

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte während der Muskelentwicklung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam
vorgelegt von
Dirk Pacholsky
aus Berlin

Potsdam 2003

Diese Arbeit wurde unter experimenteller Anleitung von Prof. Dr. D.O. Fürst am Institut für Biochemie und Biologie, Abt. Zellbiologie an der Universität Potsdam angefertigt.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	iii
II	Abbildungsverzeichnis	vii
III	Tabellenverzeichnis	ix
IV	Abkürzungsverzeichnis	x
1	Einleitung	2
1.1	Das Zytoskelett	2
1.2	G- und F-Aktin	2
1.3	Aktinbindende Proteine und ihre Funktionen	4
1.4	Das Aktinzytoskelett in Muskelzellen und kultivierten Nichtmuskelzellen	7
1.4.1	Organisation von Myofibrillen	7
1.4.2	Myofibrillogenese	10
1.4.3	Das Aktinzytoskelett in kultivierten Nichtmuskelzellen	11
1.5	Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen	12
1.5.1	Fokalkontakte	14
1.5.2	Muskel-Sehnen-Verbindungen	16
1.5.3	Glanzstreifen	18
1.5.4	Costamere	19
1.6	Die Funktion der extrazellulären Matrix in Skelett- und Herzmuskulatur	20
1.7	Die Zielstellung der Arbeit oder die Frage nach dem Xin	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.2	Bakterienstämme	23
2.1.3	Antibiotika	23
2.1.4	Vektoren	24
2.2	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	25
2.2.2	Restriktionsverdau von DNA	25
2.2.3	Desphosphorylierung der 5'-Enden der Plasmid-DNA	26
2.2.4	Ligation von Insert und Plasmid	26
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	26
2.2.6	Hitzeschock-vermittelte Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid - DNA	26

2.2.7	Übernacht-Kultur von <i>E. coli</i>	27
2.2.8	Plasmidpräparationen aus <i>E. coli</i>	27
2.2.9	Mini-Plasmidpräparation	27
2.2.10	Midi Plasmidpräparation	28
2.2.11	Agarosegelelektrophorese	28
2.2.12	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	28
2.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	29
2.3.1	Expression und Präparation rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	29
2.3.2	Präparation von Aktin aus Muskelgewebe	30
2.3.3	Aktinbindungsassay	31
2.3.4	Proteinextraktion aus Zellkulturzellen	32
2.3.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	32
2.3.6	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele	32
2.3.7	Proteintransfer	33
2.3.8	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulose	33
2.3.9	Antikörper-Antigen-Bindungsassay	34
2.4	Histologische und immunhistologische Methoden und Mikroskopie	34
2.4.1	Präparation von Gefrierschnitten	34
2.4.2	Präparation von Zellen	34
2.4.3	Indirekte Immunfluoreszenz	34
2.4.4	Mikroskopie und Bildbearbeitung	35
2.5	Zellkultur von Säugerzellen	35
2.5.1	Auftauen, Passagierung und Einfrieren von Zellen	35
2.5.2	<i>In vitro</i> Kultur von A7r5-Zellen	36
2.5.3	<i>In vitro</i> Kultur von B16F1-Zellen	37
2.5.4	<i>In vitro</i> Kultur von Humanen Skelettmuskelzellen	37
2.5.5	<i>In vitro</i> Kultur von PtK2-Zellen	38
2.6	Transiente Transfektionen von Säugerzellen	38
2.6.1	Transfektionen mit FuGENE 6	38
2.6.2	Transfektionen mit Superfect	39
2.7	Latrunculin-A-Behandlung der Zellen	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Sequenzanalyse von hXirp1 und hXirp2	41
3.1.1	Analyse der Nukleotidsequenz für hXirp1	41

3.1.2	Analyse der Nukleotidsequenz für hXirp2.....	42
3.1.3	Die charakteristischen repetitiven Motive in hXirp1 und hXirp2.....	42
3.1.4	Prolinreiche Sequenzmotive in hXirp1 und hXirp2.....	46
3.1.4.1	Ligandenmotive für EVH1-Domänen.....	46
3.1.4.2	Putative Ligandenmotive für SH3-Domänen.....	47
3.1.4.3	Putative Ligandenmotive für WW-Domänen.....	48
3.1.5	C-terminale Heptadenmotive in hXirp1 und hXirp2.....	49
3.1.6	Putative Phosphonukleotidbindungstelle in hXirp1 und hXirp2.....	50
3.1.7	Putatives DNA-Bindungsmotiv in hXirp1 und hXirp2.....	50
3.1.8	Weitere Motive in hXirp1 und hXirp2.....	51
3.2	Herstellung rekombinanter hXirp-Konstrukte	51
3.3	Immunologische Untersuchungen zur Lokalisation und Expression von Xirp in Muskelgewebeschnitten und Humanen Skelettmuskel-Zellen	53
3.3.1	Überprüfung der Immunreaktivität der Seren gegen hXirp1	53
3.3.2	Lokalisation von Xirp1 im Herz- und Skelettmuskel der Ratte durch hXirp1-Antiseren.....	57
3.3.3	Lokalisation und Expression von hXirp1 in Humanen-Skelettmuskel-Zellen	59
3.3.3.1	Zeitliche Expression von hXirp1 in Humanen-Skelettmuskel-Zellen	60
3.3.3.2	Zeitliche und räumliche Expression und Lokalisation von hXirp1 in Humanen Skelettmuskel-Zellen.....	61
3.4	Transiente Transfektionen mit hXirp Konstrukten in kultivierten Säugerzellen.....	64
3.4.1	Transfektionen mit hXirp1-L, -S und -N in A7r5-, PtK2- und B16F1- Zellen	65
3.4.2	Transfektionen mit hXirp1 Konstrukten mit prolinreichen Motiven.....	70
3.4.3	Transfektionen mit hXirp1-Y und -FC.....	72
3.4.4	Transfektion von hXirp1 Konstrukten in Humanen-Skelettmuskel-Zellen	75
3.4.5	Transfektion von hXirp2-28rM Konstrukten in A7r5 -Zellen	78
3.5	Aktinbindung der repetitiven Motive von hXirp1 und hXirp2	79
3.5.1	Aufreinigung und Darstellung der verwendeten Motiv-Konstrukte	81
3.5.2	F-Aktinbindung von 18 repetitiven Motiven von hXirp1	82
3.5.3	F-Aktinbindung von sechs repetitiven Motiven von hXirp1	84
3.5.4	F-Aktinbindung von drei bzw. zwei repetitiven Motiven von hXirp1	85

