My12, die an immobilisiertes Myosin gebunden wurden, bestimmt und verglichen werden. Mit dieser Methode ließe sich überprüfen, ob der Aminosäureaustausch Valin 1394 zu Isoleuzin die Bindung von Myomesin an Myosin nicht vollständig verschwinden läßt, sondern ursächlich für eine schwächere Interaktion zwischen beiden Bindungspartnern ist. Die Hypertrophe Kardiomyopathie würde sich dann als Langzeitfolge dieser geschwächten Protein-Protein-Wechselwirkung präsentieren.

Die im Rahmen der Untersuchung von Wildtyp und Mutante des Myomesins gewonnenen spektroskopischen Daten belegen erstmals direkt die Sekundärstrukturvorhersage für den Carboxyterminus von Myomesin. Dabei konnte ein Unterschied zwischen den CD-Spektren der Domäne My12 und My13 festgestellt werden (siehe Abbildung 3.25), denn in dem Spektrum von My12 erscheint ein zusätzliches Maximum bei einer Wellenlänge



Abbildung 4.6: **Aromatische und hydrophobe Seitenketten interagieren im Kern einer Ig-Domäne.** Bestimmte aromatische und hydrophobe Seitenketten ragen in das Innere *core* einer Ig-Domäne und treten dort in Wechselwirkung. Die hier gezeigte Struktur wurde für die Titindomäne I27 ermittelt. Entommen aus Fowler und Clarke (2001).

von 202 nm. Für diese Abweichung der beiden Spektren könnte eine starke Absorption des zirkular polarisierten Lichtes durch die aromatischen Aminosäuren (vor allem Tryptophan und Tyrosin) in Domäne verantwortlich sein. In den Domänen My12 und MY13 sind jeweils zwei Tryptophanreste enthalten, daneben weist My13 drei und My12 fünf Tyrosinreste auf. Der molare Extinktionskoeffizient von Tyrosin ( $\epsilon = 1490 M^{-1}cm^{-1}$ ) ist niedriger als der des Tryptophans ( $\epsilon = 5500 M^{-1}cm^{-1}$ ), aber durch vermehrte Interaktionen der aromatischen Aminosäuren in Domäne My12 mit delokalisierten Elektronen von Doppelbindungen benachbarter Reste könnten die Aromaten in My12 eine stärkere Absorption in diesem Wellenlängenbereich verursachen. Eine andere Faltung der Domäne My12 als My13 kann aus den CD-Messungen nicht gefolgert werden. Durch die Untersuchung der dreidimensionalen Strukturen der Domänen My12 und My13 sollten sich diese subtilen Unterschiede in der Anordnung der Aminosäuren und der Anzahl ihrer Wechselwirkungen (durch Wasserstoffbrücken beispielsweise) untereinander erklären lassen.

Für eine weitergehende Analyse der Myomesinmutation wäre einmal die Erstellung eines größeren Stammbaums der betroffenen Familie wünschenswert, um die genetische Ursache der HCM statistisch eindeutig zu belegen. Die proteinbiochemische Analyse des mutierten Myomesins könnte durch die Untersuchung von Biopsiematerial der Frage nachgehen, ob die Proteinmengen von Myomesin im Vergleich zu Referenzproteinen aus dem Myokard ( $\alpha$ -Aktinin, MyBP-C) und der Menge an Myomesin in den Proben gesunder Herzen verändert ist und ob bei den Patientenproben eine stärkere carboxyterminale Proteolyse von Myomesin zu beobachten ist. Das wäre ein Hinweis auf die Expression des mutierten Myomesins, das möglicherweise sogar in die M-Bande eingebaut wird, dort aber seine Funktion nicht oder nur unzureichend erfüllen kann.

Eine molekularbiologische Erklärung für den Einfluß der Mutation im Myomesingen konnte mit den in dieser Arbeit vorgestellten Myomesinminigenen nicht gefunden werden. Der Verlust des mutierten Exons kann für das *in vivo* auftretende Transkript des Myomesingens aber nicht ausgeschlossen werden. Für den hier verwendeten *in vitro* Ansatz, nach Transfektion der Minigenkonstrukte das Spleißen von Wildtyp und Mutante in Zellen zu vergleichen, konnte nicht auf kultivierte Kardiomyozyten zurückgegriffen werden. Dies hätte die mRNA-Prozessierung unter Einwirkung gewebsspezifischer Faktoren und in einer bereits differenzierten Muskelzelle ermöglicht.

#### 4.6.2 Myomesinminigene

Die Hypothese einer molekularbiologischen Auswirkung der Punktmutation in Exon 32 des humanen Myomesingens ließ sich mit dem hier beschriebenen experimentellen Ansatz nicht belegen. Anhand der Vorhersage von ESE-Motiven in Exon 32 war die Zerstörung eines solchen *exonic splicing enhancers* aber nicht auszuschließen. Mit den Myomesinminigenkonstrukten konnte aber eindeutig gezeigt werden, daß die Punktmutation das Spleißen des mutierten Transkriptes nicht beeinflußt.

Wahrscheinlich liegt in dem betroffenen Sequenzabschnitt kein ESE, der für das korrekte Spleißen des Exons 32 benötigt wird. Zudem wurde durch die Mutation ein neues ESE-Motiv erzeugt (vgl. 3.27). Eine Störung der Transkription des Myomesingens kann daher ausgeschlossen werden.

Ein gewebsspezifisches Spleißen des Myomesingenes wäre denkbar, aus diesem Grund wurden parallel zwei verschiedene Zelltypen mit den Myomesinminigenen transfiziert. Eine unterschiedliche Prozessierung der mRNA dieser Minigene konnte nicht beobachtet werden. Die Verwendung von Kardiomyozyten für die Untersuchung des Spleißens wäre zum ultimativen Ausschluß einer starken Abhängigkeit von gewebsspezifischen Faktoren möglich.

### 4.7 Ausblick

Der Phosphorylierungsstatus des Myomesin kann mit dem neu hergestellten monoklonalen Antikörper in Extrakten oder fixierten Zellen sehr gut beobachtet werden. So könnte in systematischen Reihenuntersuchungen Biopsiematerial von Kardiomyopathie-Patienten analysiert werden. So ist beispielsweise über die Phosphorylierung des Myomesins im Rahmen der Dilatativen Kardiomyopathie ist bisher nichts weiter bekannt. Bei degenerativen

Skelettmuskelerkrankungen könnte sich zeigen, ob der Phosphorylierungsstatus des Myomesins ein Marker für die Disassemblierung der Myofibrille ist.

Die Bindung der Myomesindomänen My1 und My12 an Myosin sollte noch weiter untersucht werden. Mit proteolytischen Fragmenten des Myosins, HMM und LMM, sowie rekombinante Subfragmente von LMM, kann in Blot Overlay Versuchen die Bindungsregion im Myosinmolekül weiter eingegrenzt werden. Interessant wäre es, die Möglichkeit einer Interaktion mit Nichtmuskelmyosin zu untersuchen. Die Rolle dieser Myosinisoform bei der Myofibrillogenese ist bisher nicht genau bekannt. Denkbar ist, dass der für einen späten Zeitpunkt der Myofibrillogenese postulierte Austausch von Nichtmuskel- gegen Muskelmyosin (Sanger et al., 2002, 2000), durch eine promiskuitive Myosinbindung der Myomesindomänen My1 und My12 vermittelt wird. Mit hochauflösender konfokaler Lasermikroskopie kann in differenzierten Muskelzellen die Lokalisation des Myomesins während der Myofibrillogenese genauer untersucht werden. Das Auftreten von Myomesin, Obscurin, MURF2 und dem M-Bandenbereich des Titins wäre auf die Frage hin näher zu untersuchen, welches Protein direkt die Heranführung der Myosinfilamente an das durch Titin vorgegebene Gerüst der Sarkomere bewirkt. Die Bewegung solch großer Proteinkomplexe wie die Myosinfilamente impliziert geradezu die Beteiligung weiterer Motorproteine, vielleicht des Mikrotubulisytems.

Die Phosphorylierung der Kopfdomäne des humanen Myomesins sollte ebenfalls untersucht werden. Es wäre zu überprüfen, ob die Bindung der vollständigen Kopfdomäne an Myosin durch eine Phosphorylierung blockiert werden kann. Mit weiterführenden Experimenten könnten die beteiligte(n) Proteinkinase(n) durch Verwendung von spezifischen Stimulatoren und Inhibitoren verschiedener Proteinkinasen näher charakterisieren helfen. Dann können die vorhergesagten Proteinkinase-Erkennungssequenzen in My1 mit den experimentell gewonnenen Daten überprüfen und so die Anzahl der möglicherweise phosphorylierten Reste eingegrenzen. Da in der Kopfdomäne sehr viele putative Phosphorylierungsstellen vorhanden sind, wäre das eine Voraussetzung, um durch Mutagenese einiger ausgewählter Aminosäuren die Phosphorylierungsstelle(n) in der Domäne My1 sicher zu bestimmen. Mit Zellextrakten als Kinasequelle könnten mögliche Phosphorylierungsereignisse in der Kopfdomäne des Myomesins auf eine Gewebsspezifität (Skelett- oder Herzmuskel) und Entwicklungsabhängigkeit (unterschiedliche Differenzierungsstadien kultivierter Zellen) untersucht werden.

Die Dimerisierung des Myomesins sollte durch eine Röntgenstrukturanalyse von Kristallen des Myomesinkonstruktes My12–13 eingehender untersucht werden. So könnten die an

der Dimerisierung beteiligten Domänen eindeutig identifiziert und die in dieser Arbeit diskutierte Möglichkeit einer kooperativen oder zumindest überlappenden Bindung der Domänen My12 und My13 überprüft werden. Die Auswertung der Kristallstruktur ergäbe auch Hinweise auf die Interaktionsstelle(n) zwischen den Domänen und damit Aufschluß über die Art der Wechselwirkung (hydrophob/hydrophil) zwischen den zwei Myomesincarboxytermini eines Dimers. Diese Daten könnten mit einer Analyse der Phosphorylierungsereignisse in Domäne My13 kombiniert werden.

Die Bedeutung des Myomesins könnte sich an einem *knock-out* Modell genauer untersuchen lassen. Dabei wäre interessant zu sehen, wie die Embryonalentwicklung der transgenen Tiere verläuft, wenn Myomesin nicht exprimiert wird oder wenn nur die Dimerisierungsdomäne bzw. die Domänen My12–My13 in Myomesin fehlen. Das trunkierte Myomesin könnte an Myosin und Titin binden, eine Quervernetzung der Carboxytermini des Titins während der Myofibrillogenese wäre aber nicht möglich. Der Phänotypus der transgenen Tiere könnte helfen, die Funktion von Myomesin besser zu verstehen.



# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die quergestreifte Muskulatur befähigt alle höheren Tiere, sich zielgerichtet fortzubewegen und mechanische Arbeit zu leisten. Die in den Muskelzellen des Bewegungsapparates und des Herzmuskels liegenden Myofibrillen bestehen aus aneinandergereihten kleinsten kontraktilen Einheiten, den Sarkomeren. Jedes Sarkomer enthält dünne Filamente (hauptsächlich Aktin) und dicke Filamente (hauptsächlich Myosin), die durch Wechselwirkung miteinander die Kontraktion des Sarkomers und letztlich des gesamten Muskels bewirken. Die Aktinfilamente sind in den Z-Banden und die Myosinfilamente in der M-Bande verankert.

In vorangegangenen Arbeiten sind vier der bisher bekannten Proteine in der M-Bande, Myomesin, M-Protein, die Kreatinkinase und der carboxyterminale Anteil des Titins, unter dem Aspekt ihrer räumlichen Anordnung in der M-Bande näher untersucht worden. Durch Immunmarkierung und Elektronenmikroskopie konnte die Position einzelner Domänen innerhalb der M-Bande bestimmt und durch biochemische Versuche Protein-Protein-Interaktionen dieser Proteine untereinander belegt werden. Erste Modellvorstellungen beschreiben anhand dieser Daten den Aufbau der sarkomeren M-Bande auf molekularer Ebene.

Im Mittelpunkt der hier vorgelegten Arbeit stand das Muskelprotein Myomesin, das ein zentraler Bestandteil der sarkomeren M-Bande ist und dort an Myosinfilamente bindet. Die Funktion des Myomesins in der M-Bande sollte dabei näher betrachtet werden.

Als Ausgangspunkt wurde die humane Myomesin cDNA am 5'-Ende vervollständigt und eine das gesamte Myomesinmolekül umfassende cDNA hergestellt. Aus den gewonnenen Daten ließ sich erstmals die vollständige Proteinsequenz der aminoterminalen Kopfdomäne des humanen Myomesins bestimmen sowie rekombinante Konstrukte für biochemische Ex-

perimente und Transfektionsstudien herstellen.

Mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden wurden neue Protein-Protein-Wechselwirkungen des Myomesins charakterisiert. Ein Interaktionspartner des Myomesins in der M-Bande ist die muskelspezifische Isoform der Kreatinkinase. Es konnte gezeigt werden, daß Myomesin und nicht Titin an der Verankerung der Kreatinkinase in der M-Bande beteiligt ist.

Die Suche nach weiteren Bindungspartnern des humanen Myomesins deutete auf eine Selbstassoziation im Bereich des Carboxyterminus hin. Mit biochemischen Versuchen konnte eine Dimerisierung des Myomesins eindeutig gezeigt und die letzte Domäne des Moleküls als Dimerisierungsmodul identifiziert werden. Die Dimerisierung war *in vitro* nicht abhängig vom Phosphorylierungszustand dieser Domäne. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde ein verfeinertes molekulares Modell der M-Bande entwickelt.