3.5.5	F-Aktinbindung von 28 repetitiven Motiven von hXirp2	87
3.5.6	Stabilisierung von Aktinfilamenten durch hXirp	88
3.6	Einfluß von Langzeitkulturbedingungen und Myogenisierung der A7r5-Zellen auf Expression von Xirp	92
3.6.1	Einfluß des Kulturmediums auf A7r5-Zellen	92
3.6.1.1	Einfluß des Kulturmediums auf Fokalkontakte der A7r5-Zellen	92
3.6.1.2	Einfluß des Kulturmediums auf Expression und Lokalisation von hXirp1-S	93
3.6.2	Einfluß einer Myogenisierung auf A7r5-Zellen und Expression von Xirp	93
3.6.2.1	Einfluß der Myogenisierung auf A7r5-Zellen und Expression von hXirp1-S	93
3.6.2.2	Expression von endogenem rXirp in myogenisierten A7r5-Zellen	94
4	Diskussion	100
4.1	Xirp ein Multidomänenprotein mit charakteristischen repetitiven Motiven	100
4.1.1	Vergleich der Sequenzen innerhalb der Xirp-Familie	100
4.1.2	Die repetitiven Motive der Xirp Familie	101
4.1.3	Die prolinreichen Motive der Xirp-Familie	103
4.1.4	Die Heptaden Motive in Xirp	104
4.1.5	Das P-Loop Motiv in Xirp	105
4.1.6	Interaktion von Xirp mit Filaminen	105
4.2	Xirp bindet und stabilisiert F-Aktin	106
4.3	Lokalisationen von Xirp in Muskelgewebe und Kulturzellen	109
4.3.1	Lokalisationen von Xirp in Muskelzellen	109
	Xirp ist Bestandteil der Adhärenzverbindungen im quergestreiften Muskel	109
	Xirp ist in den Z-Scheiben der Myofibrillen präsent	111
4.3.2	Lokalisationen von ektopisch exprimiertem Xirp in Kulturzellen	112
	Lokalisation von Xirp an Fokalkontakten	112
	Lokalisation von Xirp in Streßfasern	113
4.4	Xirp – Implikationen in Myogenese und Myofibrillogenese	114
4.5	Fazit und Ausblick für Xirp	118
5	Anhang	121
6	Referenzen	132

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Übersicht zu G- und F-Aktin.....	3
Abb. 2 Übersicht zum Aufbau des Skelettmuskels.....	9
Abb. 3 Fokalkontakt und Strebfasern.....	14
Abb. 4 Übersicht zu Muskel-Sehnen-Verbindung in Skelettmuskel und Glanzstreifen im Herzmuskel.....	17
Abb. 5 Schematische Darstellung von humanem hXirp1 und hXirp2.....	43
Abb. 6 Immunreaktivität der α X1rep -Antiseren.....	54
Abb. 7 Antikörper-Antigen-Bindungsassay für das Antiserum α X1rep1.....	55
Abb. 8 Antikörper-Antigen-Bindungsassay auf Westernblot.....	56
Abb. 9 Westernblotanalyse der ektopisch exprimierten hXirp1-S und -L.....	56
Abb. 10 Detektion von in A7r5-Zellen ektopisch exprimiertem hXirp1-L durch α X1rep2....	57
Abb. 11 Immunlokalisation von Xirp1 im Herzmuskel und M. soleus der Ratte.....	58
Abb. 12 Immunlokalisation von Xirp1 in Muskel-Sehnen-Verbindung.....	59
Abb. 13 Zeitlicher Expressionsstatus von hXirp1 in HSkM-Zellen.....	60
Abb. 14 Zeitliche und räumliche Expressionmuster von hXirp1 in HSkM (1).....	62
Abb. 15 Zeitliche und räumliche Expressionmuster von hXirp1 in HSkM (2).....	63
Abb. 16 Transfektion von PtK2-Zellen mit hXirp1-L.....	66
Abb. 17 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-S.....	67
Abb. 18 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-N.....	67
Abb. 19 Transfektion von B16F1-Zellen mit hXirp1-S.....	69
Abb. 20 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-NPP-DBD.....	70
Abb. 21 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-757-1162.....	71
Abb. 22 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-CPP.....	72
Abb. 23 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-CPP-CC.....	72
Abb. 24 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-Y.....	73
Abb. 25 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-FC.....	74
Abb. 26 Doppeltransfektion von PtK2-Zellen mit hXirp1-FC und FlnC-d19-21.....	75
Abb. 27 Zelluläre Lokalisation von hXirp1-N in HSkM, Differenzierungstag 2.....	76
Abb. 28 Zelluläre Lokalisation von hXirp1-L in HSkM, Differenzierungstag 6.....	77
Abb. 29 Zelluläre Lokalisation von hXirp1-Y in HSkM, Differenzierungstag 6.....	78
Abb. 30 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp2-28rM.....	79

Abb. 31 Darstellung der aufgereinigten hXirp-Polypeptide	81
Abb. 32 Aktinkosedimentationsassay mit hXirp1-18rM	82
Abb. 33 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-18rM.....	83
Abb. 34 Aktinkosedimentationsassay mit hXirp1-6rM	84
Abb. 35 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-6rM.....	85
Abb. 36 Aktinkosedidmentationsassay mit hXirp1-2rM und -3rM	85
Abb. 37Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-3rM.....	86
Abb. 38 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-2rM.....	86
Abb. 39 Aktinkosedimentationsassay mit hXirp2-28rM	87
Abb. 40 hXirp1-S stabilisiert in Lat-A behandelten A7r5 das F-Aktinzytoskelett.....	91
Abb. 41 Transfektionen mit hXirp1-S in A7r5-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen	97
Abb. 42 Transfektionen mit hXirp1-S in myogenisierten A7r5-Zellen.....	98
Abb. 43 Expression von endogenem rXirp in myogenisierten A7r5-Zellen.....	99
Abb. 44 Schematische Darstellung von humanem hXirp1 und hXirp2.....	121
Abb. 45 Schematische Übersicht der hergestellten hXirp-Konstrukte.....	122
Abb. 46 Aminosäuresequenz für hXirp1.....	123
Abb. 47 Vorläufige Aminosäuresequenz für hXirp2	124
Abb. 48 Die repetitiven Motive von hXirp1	125
Abb. 49 Die repetitiven Motive von hXirp2	126
Abb. 50 Schematische Übersicht zum Vektor pCMV5FS.....	129
Abb. 51 Schematische Übersicht zum Vektor pMyP-G	130
Abb. 52 Schematische Übersicht zum Vektor pET-23W2	131

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht zu den verschiedenen aktinbindenden Proteinen.....	5
Tab. 2 Übersicht zu den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen	13
Tab. 3 Das 16-AS-Motiv in hXirp1 und hXirp2	44
Tab. 4 Das erweiterte Aminosäuremotiv in hXirp1 und hXirp2.....	45
Tab. 5 Ligandenmotive für EVH1, SH3 und WW –Domänen	46
Tab. 6 Prolinreiche Motive in hXirp1 und hXirp2.....	48
Tab. 7 Heptaden enthaltende Sequenzen in hXirp1 und hXirp2.....	50
Tab. 8 Putatives DNA-Bindungsmotiv in hXirp1 und hXirp2.....	51
Tab. 9 Übersicht zu den hergestellten hXirp Konstrukten	52
Tab. 10 Übersicht der putativen Phosphonukleotidbindungsstelle	105
Tab. 11 Sequenzvergleich der potentiellen Filaminbindungsregionen	106
Tab. 12 Auflistung der Primersequenzen zur Klonierung verschiedener hXirp-Konstrukte.	127
Tab. 13 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper	128

IV Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	µl	Mikroliter
AK	Antikörper	Mr	Molekulargewicht
APS	Ammoniumpersulfat	mRNA	messenger RNA
ATP	Adenosin 5'Triphosphat	nm	nanometer
ADP	Adenosin 5'Diphosphat	OD	Optische Dichte
AS	Aminosäure	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
bp	Basenpaar(e)	PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)	PO	Peroxidase
bzw.	beziehungsweise	pT	post Transfektion(sbeginn)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA	RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
CPITC	Coumarin-Phenyl-Isothiocyanat	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rpm	Umdrehungen pro Minute
DTT	Dithiothreitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SFLS	stress fibre like structures (Stressfaserartige Strukturen)
EST	Expressed Sequence Tag (Exprimierter Sequenzabschnitt)	Tab.	Tabelle
EtBr	Ethidiumbromid	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl- ethylendiamin
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
FITC	Fluorescein Isothiocyanat	TXR	Texas-Rot
g	Gravity, Erdanziehungskraft	U	Unit (Enzymeinheit)
h	Stunde(n)	u.a.	unter anderem untranslatierte
i.Ggs.	im Gegensatz	UTR	Region
IPTG	Isopropyl-β-D- Thiogalactopyranosid	UV	Ultraviolett
kb	Kilobasenpaar(e)	V	Volt
kDa	Kilo-Dalton molar	Vol	Volumen
M	(Mol/Liter)	W	Watt
min	Minute(n)	z.B.	zum Beispiel
ml	Milliliter		

Aminosäure	Einbuchstabencode
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure (Aspartat)	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

Nukleotide	Einbuchstabencode
Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T

1 Einleitung

1.1 Das Zytoskelett

Eukaryontische Zellen besitzen zur Aufrechterhaltung ihrer Form und Funktionen drei Zytoskelettsysteme; das Mikrotubuli-, Intermediärfilament- und Aktinfilamentsystem.