Proteinbiochemische Experimente und Transfektionsstudien in kultivierten Zellen führten zu der Entdeckung einer zusätzlichen Myosinbindungsstelle am Carboxyterminus des Myomesins. Die Position dieser Bindungsstelle wurde mit rekombinanten Myomesinfragmenten auf die Domäne 12 eingegrenzt. Es wurde daneben erstmals direkt die Bindung der vollständigen Myomesinkopfdomäne an Myosin gezeigt. Die Bindung von Myomesin an Myosin kann demnach an zwei verschiedenen Stellen erfolgen: an der aminoterminalen Kopfdomäne und an der carboxyterminal gelegenen Domäne 12.

Die bereits bekannte Phosphorylierung des Myomesins an Serin 618 durch Proteinkinase A (PKA) *in vitro* wurde hier eingehender in kultivierten Zellen und in Gewebeproben untersucht. Mit biochemischen Experimenten wurde die *in vivo* Phosphorylierung durch PKA unter Verwendung von Stimulatoren und Aktivatoren der PKA eindeutig belegt. Es konnte weiter gezeigt werden, daß diese Phosphorylierung *in vivo* über das  $\beta$ -adrenerge System verläuft.

Mit einem neu hergestellten phosphorylierungsabhängigen Antikörper konnte phosphoryliertes Myomesin in Herzmuskelgewebe und kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Die Menge an phosphoryliertem Myomesin war im Herzmuskel bei Patienten, die an einer Hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) litten, vermindert. Bei dieser Erkrankung wurde zudem eine Reexpression der embryonalen Myomesinisoform in den Muskelzellen beobachtet.

Myomesin könnte bei der Pathogenese der HCM direkt an krankheitsbedingten Veränderungen der Sarkomere und an der verminderten Sarkomerstabilität beteiligt sein. Das Auftreten der embryonalen Myomesinisoform ist möglicherweise ein Marker für den stressbe-

dingten Umbau der Myofibrillen in der Kardiomyozyte als Antwort auf die eigentlich krankheitsauslösende Ursache.

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Myomesin bei der Entwicklung einer HCM wurde durch die genetische Untersuchungen von Erkrankten innerhalb einer Familie erhalten. Die betroffenen Personen wiesen eine Punktmutation im Myomesingen auf, die zu einem konservativem Aminosäureaustausch führte. Die biochemische und biophysikalische Untersuchung der mutierten Domäne 12 ergab aber keine deutlichen Unterschiede im Bindungsverhalten oder der Proteinfaltung. Mit einem anderen Ansatz wurde diese Mutation auf die Frage hin untersucht, ob das Spleißen der mRNA durch Zerstörung eines Kontrollelementes (*exon splicing enhancer*) in der RNA-Sequenz verändert wird. Das Spleißen eines transfizierten Myomesinminigens war aber in kultivierten Zellen zwischen Wildtyp und Mutante nicht unterschiedlich.

Die hier vorgestellten Ergebnisse geben erstmals ein umfassenderes Bild der Funktion des Myomesins in der sarkomeren M-Bande. Myomesin ist wie andere Zytoskelettproteine zu einer Selbstassoziation befähigt. Myomesindimere quervernetzen Myosinfilamente im Zentrum der sarkomeren M-Bande und integrieren gleichzeitig durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen Bindungspartner mit unterschiedlicher Funktion in die M-Bande.

Die zweite hier beschriebene Myosinbindungstelle in Myomesin kann zur Erhöhung der Stabilität der M-Bande nötig sein und durch selektive Bindung an Myosin während der Myofibrillogenese den Einbau von Myosinfilamenten in naszierende Myofibrillen vermitteln. Die gezielte Stimulierung der Phosphorylierung des Myomesins durch die Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Signalkaskaden eröffnet die Möglichkeit einer Modulation ausgewählter Protein-Protein-Interaktionen in der M-Bande, da phosphoryliertes Myomesin, wie vorherige Arbeiten zeigten, nicht an Titin binden kann. Damit ergeben sich Hinweise auf eine Regulation der Stabilität der M-Bandenstruktur durch äußere Signale. Die Reexpression der embryonalen Myomesinsioform ist ein Indikator für Remodellierungsprozesse der Sarkomerstruktur bei der Hypertrophen Kardiomyopahtie.

# Literaturverzeichnis

- Agarkova, I., Auerbach, D., Ehler, E., Perriard, J. C., 2000. A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J. Biol. Chem.* 275, 10256–10264.
- Agarkova, I., Ehler, E., Lange, S., Schoenauer, R., Perriard, J. C., 2003. M-band: a safeguard for sarcomere stability? *J. Muscle Res. Cell Motil.* 24, 191–203.
- Agarkova, I., Schoenauer, R., Ehler, E., Carlsson, L., Carlsson, E., Thornell, L. E., Perriard, J. C., 2004. The molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber type. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 193–204.
- Antos, C. L., Frey, N., Marx, S. O., Reiken, S., Gaburjakova, M., Richardson, J. A., Marks, A. R., Olson, E. N., 11 2001. Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ. Res.* 89, 997–1004.
- Aquila, L. A., McCarthy, P. M., Smedira, N. G., Young, J. B., Moravec, C. S., 2004. Cytoskeletal structure and recovery in single human cardiac myocytes. *J. Heart Lung Transplant.* 23, 954–963.
- Arad, M., Benson, D. W., Perez-Atayde, A. R., McKenna, W. J., Sparks, E. A., Kanter, R. J., McGarry, K., Seidman, J. G., Seidman, C. E., 2002. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest* 109, 357–362.
- Ashrafian, H., Redwood, C., Blair, E., Watkins, H., 2003. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet.* 19, 263–268.
- Auerbach, D., Bantle, S., Keller, S., Hinderling, V., Leu, M., Ehler, E., Perriard, J. C., 1999. Different domains of the M-band protein myomesin are involved in myosin binding and M-band targeting. *Mol. Biol. Cell* 10, 1297–1308.

- Bader, D., Masaki, T., Fischman, D. A., 1982. Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* 95, 763–770.
- Berget, S. M., 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *J. Biol. Chem.* 270, 2411–2414.
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., Salmon, A., Ostman-Smith, I., 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. *HMG* 10, 1215–1220.
- Bonfield, J., et al., 2004. Staden Package WWW site. <http://staden.sourceforge.net/>.
- Borisov, A. B., Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Bloch, R. J., Westfall, M. V., Russell, M. W., 2004. Dynamics of obscurin localization during differentiation and remodeling of cardiac myocytes: obscurin as an integrator of myofibrillar structure. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 1117–1127.
- Bork, P., Holm, L., Sander, C., 1994. The immunoglobulin fold. structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* 242, 309–320.
- 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.
- Bristow, M. R., 1998. Why does the myocardium fail?: Insights from basic science. *Lancet* 352 Suppl. 1, SI8–14.
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., Jamieson, S. e. a., 1986. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.* 59, 297–309.
- CBSA, 2004. Center for Biological Sequence Analysis. <http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/predict/predform.php>.
- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T., Hidaka, H., 1990. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent

- protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265, 5267–5272.
- Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C., Gregorio, C. C., 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 637–706.
- Craig, R., Offer, G., 1976. The location of C-protein in rabbit skeletal muscle. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 192, 451–461.
- DiMauro, S., Schon, E. A., 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 2656–2668.
- Diviani, D., Scott, J. D., 2001. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 114, 1431–1437.
- Edman, A. C., Squire, J. M., Sjöström, M., 1988. Fine structure of the A-band in cryosections. diversity of M-band structure in chicken breast muscle. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 100, 1–12.
- Ehler, E., Rothen, B. M., Hammerle, S. P., Komiyama, M., Perriard, J. C., 1999. Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *J. Cell Sci.* 112, 1529–1539.
- Elliott, P., McKenna, W. J., 2004. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 363, 1881–1891.
- Eppenberger, H. M., Perriard, J. C., Rosenberg, U. B., Strehler, E. E., 1981. The Mr 165,000 M-protein myomesin: a specific protein of cross-striated muscle cells. *J. Cell Biol.* 89, 185–193.
- Fairbrother, W. G., Yeh, R. F., Sharp, P. A., Burge, C. B., 2002. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297, 1007–1013, <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>.
- Finley, N., Abbott, M. B., Abusamhadneh, E., Gaponenko, V., Dong, W., Gasmi-Seabrook, G., Howarth, J. W., Rance, M., Solaro, R. J., Cheung, H. C., Rosevear, P. R., 1999. NMR analysis of cardiac troponin C-troponin I complexes: effects of phosphorylation. *FEBS Lett.* 453, 107–112.

- Flashman, E., Redwood, C., Moolman-Smook, J., Watkins, H., 2004. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ. Res.* 94, 1279–1289.
- Foucault, G., Vacher, M., Merkulova, T., Keller, A., rrio Dupont, M., 1999. Presence of enolase in the M-band of skeletal muscle and possible indirect interaction with the cytosolic muscle isoform of creatine kinase. *Biochem. J.* 338, 115–121.
- Fowler, S. B., Clarke, J., 2001. Mapping the folding pathway of an immunoglobulin domain: structural detail from Phi value analysis and movement of the transition state. *Structure (Camb.)* 9, 355–366.
- Fürst, D. O., Osborn, M., Nave, R., 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, 1563–1572.
- Fürst, D. O., Osborn, M., 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, 517–527.
- Gao, M. H., Lai, N. C., Roth, D. M., Zhou, J., Zhu, J., Anzai, T., Dalton, N., Hammond, H. K., 1999. Adenylylcyclase increases responsiveness to catecholamine stimulation in transgenic mice. *Circulation* 99, 1618–1622.
- 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., E., v., Nurnberg, P., Scheffold, T., Dietz, R., Osterziel, K. J., 2003. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 107, 1390–1395.
- Geisterfer-Lowrance, A. A., Kass, S., Tanigawa, G., Vosberg, H. P., McKenna, W., Seidman, C., Seidman, J. G., 1990. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 62, 999–1006.
- Gluzman, Y., 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175–182.
- Grabarek, Z., Gergely, J., 1990. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal. Biochem.* 185, 131–135.

- Grove, B. K., Cerny, L., Perriard, J. C., Eppenberger, H. M., Thornell, L. E., 1989. Fiber type-specific distribution of M-band proteins in chicken muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 447–454.
- Grove, B. K., Holmbom, B., Thornell, L. E., 1987. Myomesin and M protein: differential expression in embryonic fibers during pectoral muscle development. *Differentiation* 34, 106–114.
- Grove, B. K., Kurer, V., Lehner, C., Doetschman, T. C., Perriard, J. C., Eppenberger, H. M., 1984. A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 98, 518–524.
- Grove, B. K., Thornell, L. E., 1988. Noncoordinate expression of M band proteins in slow and fast embryonic chick muscles. *Muscle Nerve* 11, 645–653.
- Hartzell, H. C., Titus, L., 1982. Effects of cholinergic and adrenergic agonists on phosphorylation of a 165,000-dalton myofibrillar protein in intact cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 257, 2111–2120.
- Heller, W. T., Finley, N. L., Dong, W. J., Timmins, P., Cheung, H. C., Rosevear, P. R., Trehwella, J., 2003. Small-angle neutron scattering with contrast variation reveals spatial relationships between the three subunits in the ternary cardiac troponin complex and the effects of troponin I phosphorylation. *Biochemistry* 42, 7790–7800.
- Himmel, M., van der Ven, P. F., Stöcklein, W., Fürst, D. O., 2003. The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins. *Biochemistry* 42, 430–439.
- Hornemann, T., Kempa, S., Himmel, M., Hayeß, K., Fürst, D. O., Wallimann, T., 2003. Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *J. Mol. Biol.* 332, 877–887.
- Huxley, A. F., Niedergerke, R., 1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173, 971–973.
- Huxley, H., Hanson, J., 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173, 973–976.
- Improta, S., Politou, A. S., Pastore, A., 1996. Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure.* 4, 323–337.



- Jarcho, J. A., McKenna, W., Pare, J. A., Solomon, S. D., Holcombe, R. F., Dickie, S., Levi, T., Donis-Keller, H., Seidman, J. G., Seidman, C. E., 1989. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N. Engl. J. Med.* 321, 1372–1378.
- Jensen, F. C., Girardi, A. J., Gilden, R. V., Koprowski, H., 1964. Infection of human and simian tissue cultures with rous sarcoma virus. *Proc. Nat. Acad. Science, USA.* 52, 53–59.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., 1996. *Histologie.* Springer-Verlag.
- Kamisago, M., Sharma, S. D., DePalma, S. R., Solomon, S., Sharma, P., McDonough, B., Smoot, L., Mullen, M. P., Woolf, P. K., Wigle, E. D., Seidman, J. G., Seidman, C. E., 2000. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 343, 1688–1696.
- Kemp, B. E., Graves, D. J., Benjamini, E., Krebs, E. G., 1977. Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252, 4888–4894.
- Kennelly, P. J., 2003. Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochem. J.* 370, 373–389.
- Kirchberger, M. A., Tada, M., Katz, A. M., 1974. Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249, 6166–6173.
- Kirchhefer, U., Schmitz, W., Scholz, H., Neumann, J., 1999. Activity of cAMP-dependent protein kinase and  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc. Res.* 42, 254–261.
- Konhilas, J. P., Irving, T. C., Wolska, B. M., Jweied, E. E., Martin, A. F., Solaro, R. J., de Tombe, P. P., 2003. Troponin I in the murine myocardium: influence on length-dependent activation and interfilament spacing. *J. Physiol.* 547, 951–961.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lange, S., Auerbach, D., McLoughlin, P., Perriard, E., Schafer, B. W., Perriard, J. C., Ehler, E., 2002. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J. Cell Sci.* 115, 4925–4936.