Mikrotubuli besitzen einen Durchmesser von 25 nm und stellen lange Hohlzylinder dar, die aus den zwei Tubulin-Isoformen aufgebaut werden. Im Mikrotubuli-Organisationszentrum, das sich in Nähe des Zellkerns befindet, sind die Mikrotubuli mit einem Ende fixiert. Das System ist u.a. an der Zellmorphogenese, der Positionierung des Endoplasmatischen Retikulums und den mitotischen sowie meiotischen Prozessen beteiligt.

Intermediärfilamente besitzen einen Durchmesser von 10 nm und werden von Proteinen aufgebaut, die eine große und heterogene Gruppe darstellen. Ein Typ an Filamenten kleidet z.B. als nukleäre Lamina das Innere der Kernhülle aus, während andere Isoformen das Zytoplasma der Zellen durchziehen. Aufgrund des seilartigen Aufbaus kann das Intermediärfilamentsystem starke Zugkräfte aufnehmen und gibt somit der Zelle und einem Zellverband mechanische Festigkeit.

Aktinfilamente besitzen einen Durchmesser von 8 nm und bestehen aus Aktinmonomeren, die zu helikalen Filamenten polymerisiert sind. Sie stellen eine Vielzahl an höher organisierten Strukturen, die an den unterschiedlichsten zellulären Prozessen beteiligt sind. Hierzu gehören z.B. Aufrechterhaltung und dynamische Veränderungen der Zellmorphologie, Phagozytose, Zellteilung, Motilität, Kontraktion und Muskelbewegung (Alberts et al., 2002).

1.2 G- und F-Aktin

Das Aktinzytoskelett wird durch globuläre, 42 kDa schwere Aktinmonomere aufgebaut. Das Aktinmonomer, auch G-Aktin (globulär) genannt, gliedert sich in vier Domänen (Abb. 1). Die Domänen 1 und 3 bilden hierbei den „Schwanz“ und die Domänen 2 und 4 den „Kopf“ des globulären Proteins. Ein Spalt zwischen den Domänen 2 und 4 bindet ATP-Mg und ist in der Lage, dieses zu ADP zu hydrolysieren (Otterbein et al., 2001, Winder, 2003).

Aktin stellt ein im Laufe der Evolution entstandenes hoch konserviertes, eukaryontisches Protein dar, das unter physiologischen Bedingungen zu langen Filamenten, dem F-Aktin polymerisiert in dem alle Domänen Interaktionen mit den benachbarten Monomeren eingehen (Pollard, 1999, Craig, 1994). Hierbei erfolgt (*in vitro* und *in vivo*) die Polymerisation von ATP-G-Aktin um ein Vielfaches schneller als die von ADP-G-Aktin. Die Polymerisation

beginnt mit der Nukleation eines Dimer- bzw. Trimerstadiums, an dem sich weitere G-Aktine in einem Kopf (des Monomers) zu Schwanz (des bestehenden F-Aktins) Arrangement anlagern. Hierdurch entsteht eine molekulare Polarität der Filamente, die sich im Polymerisationsverhalten bemerkbar macht. Die Polymerisation erfolgt hierbei primär am sogenannten Plus- oder „barbed“ Ende eines Filaments, was im Aktinmonomer dem „Schwanz“ entspricht. Am Minusende erfolgt dagegen primär eine Depolymerisation. Dieses Verhalten wird als Tretmühlmechanismus („treadmilling“) beschrieben (Craig, 1994).

Die Dekoration eines F-Aktinfilaments mit isolierten Myosinköpfen (einem aktinbindenden Motorprotein), die dem Aktinfilament ein gefiedertes Aussehen verleiht, stellt die Grundlage der Bezeichnungen für „barbed end“ -gefiedertes Ende- und „pointed end“ -spitzes Ende- wie sie in Abb. 1, C dargestellt ist (Alberts et al., 2002).

Das fertige Aktinfilament stellt modellhaft gesehen eine zweisträngige, helikal gewundene Struktur dar, in der 28 Monomere, über eine Länge von etwa 76 nm, für eine vollständige Drehung benötigt werden. Aufgrund der apparenten „Zweisträngigkeit“ besitzt das Aktinfilament zwei Furchen, die als Aktinfurchen bezeichnet werden und in denen einige wichtige aktinbindende Proteine lokalisiert sind (Pollard, 1999).

Es existieren in warmblütigen Vertebraten sechs Aktin-Isoformen, die von eigenen Genen kodiert und entweder gewebespezifisch oder ubiquitär exprimiert werden. Hierzu gehören die

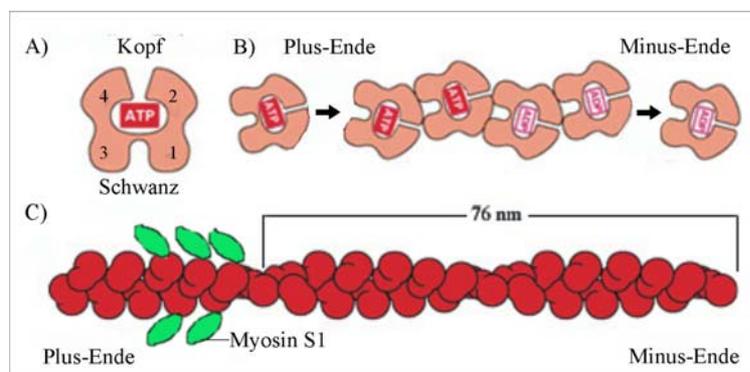


Abb. 1 Übersicht zu G- und F-Aktin

Übersicht zu G-Aktin (A) mit angegebenen Domänen, gebundenem ATP und Schwanz (Plus-Ende) sowie Kopf (Minus-Ende). B) Hypothetisches Modell des F-Aktins mit Plus-Enden und Minus-Enden. Im F-Aktin frisch polymerisierte Aktinmonomere besitzen ATP. Die schon länger im F-Aktin befindlichen Monomere haben das ATP zu ADP hydrolysiert. Die Pfeile im Schema deuten die Hauptrichtung von Polymerisation und Depolymerisation an. C) Das helikal gewundene, zweisträngige Aktinfilament zeigt die reelle Struktur des F-Aktins. Für eine halbe Drehung werden je 7 Monomere eines Stranges benötigt. Die Bezeichnung der Polaritäten eines Aktinfilaments in „barbed“ (gefiedert) und „pointed,“ (spitzes) Ende läßt sich aus der Dekoration mit den Myosinkopfdomänen (S1) ableiten. (Abb. Alberts et al., 2002; modifiziert)

beiden Skelettmuskel- und Herzmuskel- α -Aktine, die beiden α -Aktine der vaskulären und visceralen Glattmuskelzellen sowie die zytoplasmatischen Aktinisoformen β -Aktin und γ -Aktin, die praktisch in allen Zellen präsent sind. Die Unterscheidung der Aktinisoformen in α , β , γ bezieht sich auf die verschiedenen isoelektrischen Punkte. Die Aktinisoformen unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Primärsequenz. Die Unterschiede sind in den N-Termini zu finden,

in denen außerdem eine Reihe an posttranslationalen Modifikationen stattfinden (Ampe und Vandekerckhove, 1999). Die N-Termini der Aktinmonomere sorgen möglicherweise, neben der 3' UTR der mRNA, für eine spezifische Segregation der Aktinisoformen bzw. -mRNAs in unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen (Ampe und Vandekerckhove, 1999, Hill und Gunning, 1993, Hoock et al., 1991).

Daß die verschiedenen Aktinisoformen trotz der nur geringfügigen Unterschiede in ihrer primären Aminosäuresequenz nicht als äquivalent zu betrachten sind, belegen u.a folgende Expressionsexperimente. Die ektopische Expression eines humanen β -Aktins im Flugmuskel von *Drosophila melanogaster*, das sich vom endogenen Aktin nur durch 15 N-terminale Aminosäuren unterscheidet, stört die intramuskuläre Organisation und Flugfähigkeit (Brault et al., 1999). Die Expression von zytoplasmatischem Aktin in kultivierten, neonatalen und adulten Kardiomyozyten der Ratte bewirkt Veränderungen in der Proteinzusammensetzung des kontraktile Apparates, den Verlust der Kontraktion und morphologische Veränderungen, wie filopodiale Fortsätze und Abflachung der Zellen (von Arx et al. 1995). Die zytoplasmatischen Aktine, β -Aktin und γ -Aktin, sind in vielen Zellen submembranös lokalisiert und am Aufbau verschiedener Aktinzytoskelettstrukturen beteiligt. Im Allgemeinen lassen sich Filamente, Netzwerke und Bündel unterscheiden. Die spezifischen Aktine der Glattmuskelzellen und quergestreiften Muskulatur sind primär am Aufbau des kontraktile Apparates beteiligt (Alberts et al., 2002).

1.3 Aktinbindende Proteine und ihre Funktionen

Neben der gewebe- und zellspezifischen Expression der Aktinisoformen spielt eine Vielzahl an aktinbindenden Proteinen eine überaus wichtige Rolle für die Funktionserhaltung und -veränderung des Aktinzytoskeletts. Aktinbindende Proteine sorgen für eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Polymerisations- und Depolymerisationsprozesse, der Anheftung des F-Aktins an die Plasmamembran und andere Kompartimente sowie für Kontraktion und Relaxation. Die Diversität der Strukturen in Organisation, Stabilität und Dynamik wird durch die Assoziation des G- und F-Aktins mit verschiedenen synergistisch und antagonistisch agierenden, aktinbindenden Proteinen gewährleistet (Ayscough, 1998). Die Fülle an aktinbindenden Proteinen wurde anhand ihrer Funktionen in acht Klassen unterteilt (Pollard, 1999). Einige aktinbindende Proteine inklusive ihrer Funktion sind in Tab. 1 aufgeführt.

Proteine, die die Polymerisation und Depolymerisation des Aktins kontrollieren, stellen einen Dreh- und Angelpunkt in der Aktinzytoskelettorganisation dar. Profilin bindet G-Aktin in seiner deaktivierten, ADP gebundenen wie auch aktivierten ATP gebundenen Form. Eine

Bindung von ADP-G-Aktin an Profilin begünstigt einen raschen ADP zu ATP Austausch. Der ATP-G-Aktin-Profilin Komplex wirkt sich desweiteren positiv auf die Polymerisation aus (Selden et al., 1999). Thymosin β 4 bindet mit hoher Affinität an ATP-G-Aktin und mit geringerer Affinität an ADP-G-Aktin, verhindert aber die Verfügbarkeit des G-Aktins für eine Polymerisation (Carrier et al., 1993, Huff et al., 2001). *In vivo* sind die Gegebenheiten durch verschiedene weitere Regulationsmechanismen wesentlich komplizierter.