- Lange, S., Himmel, M., Auerbach, D., Agarkova, I., Hayeß, K., Fürst, D. O., Perriard, J. C. and Ehler, E., 2005. Dimerisation of myomesin: Implications for the structure of the sarcomeric M-band. *J. Mol. Biol.* 345, 289–298.
- Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., Wirth, B., 1999. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Nat. Acad. Science, USA.* 96, 6307–6311.
- Luther, P., Squire, J., 1978. Three-dimensional structure of the vertebrate muscle M-region. *J. Mol. Biol.* 125, 313–324.
- Luther, P. K., Crowther, R. A., 1984. Three-dimensional reconstruction from tilted sections of fish muscle M-band. *Nature* 307, 566–568.
- Luther, P. K., Munro, P. M., Squire, J. M., 1981. Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. III. M-region structure and myosin filament symmetry. *J. Mol. Biol.* 151, 703–730.
- Luther, P. K., Squire, J. M., 1980. Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. II. the myosin filament superlattice. *J. Mol. Biol.* 141, 409–439.
- Margossian, S. S., Lowey, S., 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* 85, 55–71.
- Marian, A. J., 2000. Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 355, 58–60.
- Marian, A. J., Roberts, R., 2001. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 655–670.
- Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., 1977. Connectin, an elastic protein of muscle. characterization and function. *J. Biochem. (Tokyo)* 82, 317–337.
- Masaki, T., Takaiti, O., 1974. M-protein. *J. Biochem. (Tokyo)* 75, 367–380.
- Masaki, T., Takaiti, O., Ebashi, S., 1968. "M-substance", a new protein constituting the M-line of myofibrils. *J. Biochem. (Tokyo)* 64, 909–910.
- Mayer, D. C., Leinwand, L. A., 1997. Sarcomeric gene expression and contractility in myofibroblasts. *J. Cell Biol.* 139, 1477–1484.

- McElhinny, A. S., Perry, C. N., Witt, C. C., Labeit, S., Gregorio, C. C., 2004. Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J. Cell Sci.* 117, 3175–3188.
- Moncman, C. L., Rindt, H., Robbins, J., Winkelmann, D. A., 1993. Segregated assembly of muscle myosin expressed in nonmuscle cells. *Mol. Biol. Cell* 4, 1051–1067.
- Noguchi, J., Yanagisawa, M., Imamura, M., Kasuya, Y., Sakurai, T., Tanaka, T., Masaki, T., 1992. Complete primary structure and tissue expression of chicken pectoralis M-protein. *J. Biol. Chem.* 267, 20302–20310.
- Novagen, May 2003. pET System Manual. 10th Edition, <http://www.novagen.com>.
- Obermann, W. M., 1996. Biochemische Charakterisierung der titinassozierten Proteine Myomesin und M-Protein und ihre Wechselwirkung mit Titin und Myosin in der M-Bande des sarkomeren Muskels. Dissertation, Universität Tübingen.
- Obermann, W. M., Gautel, M., Steiner, F., van der Ven, P. F., Weber, K., 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, 1441–1453.
- Obermann, W. M., Gautel, M., Weber, K., 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, 211–220.
- Obermann, W. M., Plessmann, U., Weber, K., Fürst, D. O., 1995. Purification and biochemical characterization of myomesin, a myosin-binding and titin-binding protein, from bovine skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 233, 110–115.
- Obermann, W. M., van der Ven, P. F., Steiner, F., Weber, K., Fürst, D. O., 1998. Mapping of a myosin-binding domain and a regulatory phosphorylation site in M-protein, a structural protein of the sarcomeric M band. *Mol. Biol. Cell* 9, 829–840.
- Offer, G., Moos, C., Starr, R., 1973. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. extractions, purification and characterization. *J. Mol. Biol.* 74, 653–676.

- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T., 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411–2423.
- Pacholsky, D., 2003. Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte während der Muskelentwicklung. Dissertation, Universität Potsdam.
- Pask, H. T., Jones, K. L., Luther, P. K., Squire, J. M., 1994. M-band structure, M-bridge interactions and contraction speed in vertebrate cardiac muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15, 633–645.
- Pizon, V., Iakovenko, A., van der Ven, P. F., Kelly, R., Fatu, C., Fürst, D. O., Karsenti, E., Gautel, M., 2002. Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J. Cell Sci.* 115, 4469–4482.
- Price, M. G., 1987. Skelemins: cytoskeletal proteins located at the periphery of M-discs in mammalian striated muscle. *J. Cell Biol.* 104, 1325–1336.
- Price, M. G., Gomer, R. H., 1993. Skelemin, a cytoskeletal M-disc periphery protein, contains motifs of adhesion/recognition and intermediate filament proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 21800–21810.
- Qiagen, June 2003. The QIAexpressionist. [Http://www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A., 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16, 276–277, <http://www.emboss.org/>.
- Richard, P., Charron, P., Carrier, L., Ledeuil, C., Cheav, T., Pichereau, C., Benaiche, A., Isnard, R., Dubourg, O., Burban, M., Gueffet, J. P., Millaire, A., Desnos, M., Schwartz, K., Hainque, B., Komajda, M., 2003. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 107, 2227–2232.
- Robertson, S. P., Johnson, J. D., Holroyde, M. J., Kranias, E. G., Potter, J. D., Solaro, R. J., 1982. The effect of troponin I phosphorylation on the  $Ca^{2+}$ -binding properties of the  $Ca^{2+}$ -regulatory site of bovine cardiac troponin. *J. Biol. Chem.* 257, 260–263.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Ehrlich, H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.

- Sanger, J. W., Ayoob, J. C., Chowrashi, P., Zurawski, D., Sanger, J. M., 2000. Assembly of myofibrils in cardiac muscle cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 481, 89–102.
- Sanger, J. W., Chowrashi, P., Shaner, N. C., Spalhoff, S., Wang, J., Freeman, N. L., Sanger, J. M., 2002. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin. Orthop.*, S153–S162.
- Schaart, G., Pieper, F. R., Kuijpers, H. J., Bloemendal, H., Ramaekers, F. C., 1991. Baby hamster kidney (BHK-21/C13) cells can express striated muscle type proteins. *Differentiation* 46, 105–115.
- Seiler, S. H., Fischman, D. A., Leinwand, L. A., 1996. Modulation of myosin filament organization by C-protein family members. *Mol. Biol. Cell* 7, 113–127.
- Shaw, G., Debus, E., Weber, K., 1984. The immunological relatedness of neurofilament proteins of higher vertebrates. *Eur. J. Cell Biol.* 34, 130–136.
- Sjöström, M., Squire, J. M., 1977. Fine structure of the A-band in cryo-sections. the structure of the A-band of human skeletal muscle fibres from ultra-thin cryo-sections negatively stained. *J. Mol. Biol.* 109, 49–68.
- Sohn, R. L., Vikstrom, K. L., Strauss, M., Cohen, C., Szent-Gyorgyi, A. G., Leinwand, L. A., 1997. A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation. *J. Mol. Biol.* 266, 317–330.
- Speel, E. J., van der Ven, P. F., Albrechts, J. C., Ramaekers, F. C., Fürst, D. O., Hopman, A. H., 1998. Assignment of the human gene for the sarcomeric M-band protein myomesin (MYOM1) to 18p11.31-p11.32. *Genomics* 54, 184–186.
- Squire, J. M., 1997. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 247–257.
- Squire, J. M., Luther, P. K., Trinick, J., 1987. *Fibrous Protein Structure*. Academic Press, Ch. 15, pp. 423–448.
- Steiner, F., 1997. Vergleichende Analyse der Gene der M-Banden-Proteine Myomesin und M-Protein sowie Binundungseigenschaften und Lokalisation von M-Protein. Dissertation, Universität Göttingen.

- Steiner, F., Weber, K., Fürst, D. O., 1999. M band proteins myomesin and skelemin are encoded by the same gene: analysis of its organization and expression. *Genomics* 56, 78–89.
- Strehler, E. E., Carlsson, E., Eppenberger, H. M., Thornell, L. E., 1983. Ultrastructural localization of M-band proteins in chicken breast muscle as revealed by combined immunocytochemistry and ultramicrotomy. *J. Mol. Biol.* 166, 141–158.
- Taylor, R. W., Giordano, C., Davidson, M. M., d'Amati, G., Bain, H., Hayes, C. M., Leonard, H., Barron, M. J., Casali, C., Santorelli, F. M., Hirano, M., Lightowers, R. N., DiMauro, S., Turnbull, D. M., 2003. A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 1786–1796.
- Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H. P., Seidman, J. G., Seidman, C. E., 1994. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77, 701–712.
- Trinick, J., Knight, P., Whiting, A., 1984. Purification and properties of native titin. *J. Mol. Biol.* 180, 331–356.
- Turner, D. C., Wallimann, T., Eppenberger, H. M., 1973. A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase. *Proc. Nat. Acad. Science, USA.* 70, 702–705.
- van der Ven, P. F., Fürst, D. O., 1998. Expression of sarcomeric proteins and assembly of myofibrils in the putative myofibroblast cell line BHK-21/C13. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19, 767–775.
- van der Ven, P. F., Obermann, W. M., Lemke, B., Gautel, M., Weber, K., 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, 149–162.
- van der Ven, P. F., Schaart, G., Jap, P. H., Sengers, R. C., Stadhouders, A. M., Ramaekers, F. C., 1992. Differentiation of human skeletal muscle cells in culture: maturation as indicated by titin and desmin striation. *Cell Tissue Res.* 270, 189–198.

- van der Ven, P. F., Speel, E. J., Albrechts, J. C., Ramaekers, F. C., Hopman, A. H., Fürst, D. O., 1999. Assignment of the human gene for endosarcomeric cytoskeletal M-protein (MYOM2) to 8p23.3. *Genomics* 55, 253–255.
- Varriano-Marston, E., Franzini-Armstrong, C., Haselgrove, J. C., 1984. The structure and disposition of crossbridges in deep-etched fish muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 5, 363–386.
- Vikstrom, K. L., Rovner, A. S., Saez, C. G., Bravo-Zehnder, M., Straceski, A. J., Leinwand, L. A., 1993. Sarcomeric myosin heavy chain expressed in nonmuscle cells forms thick filaments in the presence of substoichiometric amounts of light chains. *Cell Motil. Cytoskeleton* 26, 192–204.
- Vinkemeier, U., 1992. Biochemische Charakterisierung und cDNA-Klonierung Titin-bindender Proteine; ein Beitrag zum Verständnis des sarkomeren Muskels. Dissertation, Universität Gießen.
- Vinkemeier, U., Obermann, W., Weber, K., Fürst, D. O., 1993. The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *J. Cell Sci.* 106, 319–330.
- Wallimann, T., Doetschman, T. C., Eppenberger, H. M., 1983. Novel staining pattern of skeletal muscle M-lines upon incubation with antibodies against MM-creatine kinase. *J. Cell Biol.* 96, 1772–1779.
- Walsh, D. A., Ashby, C. D., Gonzalez, C., Calkins, D., Fischer, E. H., 1971. Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 246, 1977–1985.
- Wang, K., McClure, J., Tu, A., 1979. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Nat. Acad. Science, USA.* 76, 3698–3702.
- Wehland, J., Willingham, M. C., 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, 1467–1475.

- Welikson, R. E., Fischman, D. A., 2002. The C-terminal IgI domains of myosin-binding proteins C and H (MyBP-C and MyBP-H) are both necessary and sufficient for the intracellular crosslinking of sarcomeric myosin in transfected non-muscle cells. *J. Cell Sci.* 115, 3517–3526.
- Winegrad, S., 1999. Cardiac myosin binding protein C. *Circ. Res.* 84, 1117–1126.
- Xiao, R. P., Cheng, H., Zhou, Y. Y., Kuschel, M., Lakatta, E. G., 1999. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ. Res.* 85, 1092–1100.
- Xiao, R. P., Hohl, C., Altschuld, R., Jones, L., Livingston, B., Ziman, B., Tantini, B., Lakatta, E. G., 1994. Beta 2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in  $ca^{2+}$  dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269, 19151–19156.
- Yamasaki, R., Wu, Y., McNabb, M., Greaser, M., Labeit, S., Granzier, H., 2002. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 90, 1181–1188.
- Young, P., Ehler, E., Gautel, M., 2001. Obscurin, a giant sarcomeric rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. *J. Cell Biol.* 154, 123–136.
- Zaccolo, M., Pozzan, T., 2002. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295, 1711–1715.



# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
8-Br-cAMP	8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCD	<i>charge-coupled device</i>
cDNA	komplementäre DNA
DCM	<i>dilated cardiomyopathy</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetraazetat
EGTA	Ethylen-glycol-bis-aminoethylether-N-N-tetraazetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESE	<i>exonic splicing enhancer</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FN	Fibronectin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HCM	<i>hypertrophic cardiomyopathy</i>

HSkM	humane Skelettmuskelzellen
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-Thio- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MM-CK	muskelspezifische Kreatinkinase
Mp	M-Protein
mut	Mutante
mRNA	<i>messenger RNA</i>
My	Myomesin
NEAA	<i>non essential amino acids</i>
O. D.	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline plus triton</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PKA	Proteinkinase A
PKD	Proteinkinase D
RGB	Rot, Grün, Blau
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minutes</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

# Anhang B

## Oligonukleotidsequenzen

Name	Sequenz
hMYOM 1f	TTT ACg CgT ATg TCT TTg CCT TTT TAT CAg
My7rev	gTC CCA ggA CCA CCg cAC gTC gAC AAg TgT AgT gAA gTC
My13rev	gTg gCA AgA Agg CCA Agg TCg ACg Agg TgC gAg gAg AgC A
My12V1393lfwd	gTg gAg gAT TTg AAA ATT AAC Tgg TCC CAC
My12V1394lrev	gTG gAg gAT TTg AAA ATT AAc Tgg Tcc cAc
seqmyom02	AgT gAg gAA ggA ATC ACA AC
seqmyom03	TTT gAT gAg ACT CgC TTC CAT g
seqmyom04	ATC gAA ggT CgT TCC TAT ATC
seqmyom05	TAC ATA gAg gCA AAC gTT gCT g
seqmyom06	TTC gTg gAC TTg AAg gAg AAg
seqmyom07	TCT ggC AAT gCC AAA gTC AAC
seqmyom08	ggC ATC CAA CTg TAC TCT TTT g
Myom ex31fwd	TCC ACG CGT TTT AAG GAA CTG ATG ATG G
Myom ex33rev	ACT GGA CAT CAG AAG ACA GTC GAC CTC TC

Tabelle B.1: Die aufgeführten Oligonukleotidsequenzen sind in 5'-3'-Richtung notiert.

# Anhang C

## Humane Myomesin cDNA Sequenz

	<b>Exon 0</b>		
2	gca tta tgc aat tat att act aag gct gct acc tgc cca tgc ccc	46	
47	tct cct cct cct ggt ttg gaa cta ccc tcc cca tct gct gct ata	91	
92	ttt atc tgc ctt ctt ggc cat aaa agg ctg gtt gtg tgg cct gac	136	
137	att cga ctg cct gac cac atg cat tat ttt tga act ggc ccc cag	181	
182	ggt cct gtc ttt agc cct gcc tct taa cat tgt ctt gga ttc aac	226	
227	cta ggt gga gtc ttc att ctc tca tcc agc tcc tcg gcc tca tcg	271	
272	gaa cat ttc cac cac cat tac tcc ttt gga aac tgg tgg ccc ggt	316	Exon 1
317	tcc ttc aag ggg cac agg atg tct ttg cct ttt tat cag agg tgc	361	
		9	
			Domäne 1
362	cac cag cac tat gat ctc agc tac cgc aac aag gac gtg cgc agc	406	
10	H Q H Y D L S Y R N K D V R S	24	
407	acc gtg agt cac tac cag cgg gag aag aaa cgc tcc gcc gtc tac	451	
25	T V S H Y Q R E K K R S A V Y	39	
452	acc cag ggc tcc acg gcc tac agc agc cgc tcc tcc gcc gcg cac	496	
40	T Q G S T A Y S S R S S A A H	54	
497	cgc cgg gag tcc gag gcc ttc cgt cgg gcg tcc gcc tcc tcc tcc	541	
55	R R E S E A F R R A S A S S S	69	
542	cag cag cag gcc tcg cag cac gcc ctg agc tct gaa gtc agt cgg	586	
70	Q Q Q A S Q H A L S S E V S R	84	
587	aag gca gcc tca gcc tac gat tat ggc tcc tcc cat gga ctt aca	631	Exon 2
85	K A A S A Y D Y G S S H G L T	99	
632	gat tcc agt ctg ctg tta gat gat tat tca tcc aag ttg agc ccc	676	
100	D S S L L L D D Y S S K L S P	114	
677	aaa cca aag aga gcc aag cac agc cta ctg tct gga gaa gag aaa	721	
115	K P K R A K H S L L S G E E K	129	
722	gaa aat ttg ccc agt gac tac atg gta ccc att ttc tca gga cgt	766	Exon 3
130	E N L P S D Y M V P I F S G R	144	
767	caa aag cat gtc agt gga att act gat acg gaa gaa gaa aga att	811	
145	Q K H V S G I T D T E E E R I	159	
812	aaa gaa gct gct gct tat ata gcc cag agg aat ctt ctt gct agt	856	
160	K E A A A Y I A Q R N L L A S	174	
857	gag gaa gga atc aca aca tct aaa cag tcc acg gca tcc aag cag	901	
175	E E G I T T S K Q S T A S K Q	189	
902	acc acg gca tct aag cag tcc acg gca tcc aag cag tcc aca gca	946	
190	T T A S K Q S T A S K Q S T A	204	
947	tcc aag cag tcc acg gca tcc agg cag tcc acg gca tcc agg cag	991	
205	S K Q S T A S R Q S T A S R Q	219	

Abbildung C.1: Humane Myomesin cDNA

992	tct	gtg	gtt	tcc	aaa	cag	gcc	aca	tcc	gct	ctt	caa	cag	gaa	gaa	1036
220	S	V	V	S	K	Q	A	T	S	A	L	Q	Q	E	E	234
1037	act	tct	gaa	aag	aag	tca	agg	aaa	gtt	gtg	att	cga	gaa	aag	gca	1081
235	T	S	E	K	K	S	R	K	V	V	I	R	E	K	A	249
1082	gaa	cgc	ctg	tcc	ctg	agg	aaa	aca	tca	gaa	gaa	acc	gag	aca	tat	1126
250	E	R	L	S	L	R	K	T	L	E	E	T	E	T	Y	264
1127	cat	gcc	aag	ctg	aat	gaa	gac	cat	ctt	ctc	cat	gct	cct	gag	ttt	1171
265	H	A	K	L	N	E	D	H	L	L	H	A	P	E	F	279
1172	atc	att	aaa	cct	cgc	tcc	cac	acg	gtt	tgg	gag	aag	gag	aat	gta	1216
280	I	I	K	P	R	S	H	T	V	W	E	K	E	N	V	294
1217	aaa	ttg	cat	tgc	tcc	ata	gca	ggc	tgg	cca	gaa	cct	cgt	gtc	acg	1261
295	K	L	H	C	S	I	A	G	W	P	E	P	R	V	T	309
1262	tgg	tat	aaa	aac	cag	gtg	cca	ata	aat	gtc	cat	gca	aac	cct	gga	1306
310	W	Y	K	N	Q	V	P	I	N	V	H	A	N	P	G	324
1307	aag	tat	att	att	gag	agt	cga	tat	ggg	atg	cac	act	ctg	gag	att	1351
325	K	Y	I	I	E	S	R	Y	G	M	H	T	L	E	I	339
1352	aat	gca	tgt	gat	ttt	gaa	gat	aca	gct	cag	tac	cgg	gcc	tcg	gcg	1396
340	N	A	C	D	F	E	D	T	A	Q	Y	R	A	S	A	354
1397	atg	aat	gtt	aaa	gga	gag	ctt	tcg	gca	tat	gct	tca	gtt	gtg	gta	1441
355	M	N	V	K	G	E	L	S	A	Y	A	S	V	V	V	369
1442	aaa	agg	tat	aag	gga	gag	ttt	gat	gag	act	cgc	ttc	cac	gct	ggg	1486
370	K	R	Y	K	G	E	F	D	E	T	R	F	H	A	G	384
1487	gct	tcc	acc	atg	ccc	ctc	agc	ttt	ggg	gtg	acc	cca	tat	ggg	tat	1531
385	A	S	T	M	P	L	S	F	G	V	T	P	Y	G	Y	399
1532	gca	tcc	cgg	ttt	gag	atc	cac	ttt	gat	gac	aaa	ttt	gat	gtg	tct	1576
400	A	S	R	F	E	I	H	F	D	D	K	F	D	V	S	414
1577	ttt	ggg	aga	gag	gga	gag	aca	atg	agt	cta	ggc	tgt	cgt	gtt	gtc	1621
415	F	G	R	E	G	E	T	M	S	L	G	C	R	V	V	429
1622	atc	act	cct	gaa	att	aaa	cat	ttc	cag	cca	gag	atc	cag	tgg	tac	1666
430	I	T	P	E	I	K	H	F	Q	P	E	I	Q	W	Y	444
1667	aga	aac	gga	gta	cct	ctt	tct	cca	tca	aaa	tgg	gtg	caa	aca	ctt	1711
445	R	N	G	V	P	L	S	P	S	K	W	V	Q	T	L	459
1712	tgg	agt	gga	gag	cgg	gca	acg	ctg	aca	ttt	tcc	cat	ctc	aac	aaa	1756
460	W	S	G	E	R	A	T	L	T	F	S	H	L	N	K	474
1757	gaa	gat	gaa	ggc	ctc	tat	aca	atc	cgt	gta	cgg	atg	gga	gaa	tat	1801
475	E	D	E	G	L	Y	T	I	R	V	R	M	G	E	Y	489
1802	tat	gaa	caa	tat	agt	gct	tat	gtc	ttt	gtt	cga	gat	gct	gat	gca	1846
490	Y	E	Q	Y	S	A	Y	V	F	V	R	D	A	D	A	504
1847	gag	att	gaa	gga	gcc	cca	gct	gct	ccc	ttg	gat	gtg	aag	tgc	ttg	1891
505	E	I	E	G	A	P	A	A	P	L	D	V	K	C	L	519
1892	gag	gcc	aac	aaa	gat	tat	atc	atc	atc	tcc	tgg	aaa	cag	cca	gct	1936
520	E	A	N	K	D	Y	I	I	I	S	W	K	Q	P	A	534

Abbildung C.2: Humane Myomesin cDNA - Fortsetzung

1937	gtc gat gga ggg agt cct att ctc gga tat ttt att gat aag tgt	1981
535	V D G G S P I L G Y F I D K C	549
1982	gag gtg ggc aca gat agc tgg tgc cag tgc aat gac aca cct gtg	2026
550	E V G T D S W S Q C N D T P V	564
2027	aag ttt gct cgt ttt cct gtc act gga ttg atc gaa ggt cgt tcc	2071
565	K F A R F P V T G L I E G R S	579
2072	tat atc ttc cga gtt cga gct gtg aat aaa atg gga ata ggt ttc	2116
580	Y I F R V R A V N K M G I G F	594
2117	cca tct cga gtt tcc gag ccc gtg gct gct ctg gat ccg gct gag	2161
595	P S R V S E P V A A L D P A E	609
2162	aaa gct aga ctt aaa agt cgc ccc tca gca ccc tgg act gga cag	2206
610	K A R L K S R P <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">S</span> A P W T G Q	624
2207	atc att gtt act gaa gag gaa cct tca gag ggt att gtg cct ggc	2251
625	I I V T E E E P S E G I V P G	639
2252	ccc ccg aca gac ctc tct gtc act gag gcc acc ccg agc tat gtg	2296
640	P P T D L S V T E A T R S Y V	654
2297	gtg ctc agc tgg aag ccc cct ggc cag cgt ggt cat gag ggc att	2341
655	V L S W K P P G Q R G H E G I	669
2342	atg tac ttt gtg gaa aag tgt gag gca gga aca gaa aac tgg cag	2386
670	M Y F V E K C E A G T E N W Q	684
2387	cga gtg aac acg gag ctc cct gtg aag tct ccc cgc ttt gct ctg	2431
685	R V N T E L P V K S P R F A L	699
2432	ttt gac ttg gcc gag ggg aaa tcc tac tgt ttc cgt gtc cgc tgt	2476
700	F D L A E G K S Y C F R V R C	714
2477	tct aat tct gca gga gtt ggt gag ccc tca gag gca acg gag gtg	2521
715	S N S A G V G E P S E A T E V	729
2522	act gtg gta ggg gac aaa ctt gat atc ccc aag gct cct ggc aaa	2566
730	T V V G D K L D I P K A P G K	744
2567	atc atc cca agc aga aac aca gac acc tca gtg gta gtt tcg tgg	2611
745	I I P S R N T D T S V V V S W	759
2612	gag gag tcc aaa gat gcc aaa gag ctg gtc ggg tac tac ata gag	2656
760	E E S K D A K E L V G Y Y I E	774
2657	gcg agc gtt gct ggc tct ggc aag tgg gag ccc tgt aac aac aac	2701
775	A S V A G S G K W E P C N N N	789
2702	ccc gtg aag ggc tca cga ttc act tgt cat gga tta gtg act ggt	2746
790	P V K G S R F T C H G L V T G	804
2747	cag agt tat att ttc cgg gtc aga gca gtc aat gca gct gga ctt	2791
805	Q S Y I F R V R A V N A A G L	819
2792	agt gaa tat tcc cag gat tca gaa gct att gaa gtc aaa gct gct	2836
820	S E Y S Q D S E A I E V K A A	834
2837	att ggg gga gga gtg tct cca gat gtg tgt ccc gca ctg agc gat	2881
835	I G G G V S P D V C P A L S D	849