<i>Bindung an</i>	<i>Funktion</i>	<i>Beispiel</i>
G-Aktin	Monomer bindend	Profiline, β -Thymosine
F-Aktin	zerschneidend	Gelsolin, ADF/Cofilin
F-Aktin	terminal bindend	CapZ, Tensin
F-Aktin	seitlich bindend	Tropomyosin, Nebulin
F-Aktin	bündelnd	α -Aktinin, Vimbrin
F-Aktin	quervernetzend	Filamine
F-Aktin	Membranverankerung	Spektrin, Dystrophin,
F-Aktin	Kontraktion	Myosine

Tab. 1 **Übersicht zu den verschiedenen aktinbindenden Proteinen**

(nach Ayscough, 1998 und Pollard, 1999)

Die Effekte von Capping (abdeckelnden) oder F-Aktin zerschneidenden Proteinen auf das Aktinzytoskelett sind im starken Maße von den lokalen Bedingungen abhängig. So entstehen beim Zerschneiden eines Aktinfilaments auch neue, potentielle Polymerisationspunkte. Die Verhinderung der Polymerisation an den Plus-Enden der Aktinfilamente durch hier bindende Capping-Proteine kann ein Überwiegen der Depolymerisation am Minus-Ende bedeuten. F-Aktin lateral bindende und somit stabilisierende Proteine wie z.B. Tropomyosin und Nebulin sind jedoch in der Lage eine Depolymerisation zu verhindern.

Das Tropomyosin, ein α -helikales über „coiled-coil“-Interaktionen zusammengelagertes paralleles Dimer bindet F-Aktin entlang der Aktinfurche. Dabei erstreckt sich ein Dimer über die Länge von 7 Aktinmonomeren, also etwa eine halbe Umdrehung des Aktinfilaments. Weitere Kopf-Schwanz-Interaktionen der Dimere untereinander bewirken eine vollständige laterale Abdeckung des Aktinfilaments mit Tropomyosin. Es gibt mehrere Tropomyosin-Isoformen. Im quergestreiften Muskel reguliert der muskuläre Tropomyosin-Troponinkomplex in Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration die Kontraktionsprozesse im Muskel. Dabei positioniert Tropomyosin in einem Abstand von sieben Aktinmonomeren den Troponinkomplex, bestehend aus Troponin C (für Kalzium bindend), Troponin I (für inhibierend) und Troponin T (für Tropomyosin bindend). Bei geringen Kalziumkonzentrationen (unter 10^{-8} M) verhindert der Tropomyosin-Troponin-Komplex eine Bindung der Myosinköpfe am Aktin, der Muskel befindet sich in relaxiertem Zustand. Hierbei verhindert Tropomyosin durch die Abdeckung der Aktin-Domäne 1 die

Bindung des Myosinkopfes an Aktin (Smilli, 1999, Gergely et al., 1999). Die Funktionalität des Tropomyosins, seine Dimerisierung, F-Aktinbindung, Bindung des Troponinkomplexes und Inhibierung der Aktin-Myosin-Interaktion steht in engem Zusammenhang mit den sieben schwach konservierten repetitiven Motiven im Tropomyosinmolekül (Hitchcock-De Gregori und An, 1990, Hitchcock-DeGregorie et al., 2002).

Nebulin wird spezifisch im Skelettmuskel exprimiert und stellt ein gigantisches, elongiertes Protein dar, das im kontraktilem Apparat der Skelettmuskelzellen die Aktinfilamente über deren gesamte Länge von 1 μm bindet. Es wird angenommen, daß pro Aktinfilament zwei Moleküle Nebulin präsent sind. Ein Molekül Nebulin bindet somit etwa 200 Aktin-Monomere. Dazu paßt, daß das gesamte Protein aus 200 Tandemkopien eines Motivs aus 35 Aminosäuren besteht. Diese lassen sich zu 22 Tandem-Supermotiven mit jeweils sieben mal 35-Aminosäuremotiven zusammenfassen. Diese Supermotive sind wiederum in sechs überlappenden Segmenten zusammengefaßt, welche hochhomologe Supermotive enthalten. Die Anzahl der Motive kann allerdings mit den Spleiß-Isoformen variieren. Nebulin bindet das Aktinfilament, möglicherweise ähnlich wie Tropomyosin, in der Aktinfurche (Wang, 1999).

Die Bindung von jeweils einem Aktinmonomer erfolgt über das 35-Aminosäuremotiv, von dem angenommen wird, daß es eine α -helikale Sekundärstruktur besitzt. Die Motive besitzen einen ungewöhnlich hohen Anteil an basischen Aminosäuren, die vermutlich an der Aktinbindung beteiligt sind (Pfuhl et al., 1994). Eine *in vitro* nachgewiesene Interaktion zwischen Nebulin, Tropomyosin und Troponin wird möglicherweise auch in der Unterteilung der Motive in Supermotive (7x35) reflektiert. Ein Supermotiv erstreckt sich vermutlich über eine halbe Umdrehung im Aktinfilament und korreliert somit in seiner Länge mit dem Tropomyosin und mit dem Abstand der einzelnen Troponinkomplexe (Craig, 1994, Wang, 1999).

Ein weiteres Protein, das die Nebulin-Motive enthält, ist das N-RAP. Dieses Protein ist gleichfalls spezifisch in quergestreifter Muskulatur exprimiert und an Stellen lokalisiert, in denen die Myofibrillen an die Plasmamembran verankert werden (Luo et al., 1999). Wie Nebulin soll auch N-RAP einen Einfluß auf die Myofibrillogenese haben (Carroll und Horowitz, 2000). Ein weiteres Mitglied der Nebulin-Familie stellt das im Herzmuskel exprimierte Nebulette dar (Moncman und Wang, 1995).

Eine Reihe aktinbindender Proteine wie α -Aktinin und Filamin sind als Dimere in der Lage, Aktinfilamente miteinander quervernetzen. Die Bindung von α -Aktinin an Aktin bewirkt hierbei eine Bündelung von Aktinfilamenten, wohingegen Filamine ein Netzwerk

entstehen lassen (Alberts et al., 2002). Die Filamine sind Aktinfilament-bindende und als Dimere -quervernetzende Proteine, die sich durch eine hohe Homologie ihrer Primärstruktur auszeichnen. Die humanen Filaminisoformen A, B und C bestehen aus einer N-terminalen Aktinbindungsdomäne, der 24 Immunglobulindomänen folgen (van der Flier und Sonnenberg, 2001). Die Ig-Domäne 20 des Filamin C enthält im Unterschied zu den beiden anderen Isoformen A und B eine Insertion (78 AS), die die Größe dieser Domäne nahezu verdoppelt. Transfektionsstudien in kultivierten Muskelzellen zeigten, daß diese Domäne in die Z-Scheiben von Myofibrillen inseriert (van der Ven et al., 2000a). Die C-terminale Domäne 24 ist für die Dimerisierung verantwortlich (Himmel et al., 2003).

Die Filamine A und B werden in unterschiedlicher Stärke und als verschiedene Spleiß-Isoformen beinahe ubiquitär exprimiert (van der Flier et al., 2002). Das muskelspezifische Filamin C ist hauptsächlich in den Z-Scheiben der Myofibrillen, den Muskelsehnenverbindungen bzw. Glanzstreifen und zu einem geringen Anteil in der Nähe des Sarkolemm lokalisiert (Thompson et al., 2000, Xie et al., 1998, van der Ven et al., 2000a).

Da eine spezifische Bindung von Filamin C mit den Transmembranproteinen γ - und δ -Sarkoglykan nachgewiesen werden konnte, wird im quergestreiften Muskel eine Funktion des Proteins in der seitlichen Verankerung von Myofibrillen am Sarkolemm vermutet (Thompson et al., 2000).

1.4 Das Aktinzytoskelett in Muskelzellen und kultivierten Nichtmuskelzellen

1.4.1 Organisation von Myofibrillen

Die quergestreiften Muskelzellen sind (neben den Glattmuskelzellen) auf über Kontraktion vermittelte Kraftentwicklung spezialisierte Zellen. Die Skelettmuskelzellen stellen zylindrische, im Durchmesser 10 bis 100 μm und bis zu mehreren cm lange polynukleäre Zellen dar, die aus Fusionen vieler Vorläuferzellen entstanden sind. Diese Riesenzellen werden auch Muskelfasern genannt und haben im gesunden und differenzierten Zustand flache linsenförmige Zellkerne, die direkt unter der Plasmamembran liegen. Die Herzmuskelzellen sind zylindrische bis Y-artig verzweigte, 50-120 μm lange Zellen und enthalten 1 bis 2 zentral lokalisierte Zellkerne. Beide Muskelarten enthalten die Myofibrillen, die aus seriell gekoppelten kontraktile Einheiten, den Sarkomeren, aufgebaut sind. Die einzelnen Myofibrillen sind außerdem parallel über Intermediärfilamente gekoppelt (Craig, 1994).

Die serielle, wie auch parallele Aneinandereihung der Sarkomere innerhalb der Muskelzelle zeigt sich lichtmikroskopisch als charakteristische Querstreifung alternierender heller I-Banden und dunkler A-Banden. Die Bezeichnung als I (isotrope)- und A (anisotrope)-Bande verweist auf die optischen Eigenschaften der Bande im polarisierten Licht. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an ultradünnen Muskelschnitten zeigten, daß die I-Banden die Aktinfilamente und die A-Banden die (muskelspezifischen) Myosin II Filamente enthalten. Die Filamentsysteme liegen hierbei longitudinal zur Myofibrille. Die Aktinfilamente, deren Länge 1 μm beträgt, überlappen teilweise mit den 1,6 μm langen Myosinfilamenten der A-Bande. Eine weitere Zone innerhalb der A-Bande, mittig des Sarkomers, in der keine Überlappung der Aktinfilamente mit dem Myosinfilamenten vorhanden ist, wird als H-Bande bezeichnet. Die Mitte des Sarkomers, und somit auch des Myosinfilaments stellt die M-Bande dar (Abb. 2). Die I-Bande wird mittig von einer elektronendichten Bande bzw. räumlich gesehene Scheibe unterbrochen, die als Zwischen- oder Z-Bande bzw. Z-Scheibe bezeichnet wird. Ein Sarkomer wird seitlich durch zwei Z-Scheiben begrenzt und baut sich somit in der Abfolge Z-I-A-I-Z auf. Die Länge eines Sarkomers entspricht, je nach Kontraktionsgrad circa 2 bis 3 μm . Die Aktinfilamente der benachbarten Sarkomere sind mit ihren Plus-Enden in der Z-Scheibe verankert, so daß die Minusenden in das Sarkomer, Richtung A-Bande ragen.