Abbildung C.3: Humane Myomesin cDNA - Fortsetzung

2882	gag	cct	ggg	gga	cta	acc	gcc	tcc	agg	ggg	cgc	gtg	cat	gaa	gcc	2926
850	E	P	G	G	L	T	A	S	R	G	R	V	H	E	A	864
2927	tcc	ccg	cca	acc	ttc	cag	aaa	gat	gct	ttg	ctt	ggc	agc	aaa	cct	2971
865	S	P	P	T	F	Q	K	D	A	L	L	G	S	K	P	879
2972	aac	aaa	cct	tca	cta	ccc	agt	agc	tct	caa	aac	ctg	ggc	caa	aca	3016
880	N	K	P	S	L	P	S	S	S	Q	N	L	G	Q	T	894
3017	gaa	gtg	agt	aaa	gta	agt	gaa	aca	gtt	cag	gaa	gag	ctt	acc	ccg	3061
895	E	V	S	K	V	S	E	T	V	Q	E	E	L	T	P	909
3062	cca	cca	cag	aaa	gcg	gct	cct	cag	ggg	aaa	agt	aag	tct	gac	ccc	3106
910	P	P	Q	K	A	A	P	Q	G	K	S	K	S	D	P	924
3107	ctg	aaa	aag	aag	aca	gac	aga	gca	cca	cca	tct	cca	ccc	tgt	gat	3151
925	L	K	K	K	T	D	R	A	P	P	S	P	P	C	D	939
3152	atc	acc	tgt	ctt	gaa	agt	ttt	cgt	gac	tca	atg	gtt	ctt	gga	tgg	3196
940	I	T	C	L	E	S	F	R	D	S	M	V	L	G	W	954
3197	aag	caa	cca	gat	aag	act	gga	ggg	gca	gaa	att	act	ggc	tat	tat	3241
955	K	Q	P	D	K	T	G	G	A	E	I	T	G	Y	Y	969
3242	gtg	aac	tat	cgc	gag	gtc	att	gat	ggg	gta	cca	gga	aaa	tgg	aga	3286
970	V	N	Y	R	E	V	I	D	G	V	P	G	K	W	R	984
3287	gaa	gcc	aat	gtc	aag	gct	gtc	agt	gag	gag	gca	tac	aag	att	agc	3331
985	E	A	N	V	K	A	V	S	E	E	A	Y	K	I	S	999
3332	aac	ttg	aag	gaa	aac	atg	gtg	tat	cag	ttc	caa	gtg	gca	gcc	atg	3376
1000	N	L	K	E	N	M	V	Y	Q	F	Q	V	A	A	M	1014
3377	aac	atg	gct	ggg	ctg	ggc	gcg	ccc	tcc	gca	gta	agc	gaa	tgc	ttc	3421
1015	N	M	A	G	L	G	A	P	S	A	V	S	E	C	F	1029
3422	aaa	tgt	gaa	gag	tgg	acc	atc	gcc	gtc	cca	gga	cca	ccg	cac	agt	3466
1030	K	C	E	E	W	T	I	A	V	P	G	P	P	H	S	1044
3467	ctc	aag	tgt	agt	gaa	gtc	agg	aaa	gac	tca	ctg	gtt	ctc	cag	tgg	3511
1045	L	K	C	S	E	V	R	K	D	S	L	V	L	Q	W	1059
3512	aag	ccg	cca	gtc	cac	tcc	ggg	cgg	act	ccg	gtc	act	ggt	tac	ttc	3556
1060	K	P	P	V	H	S	G	R	T	P	V	T	G	Y	F	1074
3557	gtg	gac	ttg	aag	gag	gcc	aag	gcc	aaa	gaa	gac	cag	tgg	cga	ggg	3601
1075	V	D	L	K	E	A	K	A	K	E	D	Q	W	R	G	1089
3602	ctc	aat	gag	gcg	gct	att	aaa	aac	gta	tac	ctg	aag	ggt	cga	ggc	3646
1090	L	N	E	A	A	I	K	N	V	Y	L	K	V	R	G	1104
3647	ctc	aag	gag	ggc	gtc	agc	tac	gtg	ttc	cgt	gtt	cga	gcc	ata	aac	3691
1105	L	K	E	G	V	S	Y	V	F	R	V	R	A	I	N	1119
3692	cag	gcg	gga	ggt	ggg	aag	cca	tct	gac	ctt	gct	ggc	cct	gtt	gtg	3736
1120	Q	A	G	V	G	K	P	S	D	L	A	G	P	V	V	1134
3737	gca	gag	acc	cgt	cca	gga	acc	aaa	gag	ggt	ggt	gta	aat	gtg	gat	3781
1135	A	E	T	R	P	G	T	K	E	V	V	V	N	V	D	1149
3782	gat	gat	gga	gtc	att	tca	ttg	aac	ttc	gag	tgt	gat	aag	atg	act	3826
1150	D	D	G	V	I	S	L	N	F	E	C	D	K	M	T	1164

Exon 18

Domäne 7

Exon 19

Exon 20

Domäne 8

Exon 21

Exon 22

Domäne 9



3827	cca aag tcc gag ttc tcc tgg tcc aaa gat tat gta tcc act gag	3871
1165	P K S E F S W S K D Y V S T E	1179
3872	gac tct cca cga ttg gaa gtc gaa agc aag ggc aac aag acg aaa	3916
1180	D S P R L E V E S K G N K T K	1194
	<b>Exon 23</b>	
3917	atg acc ttc aaa gac ctt ggg atg gat gac ttg ggt att tac tct	3961
1195	M T F K D L G M D D L G I Y S	1209
3962	tgc gat gta aca gac act gat gga ata gca tca agc tac tta ata	4006
1210	C D V T D T D G I A S S Y L I	1224
4007	gat gag gaa gaa ttg aaa cgt tta ctt gct ctc agc cat gaa cac	4051
1225	D E E E L K R L L A L S H E H	1239
	<b>Exon 24</b>	
4052	aag ttc cca act gtc cca gtt aaa tca gag ttg gca gtt gaa att	4096
1240	K F P T V P V K S E L A V E I	1254
	<b>Exon 25</b>	
4097	ttg gag aaa ggc cag gtc cgg ttt tgg atg cag gct gag aaa ctg	4141
1255	L E K G Q V R F W M Q A E K L	1269
	<b>Domäne 10</b>	
4142	tct ggc aat gcc aaa gtc aac tac ata ttt aac gag aag gaa att	4186
1270	S G N A K V N Y I F N E K E I	1284
4187	ttt gaa ggc cag aaa tat aaa atg cat att gac cga aac act ggc	4231
1285	F E G P K Y K M H I D R N T G	1299
	<b>Exon 26</b>	
4232	atc atc gaa atg ttc atg gaa aag cta cag gat gag gat gag gga	4276
1300	I I E M F M E K L Q D E D E G	1314
4277	acg tac act ttc cag ctt caa gat gga aaa gca act aac cat tct	4321
1315	T Y T F Q L Q D G K A T N H S	1329
4322	act gtt gtt ctc gtt gga gat gtt ttc aaa aag ctc cag aaa gaa	4366
1330	T V V L V G D V F K K L Q K E	1344
	<b>Exon 27</b>	
4367	gct gaa ttc cag cgg caa gaa tgg atc agg aaa caa ggt cct cac	4411
1345	A E F Q R Q E W I R K Q G P H	1359
	<b>Exon 28</b>	
4412	ttt gtt gag tat ttg agc tgg gaa gtg act ggt gaa tgt aat gta	4456
1360	F V E Y L S W E V T G E C N V	1374
	<b>Domäne 11</b>	
4457	cta ttg aaa tgc aag gtg gca aat att aag aag gag act cat att	4501
1375	L L K C K V A N I K K E T H I	1389
4502	gtg tgg tac aaa gat gag agg gag ata tca gtg gat gaa aag cat	4546
1390	V W Y K D E R E I S V D E K H	1404
4547	gac ttt aag gat ggt ata tgt acc ctg ctt ata aca gag ttt tcc	4591
1405	D F K D G I C T L L I T E F S	1419
	<b>Exon 30</b>	
4592	aag aaa gat gct ggg att tat gaa gtt atc ctg aaa gat gac cga	4636
1420	K K D A G I Y E V I L K D D R	1434
4637	gga aaa gat aag agc aga ctg aag ctt gtg gat gaa gcc ttt aag	4681
1435	G K D K S R L K L V D E A F K	1449
	<b>Exon 31</b>	
4682	gaa ctg atg atg gaa gta tgc aaa aaa ata gct ttg tct gct aca	4726
1450	E L M M E V C K K I A L S A T	1464
	<b>Exon 32</b>	
4727	gac ctg aaa atc cag agc aca gcc gag ggc atc caa ctg tac tct	4771
1465	D L K I Q S T A E G I Q L Y S	1479
	<b>Domäne 12</b>	

Abbildung C.5: Humane Myomesin cDNA - Fortsetzung

4772	ttt gta act tac tat gtg gag gat ttg aaa	<b>g4802a</b>	aac tgg tcc cac	4816
1480	F V T Y Y V E D L K	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">gtt</span>	N W S H	1494
		<b>V1394I</b>		
4817	aat ggg tcc gcc att agg tac tca gac aga gtt aag acc ggg gtc	<b>Exon 33</b>	4861	
1495	N G S A I R Y S D R V K T G V		1509	
4862	act gga gag cag atc tgg cta caa atc aac gag ccc acc ccg aat		4906	
1510	T G E Q I W L Q I N E P T P N		1524	
4907	gac aaa ggg aag tat gtc atg gag ctc ttt gat ggc aaa act gga		4951	
1525	D K G K Y V M E L F D G K T G		1539	
4952	cat cag aag aca gtg gat ctc tct gga caa	<b>Exon 34</b>	4996	
1540	H Q K T V D L S G Q	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">gca tac gat gag gcc</span>	1554	
		<b>Exon 35</b>		
4997	tat gct gaa ttc cag agg ttg aaa caa gct gcc att gcc gag aaa		5041	
1555	Y A E F Q R L K Q A A I A E K		1569	
5042	aat cgt gcc cgg gtg ttg gga ggt ctc cca gac gtg gtc acc atc	<b>Exon 36</b>	5086	
1570	N R A R V L G G L P D V V T I		1584	
5087	cag gag ggg aag gcc ctt aat ctc act tgc aac gtg tgg gga gac	<b>Domäne 13</b>	5131	
1585	Q E G K A L N L T C N V W G D	<b>Exon 37</b>	1599	
5132	ccg cct ccg gag gtg tcg tgg ttg aag aac gag aag gcc ctg gcc		5176	
1600	P P P E V S W L K N E K A L A		1614	
5177	tca gac gac cac tgc aac ctc aag ttc gag gct ggg agg acc gcg		5221	
1615	S D D H C N L K F E A G R T A		1629	
5222	tac ttc acc atc aac ggc gtg agc acc gct gac tcg ggc aaa tac		5266	
1630	Y F T I N G V S T A D S G K Y		1644	
5267	ggg ctg gtt gtg aag aac aag tat ggc tcg gag acc agc gac ttc		5311	
1645	G L V V K N K Y G S E T S D F		1659	
5312	acc gtc agc gtg ttc atc cca gag gag gag gcg agg atg gcc gcc		5356	
1660	T V S V F I P E E E A R M A A		1674	
5357	ttg gag tcc ctg aaa ggt ggc aag aag gcc aag tga ccg gag gtg		5401	
1675	L E S L K G G K K A K *			
5402	cga gga gag cca gcc ggc ctg tgt gac ttg ggt gtg aat ggt ttg		5446	
5447	ggt taa gga tga gac gtc ttc atg ctt tct cct ccc tat tat ttt		5491	
5492	ctg gct tga ggg gaa aat aat gtc agg tct ttc act cat ata aaa		5536	
5537	aag cac caa cta atg aca ctt taa ttg ttt ttc ttt atc tac aaa		5581	
5582	att atg tgt taa gaa aat acc att cat agc atg aag att agg aaa		5626	
5627	cag ttt taa gga gaa gac ttg aat gaa gtt gga ggg aca ttg aat		5671	
5672	gat ggt cag agg gca gac gaa tgt gtc gtg ggg cga att ggg att		5716	
5717	tgc tgc agc tgt gaa gcc atg gcc gtg tct cgt gtg ttg tta cag		5761	
5762	agg tga tgt gct ttt cga cgg gcg cct cgt ggc ttg gaa cct cct		5806	
5807	ctg tat gaa taa aca gtt ttc acg tct		5833	

Abbildung C.6: Humane Myomesin cDNA - Fortsetzung

# Anhang D

## Sequenzalignments

(1) MSLPFYQRCHQHYDLSYRNKDVRSVSHYQREKKRRAVYTGQSTAYSSRSAAHRESEAFRRASASSQQQASO-----HALSSEVSRKAA 87  
 (2) MSLPFYQRSHQHYDLSYRNKDLRTTMSHYQQEKKRRAVYTHGSTAYSSRSLAARRQSEAFQASATSYQQQASQTYSLGASSSSRHSQSEVSRKTA 98  
 (3) MSLPFYQRSHQHYDLSYRNKDLRTTMSHYQQEKKRRAVYTHGSTAYSSRSAAHRESEALFQAASAYQQQASKAYSLG-TSSSQHYQSEVSRKTA 97  
 (4) MLKDLQIMPALQPTIAMLLQQTSAIIL-QQHI---AMALQPTTILSQQPT-AMDLQHMIMLCKVYRDLLFTVLNKLKPSARALLPIVMDLQNSTSWLQP 92  
 (5)  
 (6)  
 (7)  
 (8)

(1) SAYDYGSSHGLTDSLLDDYSSKLSPKPKRAKHSLLSGBEKENLPSDYMVPIFSGRQKHVSGITDTEEBRIKEAAAYIAQRNLLASEGITTSKQSTAS 187  
 (2) SAYDYGSHGLTDSLLLEDYSSKLSPQTKRAKR-VLSGEEETGPNGLVPIYSGQVHLSGIRDSEEBRIKEAAAYIAQRTLLASEEAIFAASKQSTAS 197  
 (3) SSYDYGSHGLTDSLLLEDYSSRSLSPQTKRAKRSLLSGETGNSLGNVMVPIYSGQVHLSGIRDSEEBRIKEAAAYIAQRTLLSEEAIMASKQSTAS 197  
 (4) TAWGRSYGLGLKDSNLMIEDQSYKMSPRAKRAKQTLVLS-EDKENEAVDYSVPIFTGREVNISGITDTEEBRIKESAAVAVAKRNLFAPGEGVSVS----- 185  
 (5)  
 (6) LLSGEEKENLPSDYMVPIFSGRQKHVSGITDTEEQRIKEAAAYIAQRNLLASEEGVT-----  
 (7)  
 (8)

(1) KQTASKQSTASKQSTASKQSTASRQSTASRQVSVSKQATSALQOEETSEKKRKKVVI REKAERLSLRKTL EETETYHAKLNEDHLL 274  
 (2) KQSATSKRTTST-----LOREETFEKKSRNIAIREKAEELSLKKTLEETQTYHGKLNEDHLL 254  
 (3) KQSTASKQSIASKQSTASKQSTASKQSTAS-----KQATSTFQOEETFERKSRNISIREKAEELSLRKTLEETQAYHGKLNEDHLL 278  
 (4) -----KVAKS-VSEEEHHEKSRKVAIRESAERVALKKTLEETQAFHKLNQDKLL 235  
 (5) QSMSTLHQEEAEFEK ADQLSLKKTLEETEAFHKLNEDHLL  
 (6) -----ASKQSVSKQSSVSKQSMSTLHQEEAEFEKSRKVAIREKADQLSLKKTLEETEAFHKLNEDNLL  
 (7)  
 (8)

**A** **B** **C** **D** **E** **F** **G**  
 (1) HAEFIIKPRSHITWKENVKKLHCSVAGWPEPELVTVYKNQVPIVNHANFGKXIIIESRYGMHTLEINACDFEDTQAYRASAMNVKGEISAYASVVVKRYKGEF 376  
 (2) HAEFIIKPRSHITWKENVKKLHCSVAGWPEPELVTVYKNQVPIVNHANFGKXIIIESRYGMHTLEISKCFEDTQAYRASAMNVQGEISAYASVVVKRYKGEEL 356  
 (3) HAEFIIKPRSHITWKENVKKLHCSVAGWPEPELVTVYKNQVPIVNHANFGKXIIIESRYGMHTLEISKCFEDTQAYRASAMNVQGEISAYASVVVKRYKGEEL 380  
 (4) HPEFVIKPSSHTIWEKQNVKFKHCTVAGWPAPELVTVYKNQVPIVYQAHFPGKYTIENRYGLSHLSLEISTCDFDDIAQYRASAMNVKGEISAYASLVVVKRYKGEI 337  
 (5) HAEPEPVIKP [ ] GTAYKNQVPIVYQAHFPGKYTIENRYGVHTELEIN [ ]  
 (6) HAEFVIKPRSHITWKENVKKLHCSVAGWPEPELVTVYKNQVPIVYQAHFPGKYTIIESRYGMHTL [ ]  
 (7)  
 (8)

(1) DETRFHAGASTMPLSFGVTPYGYASRFEIHFDD 409  
 (2) DESLLRGGVS-MPLSFAVTPYGYASKVELHFDD 388  
 (3) DSLLRGGVS-MPLSFAVTPYGYASKFEIHFDD 412  
 (4) DASYLHAGTFSMPLSLGVTPHGFASRFEIKIYVD 370  
 (5) DDTRFHSGASTLPPSX-----YASRFEI  
 (6)  
 (7)  
 (8)

**A** **B** **C** **D** **E** **F** **G**  
 (1) KFDVSFREGETMSLGRV--VITPEIKHFQHEIQWYRNGVPLSPSKWVQTLWSGERATLTFSHLNKKEDEGLYTIIRVMGEYEQYSAYVVRDADAIEGA 509  
 (2) KFDVSFREGETMSLGRV--VITPEIKHFQHEIQWYRNGVPLSPSKWVQPHWSGDRATLTFSHLNKKEDEGLYTIIRVMGEYEQYSAYVVRDADAIEGA 488  
 (3) KFDVSFREGETMSLGRV--VITPEIKHFQHEIQWYRNGVPLSPSKWVQPHWSGDRATLTFSHLNKKEDEGLYTIIRVMGEYEQYSAYVVRDADAIEGA 512  
 (4) KFEVTFREGETMSLGCIV--VISPDIKRFKHDIEWYRNGVLIITPESKVVQMHWSGERASLTLTHANKDEGLYTLRVVMGEYEEYSYGVVVRDADAIEPGA 470  
 (5) HFOHEIQXYRNGVPEI [ ]  
 (6) REGETXXVWAAGSYFTPEIKHFQHEIQWYRNGVPLSPSKWVQTHWSGDRATLTFSHLNKKEDEGLYTVRARMGEYEQYSAYVVRDADAIEGA  
 (7)  
 (8)

	A	B	C	D	E	F	G	
(1)	PAAPLDDVVKLEANKDYIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPSFGIV	637						637
(2)	PAAPLDDVVKLEANKDYIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPTGVI	616						616
(3)	PAAPLDDVVKLEANKDYIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPTGVI	640						640
(4)	PGAPLDDVVKLEANKDYIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPTGVI	598						598
(5)	PAIFPKYN	DXIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPTGVI						
(6)	PASPELDDVVKLEANKDYIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPTGVI							
(7)								
(8)								
(1)	PGPELDDVVKLEANKDYIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPTGVI	738						738
(2)	PGPELDDVVKLEANKDYIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPTGVI	717						717
(3)	PGPELDDVVKLEANKDYIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPTGVI	741						741
(4)	PGPELDDVVKLEANKDYIIILSMKQPAVDGGSPIIIGYFIDKCEVGTDSMSQCNDTIPVKFARFPVTLGIEGRSYIFRVRVAVKMGIGFSPRVSEPVAAALDPAEKARLKSRRPSPAWTGGQIIIVTEEEPTGVI	699						699
(5)								
(6)								
(7)								
(8)								
(1)	PKAFGKIIIFSRNTDTSVVVLSWESKDAKELVGYIIEASVAGSKWEPENNNPVKGRFRFCHGLVLTQSYIFRVRVAVNAAGLSEYSQDSEAI	829						829
(2)	PKAFGKIIIFSRNTDTSVVVLSWESKDAKELVGYIIEASVAGSKWEPENNNPVKGRFRFCHGLVLTQSYIFRVRVAVNAAGLSEYSQDSEAI	808						808
(3)	PKAFGKIIIFSRNTDTSVVVLSWESKDAKELVGYIIEASVAGSKWEPENNNPVKGRFRFCHGLVLTQSYIFRVRVAVNAAGLSEYSQDSEAI	832						832
(4)	PKPEGRIMTRNTDTSVVVLSWESKDAKELVGYIIEASVAGSKWEPENNNPVKGRFRFCHGLVLTQSYIFRVRVAVNAAGLSEYSQDSEAI	790						790
(5)								
(6)								
(7)								
(8)	TWTXSRRMPT--TDVSVFVWTVTESKDAKELVGYIIEASVAGSKWEPENNNPVKGRFRFCHGLVLTQSYIFRVRVAVNAAGLSEYSQDSEAI							
(1)	EVKAAIIGGGVSPDVPALSDPEPGLTASRGRVHEASPTTFQKDALGSG--KPNKPSLPSSQNLQTEVSKVSEVTEVQELTTPPKAAPQG--KSKSDP-----LKKKTRD-----AIFSP	936 (840)						936 (840)
(2)	EVKAAIIGGGVSPDVPALSDPEPGLTASRGRVHEASPTTFQKDALGSG--KPNKPSLPSSQNLQTEVSKVSEVTEVQELTTPPKAAPQG--KSKSDP-----LKKKTRD-----AIFSP	917 (819)						917 (819)
(3)	EVKAAIIGGGVSPDVPALSDPEPGLTASRGRVHEASPTTFQKDALGSG--KPNKPSLPSSQNLQTEVSKVSEVTEVQELTTPPKAAPQG--KSKSDP-----LKKKTRD-----AIFSP	940 (843)						940 (843)
(4)	EVKAAIIGGGVSPDVPALSDPEPGLTASRGRVHEASPTTFQKDALGSG--KPNKPSLPSSQNLQTEVSKVSEVTEVQELTTPPKAAPQG--KSKSDP-----LKKKTRD-----AIFSP	909 (807)						909 (807)
(5)								
(6)								
(7)								
(8)	EVKAAI-----AIFSP							
(1)	PCDITCLESEFRISVVLGMMKQPKDTGGAEITGYVYNYREVIDGVPGKWRGANVRAVSEEAAYKISNLKENMYYQFQVAAMMAGLGAHSAYSECFRCEEWITAVPG	1040 (944)						1040 (944)
(2)	PCDITCLESEFRISVVLGMMKQPKDTGGAEITGYVYNYREVIDGVPGKWRGANVRAVSEEAAYKISNLKENMYYQFQVAAMMAGLGAHSAYSECFRCEEWITAVPG	1021 (923)						1021 (923)
(3)	PCDITCLESEFRISVVLGMMKQPKDTGGAEITGYVYNYREVIDGVPGKWRGANVRAVSEEAAYKISNLKENMYYQFQVAAMMAGLGAHSAYSECFRCEEWITAVPG	1044 (947)						1044 (947)
(4)	PCDITCLESEFRISVVLGMMKQPKDTGGAEITGYVYNYREVIDGVPGKWRGANVRAVSEEAAYKISNLKENMYYQFQVAAMMAGLGAHSAYSECFRCEEWITAVPG	1013 (911)						1013 (911)
(5)								
(6)								
(7)								
(8)	PCDITCLESEFRISVVLGMMKQPKDTGGAEITGYVYNYREVIDGVPGKWRGANVRAVSEEAAYKISNLKENMYYQFQVAAMMAGLGAHSAYSECFRCEEWITAVPG							
(1)	PPHSEKCSVFRKHSIVLQKPPVHSGRTPVTGYFVLDLQKAKAKEDQWRGNEAATKMYLKVRLKGGVSYVFRVRAINQAGVGRHSDLAGPVVAE	1136 (1040)						1136 (1040)
(2)	PPHSEKCSVFRKHSIVLQKPPVHSGRTPVTGYFVLDLQKAKAKEDQWRGNEAATKMYLKVRLKGGVSYVFRVRAINQAGVGRHSDLAGPVVAE	1117 (1019)						1117 (1019)
(3)	PPHSEKCSVFRKHSIVLQKPPVHSGRTPVTGYFVLDLQKAKAKEDQWRGNEAATKMYLKVRLKGGVSYVFRVRAINQAGVGRHSDLAGPVVAE	1140 (1043)						1140 (1043)
(4)	PPHSEKCSVFRKHSIVLQKPPVHSGRTPVTGYFVLDLQKAKAKEDQWRGNEAATKMYLKVRLKGGVSYVFRVRAINQAGVGRHSDLAGPVVAE	1109 (1007)						1109 (1007)
(5)								
(6)								
(7)								
(8)								

! EH-Insertion

	A	B	C	D	E	F	G	
(1)	TRPCTKEVVVVVDDGGVLSLNFECDQMTPKSEFVMSKDVSTEDSRLEVESKGNKTKMTFKDLGMDDIGIYSCDVTPDGIASSYLIDEEELRLLALSHEHKFP							1242 (1146)
(2)	TRPCTKEVVVSVDDGGVLSLNFECDQMTPKSEFVMSKDVSTEDSRLEVESKGNKTKMTFKDLGTDDIGIYSCDVTPDGIASSYLIDEEEMRLLALSQEHKFP							1223 (1125)
(3)	TRPCTKEVVVVDDGGVLSLNFECDQMTPKSEFVMSKDVSTEDSRLEVESKGNKTKMFKDLGPDIDIGIYSCDVTPDGIASSYLIDEEEMRLLALSQEHKFP							1246 (1149)
(4)	TRPCTKEMVVVVDDGGVLSLNFECDQMSNSKFFVMSKNYVEPIEDDSRLDIDSKGKSKAVFKDLGEDDIIIGIYSCVTPDGIYSSGYTIDEEEMRLLALSHEHKFP				MTFK			1215 (1113)
(5)								
(6)								
(7)								
(8)								TRPDNKYP
(1)	TVVPKSELAVEIIEKGOVRFWMOAEKLSGNAKVNVI FNEKEIIEFEGPKVKMHI DRNTGIIEMFWEKLODEDEGTYTFQIQDGKATNHSVVVLVGDVFKKIQKEAEFORQEWIRKQ							1356 (1260)
(2)	TVPTKSELAVEIIEKGOVRFWMOAEKLSNAKVSYI FNEKEIIEFEGPKVKMHI DRNTGIIEMFWEKLODEDEGIYTFQIQDGKATGHSITLVLIGDVKKIQKEAEFORQEWIRKQ							1337 (1239)
(3)	TVPTKSELAVEIIEKGOVRFWMOAEKLSGNAKVNVI FNEKEIIEFEGPKVKMHI DRNTGIIEMFWEKLODEDEGTYTFQIQDGKATGHSITLVLIGDVKKIQKEAEFORQEWIRKQ							1360 (1263)
(4)	TIFLASELAVEIIEKGEVRFWLOAEKLSGNAKANFVFNKDEIIEFNGEKVKMVDQHTGLVEMIMDKLEDKDEGIYTFQIQDGKATNQSLLVLIGDVKKLRDEAEFORQEWIRKQ							1329 (1227)
(5)								
(6)								
(7)								
(8)	VIFPKSELAVEIIEKGEVRFWMOAEKLSANANVNHVFNDEKIEIKDGDYKMSMDRNTGIVOMVMEKLEDEDEGTTFEQIQDGKATNQSLLVLIGDVKKLRDEAEFORQEWIRKQ							
(1)	GPHFVEYLSWEVTEGCVNLLKCKVANI KKETHTI VWYKDEREISVDEKHDKFDGICTLLIITFEFSKKDAGIYEVILKDRGKDKSRLLKLVDEAR							1459 (1363)
(2)	GPHFVYLSWEVTEGCVNLLKCKVANI KKETHTI VWYKDEREISVDEKHDKFDGICTLLIITFEFSKKDAGIYEVILKDRGKDKSRLLKLVDEAR							1440 (1342)
(3)	GPHFVYLSWEVTEGCVNLLKCKVANI KKETHTI VWYKDEREISVDEKHDKFDGICTLLIITFEFSKKDAGIYEVILKDRGKDKSRLLKLVDEAR							1463 (1366)
(4)	GPHFVEQLGWTEVTEGCVNMLKCKVANI KKETHTI VWYKDRREIMVDEEHDKFDGCVCTLLISEFSSKDDTGIYEVILKDRGKDI SELKLTDKAFADLMNEVCRRI							1432 (1330)
(5)								
(6)								
(7)								
(8)	GPHFVEYLGWEVTPENVLLKSKVANI KNETSISWYKDEREIMEDKHEFKDGYCTLLIITFEFTKKDAGYVELLILKDRGKDKSVLKLMDSAFDELMSAVCKSI							
(1)	ALSATDLKIQSTAFEGIRLYSFVTVYVEDIKVNSHNGSAIRYSRVRKTVGVTGEQIWLQINEPTNDKGRYVMELFDGKTGHQKTVDSLQOAYDEAYAEFQRLKQAAIAEK							1569 (1473)
(2)	ALSATDLKIQSTAFEGIRLYSFVTVYVEDIKVNSHNGTGIKYTRVRKSVGVTGEQIWLQINEPTNDKGRYVMELFDGKTGHQKTVDSLQOAYDEAFAEFQRLKQAAIAEK							1550 (1452)
(3)	ALSATDLKIQSTAFEGIRLYSFVTVYVEDIKVNSHNGTGIKYTRVRKSVGVTGEQIWLQINEPTNDKGRYVMELFDGKTGHQKTVDSLQOAYDEAFAEFQRLKQAAIAEK							1573 (1476)
(4)	DLYATDLKIQSTAFEGIRLYSFVTVYVEDIRVGVVHNDIQRIFTRVRKTVGVTGEQIWLQINEPTQDKGRYTMELFDGKTGHKKTVDSLQOAYDEAFAEFQRLKQAAIAEK							1542 (1440)
(5)								
(6)								
(7)								
(8)	AESASQLKIQSNEQIRLYIFVNVYVEDIKVNSWDHNDIKIKYTRRGGK						SLQAYEEFAFAEFQRLKQAAIAEK	
(1)	NRARVLGGLPDVTIQEGRKALNLTFCNVWGDPPPHEVSWLKNERALASDDHCNLRKFEAGRTAFYFTINGVSTADSGKYLGVVKNKYGSETS							1657 (1561)
(2)	NRARVLGGLPDVTIQEGRKALNLTFCNVWGDPPPHEVSWLKNEKPLTSDHCSLKHAEAGRTAFYFTISGVSTADSGRYGLVVKNKYGSETS							1638 (1540)
(3)	NRARVLGGLPDVTIQEGRKALNLTFCNVWGDPTHEVSWLKNERPLTSDHCSLKHAEAGRTAFYFTISGVSTADSGRYGLVVKNKYGSETS							1661 (1564)
(4)	NRARVLGGLPDVTIQEGRKALNLTFCNVWGDPTHEVSWLKNERKSFVSDANCLRHESGRNVFITSASVTLDSGRYSLVVKNKYGSETS							1630 (1528)
(5)	NRARVVGGLPDVVTIQECK		LLASDEHXNLK				YGSEIS	
(6)								
(7)	NRARVVGGLPDVVTIQECKALNLTFCNVWGDPTHEVSWLKNEKLLASDEHONLMEAEAGRTAFYFTISGVSTADSGRYGLVVKNKYGSETS							
(8)								
(1)	DFTVSVFIP-----EEEARMAALESKGGKRAK							1685 (1589)
(2)	DFTVSVFIP-----EELRKGAMEPPKGNQKSK							1666 (1568)
(3)	DFTVSVFIP-----EEEARKGASEPPKGNQKSK							1689 (1592)
(4)	DVTVIVITVSGQTDAKHVSVSQQSNNITVSKKKAATTMSRPPQEEKDKIKPYVDEI IATFEETPDSKEI PRVEKEKTKSNQQTAKTHGKAAAARTVP							1732 (1630)
(5)	DFTVSVFIP-----EEARSVA							
(6)								
(7)	DFTVSVFIP-----DEDARQGVFEPP							



# Anhang E

## Vektorkarten



Name des Plasmids: **pET23aEEF**

Länge: 3,6 kb

Herkunft: Firma Novagen (pET23a)

T7 Promotor

His6-Tag, EEF-Immuntag

F1 Origin

Ampicillin Resistenzgen

```

                                T7 Promotor
                                ───────────────────────────────────▶
BglIII
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC

XbaI                               rbs           NdeI  MluI      SalI
TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACGCGTTTGTGCGAC

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

                                T7-Terminator
CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT
    
```

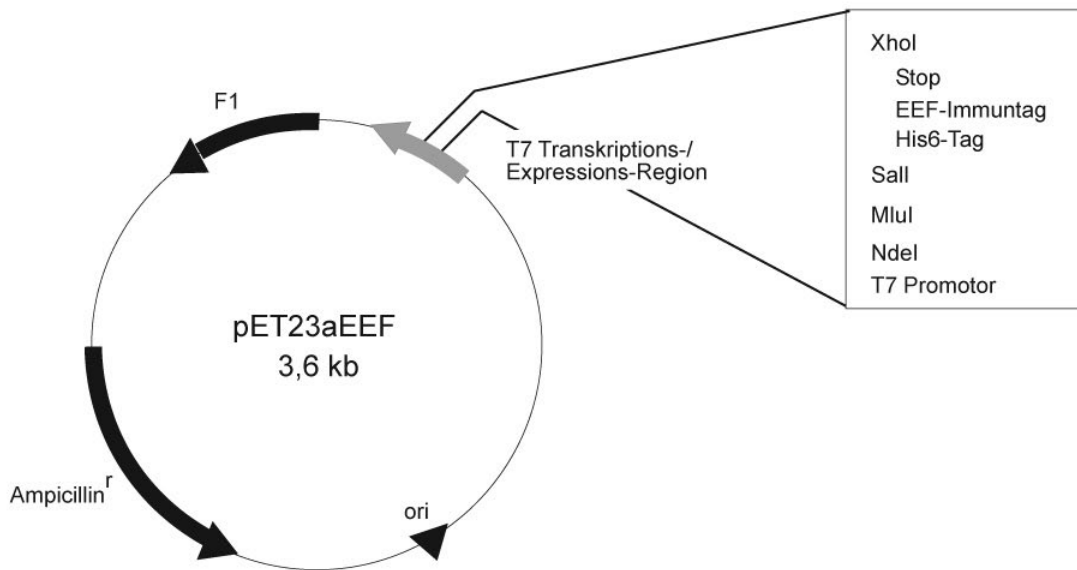


Abbildung E.1: Vektorkarte pET23aEEF

Name des Plasmids: **pET23aT7**

Länge: 3,7 kb

Herkunft: Firma Novagen (pET23a)

T7 Promotor

His6-Tag, T7-Immuntag

F1 Origin

Ampicillin Resistenzgen

```

                                T7 Promotor
                                →
BglIII
AGATCTCGATCCC GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC

XbaI                               rbs           NdeI  NheI
TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACT
                                M A S M T

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

XhoI       His6-Tag
CTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCC GAAAGGAAG
L E H H H H H Stop

                                T7-Terminator
CTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAA
ACGGGTCTTGAGGGGT
    
```

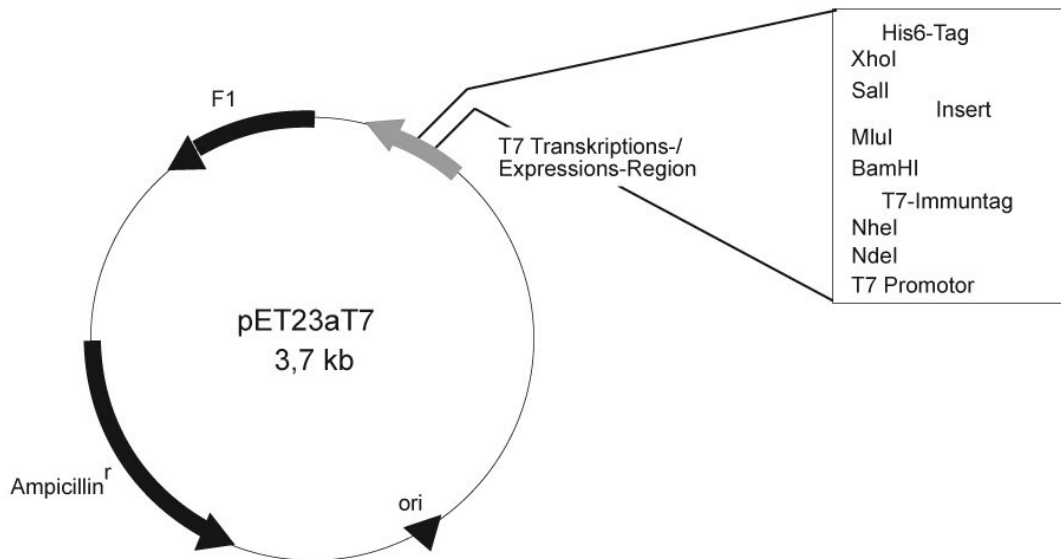


Abbildung E.2: Vektorkarte pET23aT7

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 SalI Stop

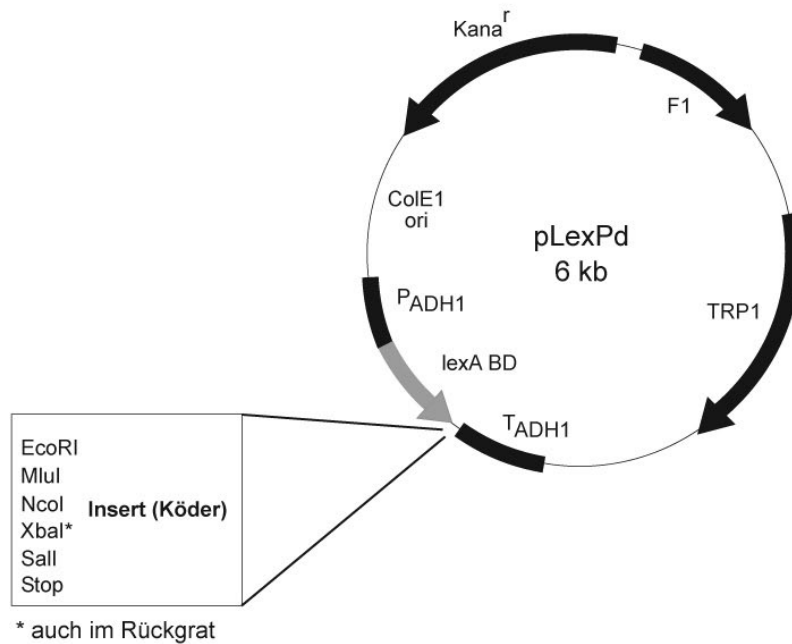


Abbildung E.3: Vektorkarte pET23aEEF

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 Promoter  
 F1 Origin  
 Ampicillin Resistenzgen  
 EGFP +  
 Klonierungskassette

PagI cloned into NcoI

```

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

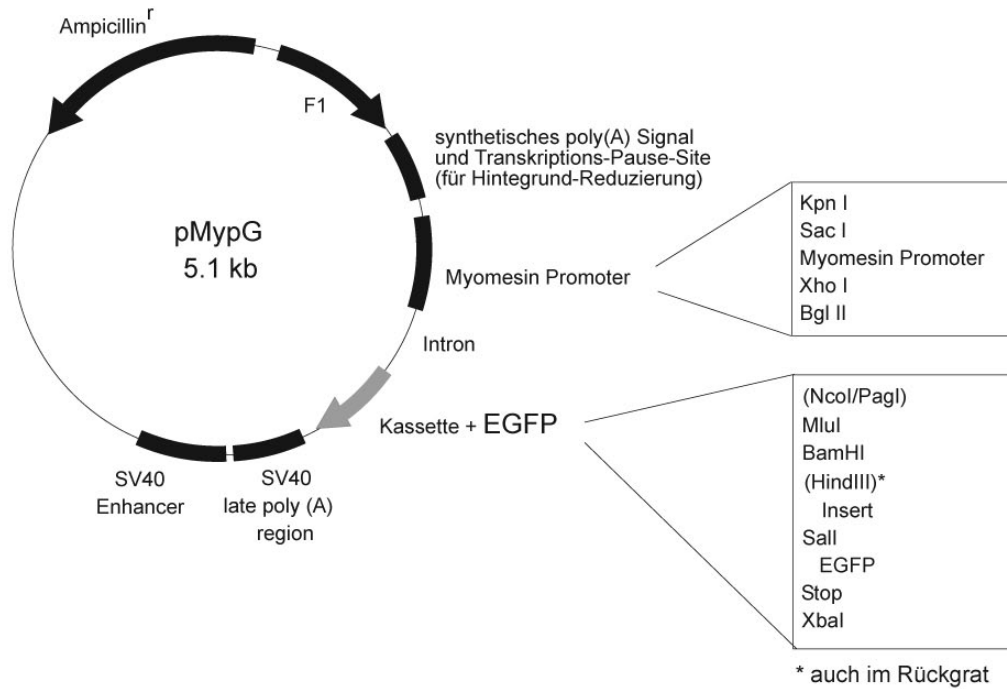


Abbildung E.4: Vektorkarte pMypG

Name des Plasmids: **pMypM**  
 Länge: 4,4 kb  
 Herkunft: Firma Promega (pCAT3-Enhancer)

Synthetisches poly(A) Signal und Transkriptions-Pause-Site  
 SV40 Enhancer  
 SV40 late poly(A) region  
 Myomesin Promoter  
 F1 Origin  
 Ampicillin Resistenzgen  
 c-myc Immuntag + Klonierungskassette

**c-myc Immuntag**

HindIII-ATG-CAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTGTTC-EcoRI-MluI-SalI-STOP-XbaI  
 L D E E S I L K Q E

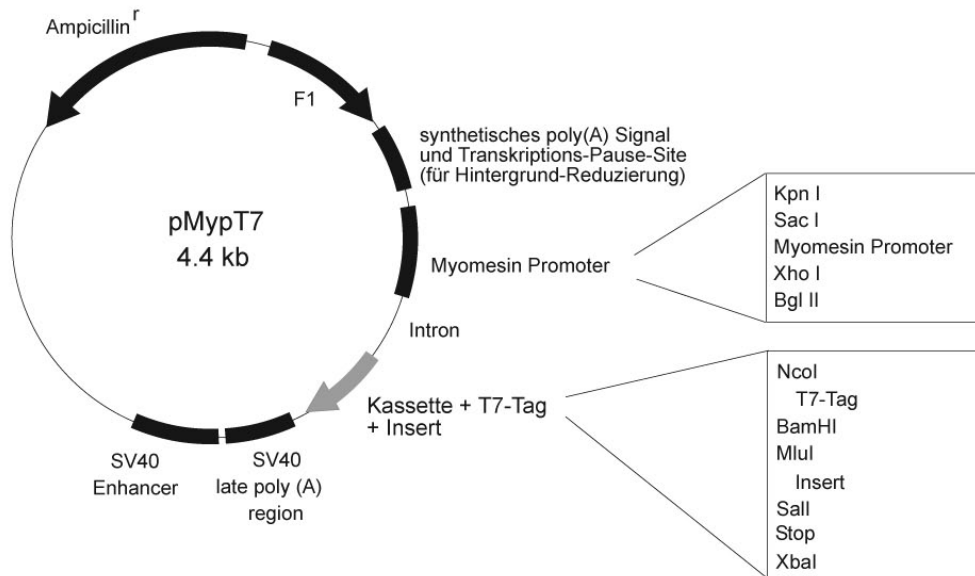


Abbildung E.5: Vektorkarte pMypM

Name des Plasmids: **pMypT7**  
 Länge: 4,4 kb  
 Herkunft: Firma Promega (pCAT3-Enhancer)

Synthetisches poly(A) Signal und Transkriptions-Pause-Site  
 SV40 Enhancer  
 SV40 late poly(A) region  
 Myomesin Promoter  
 F1 Origin  
 Ampicillin Resistenzgen  
 T7-Immuntag + Klonierungskassette

**T7-Immuntag**

NcoI NheI  
 CCATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCG  
 GGTACCGATCGTACTGACCACCTGTCGTTTACCCAGCG  
   M  A  S  M  T  G  G  Q  Q  M  G  R

BamHI MluI  
 GGATCCACGCGT - INSERT -  
 CCTAGGTGCGCA  
   G  S  T  R

SalI     XbaI  
 GTCGACTGATCTAGA  
 CAGCTGACTAGATCT  
   V  D  Stop

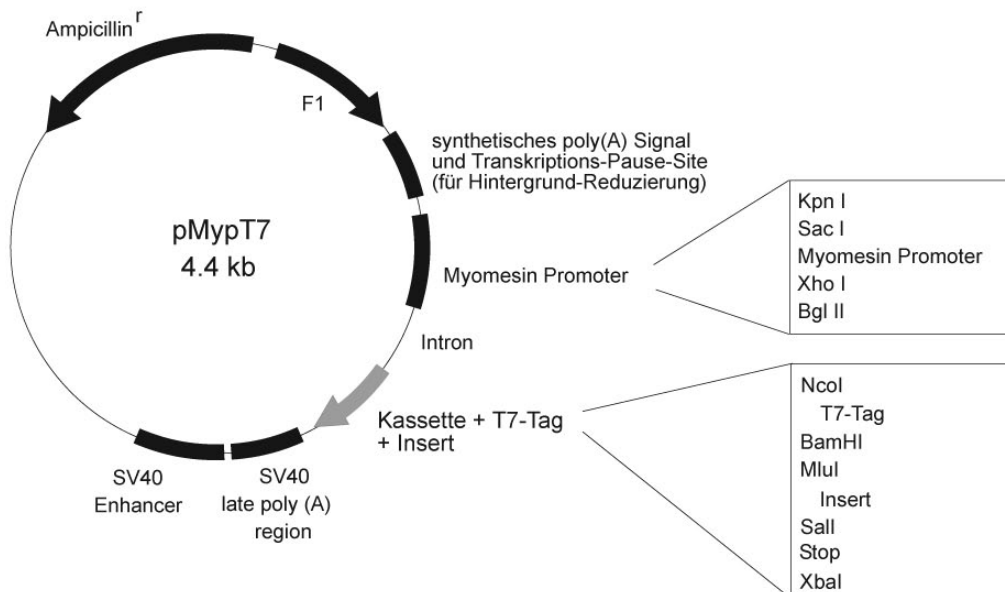


Abbildung E.6: Vektorkarte pMypT7

Name des Plasmids: **pCMV5-T7**

Länge: 4,7 kb

CMV Promotor  
 T7-Immuntag + Klonierungskassette  
 SV40 ori  
 Ampicillin Resistenzgen  
 F1 Origin

EcoRI **T7-Immuntag**  
 GAATTCATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCG  
 CTTAAGTACCGATCGTACTGACCACCTGTCGTTTACCCAGCG  
 M A S M T G G Q Q M G R

BamHI MluI HindIII SalI  
 CGCGGATCCACGCGTAAGCTTGTGCGACTGATAGAGGGGG  
 GCGCCTAGGTGCGCATTTCGAACAGCTGACTATCTCCCC

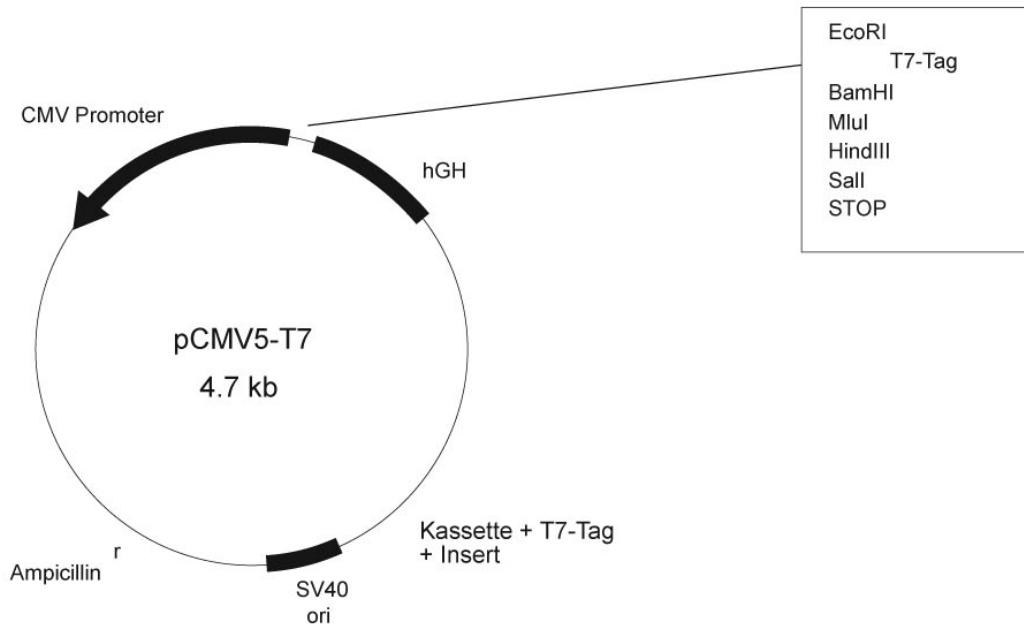


Abbildung E.7: Vektorkarte pCMV5-T7

# Anhang F

## Kinase-Erkennungssequenzen in My1



Kinase	Aminosäure	Sequenzmotiv
CaMKII	S-58	RRESEAF
	S-65	RRASASS
	T-215	RQSTASR
CKII	S-88	KAASAYD
	S-125	SLLSGEE
	T-152	SGITDTE
	T-257	LRKTL EE
PKA	T-25	RSTVSH
	S-51	RSSAAH
	S-58	RRESEAF
	S-65	RRASASS
	T-215	RQSTASR
	S-220	RQSVVS
	S-253	RLSLRK
	T-257	RKTL EE
PKC	S-16	YDLSYRN
	S-47	TAYSSRS
	S-83	SEVSRKA
	S-109	DDYSSKL
	S-113	SKLSPKP
	S-142	PIFSGRQ
	T-180	GITTSKQ
	S-236	EETSEKK
	S-240	EKKSRKV
	S-253	ERLSLRK
PKG	S-36	KKRSVY
	S-58	RRESEAF
	S-65	RRASASS

Tabelle F.1: **Potentielle Phosphorylierungsstellen in My1 von ausgewählten Proteinkinase.** Die Position der möglicherweise phosphorylierten Aminosäure ist angegeben. Daneben wird die entsprechende Erkennungssequenz der jeweiligen Proteinkinase gezeigt. Verwendete Abkürzungen: CaMKII, Calmodulin-abhängige Kinase II, CKII, Caseinkinase II; PKA, Proteinkinase A; PKC, Proteinkinase C; PKG, Proteinkinase G.

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit weder bei der Universität Potsdam noch bei anderen wissenschaftlichen Einrichtungen eingereicht habe, um zu promovieren.

Weiterhin erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne andere Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verfaßt habe.

Berlin, den

Mirko Himmel

# Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. O. Fürst sehr für die Betreuung und seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der Bearbeitung dieses interessanten Themas.

Meinen Laborkollegen gilt es Dank zu sagen für ihre Unterstützung bei den Fragen und Problemen des Alltags. Die Technischen Assistentinnen Frau Anita Guhlan und Frau Bärbel Mai haben mir oft und gerne geholfen (mit Medium und Schokolade). Ihnen danke ich sehr herzlich für die gemeinsame Zeit am Standort *Villa Liegnitz*.

Herr Dr. P. van der Ven stand mir stets hilfsbereit zur Seite, wenn es zu klonieren oder diskutieren galt. Frau Dr. K. Hayeß bildete mit mir zusammen die biochemische Fraktion der Arbeitsgruppe. Ich bin ihr für ihre Unterstützung sehr dankbar.

Bei den Doktoranden Katja Gehmlich, Dirk Pacholsky und Pathoo Vakeel möchte ich mich für Beistand und Hilfe, aber auch den gemeinsam erzeugten Spaß bedanken. An letzterem Prozeß aktiv beteiligt waren auch die Diplomanden Stefan Eulitz und Thomas Löwe. Stefan danke ich sehr für die vielen wissenschaftlichen Gespräche, und bei Thomas möchte ich mich für die Filamin-Infektion entschuldigen.

Die *befreundete Arbeitsgruppe*, allesamt Tierphysiologen, war mir stets eine Freude und öfter auch eine Hilfe. Ich danke daher Prof. B. Walz und Herrn PD. O. Baumann für die mir gewährte Unterstützung. An dieser Stelle gilt es natürlich Dank zu sagen an die Liegnitz-Gang, die sich aus folgenden Untereinheiten zusammensetzte: Petra Dames, Kathleen Führer, Susanna Marg, Julia Rein, Kathrin Stehr, Jana Schlenstedt sowie Ruth Schmidt und Carsten Hille, Christian Hinnerichs, Piotr Kos sowie Christian Krach. Dr. Wolfgang Blenau und Dr. Stefan Boese danke ich für die Gesprächsbereitschaft.

Prof. R. Seckler und seinen Mitarbeitern Alexander Freiberg und Benjamin Heinz sei gedankt für die Gewährung kostbarer Meßzeit und für die Diskussionen, die wir über die Sekundärstrukturen einiger ausgewählter Zytoskelettproteine führten. Die spektroskopischen Ratschläge waren uns Proteinpanschern stets hilfreich.

# Lebenslauf

<b>Name</b>	Mirko Himmel
<b>Geburtsdatum</b>	05.05.1975
<b>Geburtsort</b>	Berlin-Spandau
 <b>Berufliche Tätigkeit</b>	
2000-2004	Wissenschaftlicher Angestellter und Promotionsstudent am Lehrstuhl für Zellbiologie, Universität Potsdam
 <b>Studium</b>	
1994-2000	Studium Biochemie, Universität Potsdam Diplomarbeit: <i>Protein-Protein-Interaktionen der sarko- meren Filamin-Isoform</i> Abschluß: Diplom-Biochemiker
 <b>Wehrersatzdienst</b>	
1993-2000	Katastrophenschutz (Deutsches Rotes Kreuz)
 <b>Schulbildung</b>	
1987-1994	Freiherr-vom-Stein Gymnasium, Berlin Abschluß: Abitur
1981-1987	Klosterfeld-Grundschule, Berlin