Während des Kontraktionsprozesses, bei dem sich die Sarkomere in ihrer Länge verkürzen, gleiten die beiden Filamentsysteme (unter ATP Verbrauch der Myosinkopfdomänen) aneinander vorbei, ohne selbst eine Längenänderung zu erfahren. Dieser Mechanismus wurde 1953 von H.E. Huxley und Hanson bzw. A.F. Huxley und Niedergerke unabhängig voneinander als Gleitfilamenttheorie bezeichnet. Die Bipolarität des Myosinfilamentes und gegensätzliche Richtung der ins Sarkomer ragenden Aktinfilamente (Minus-Enden) bilden hierbei die Grundlage des Kontraktionprozesses (Craig, 1994).

Ein für die Integrität der Sarkomere wichtiges Protein stellt das Titin dar. Titin, das mit 3-4 MDa das bisher größte bekannte Protein ist, überspannt mit einer Länge von über 1 μm die Hälfte eines Sarkomers, wobei N- bzw. C-Terminus in der Z-Scheibe bzw. M-Bande verankert sind (Labeit und Kolmerer, 1995). Der Abschnitt des Proteins, der die A-Bande durchzieht, besteht aus einer regelmäßigen Abfolge von Domänen, an die Proteine der A-Bande binden, so daß eine Funktion des Titins in der Regulation dieser Ultrastruktur vermutet wird (Labeit und Kolmerer, 1995).

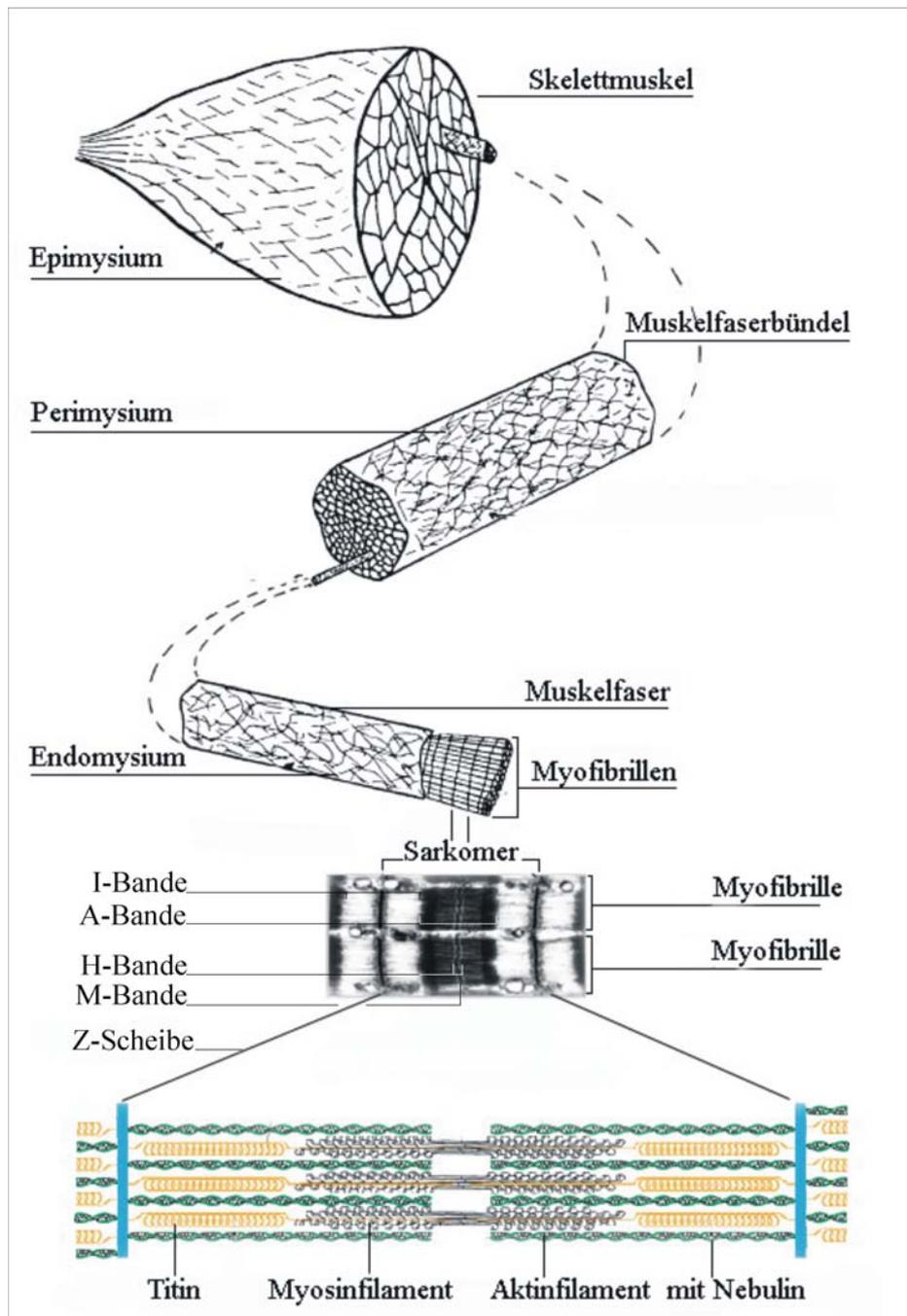


Abb. 2 **Übersicht zum Aufbau des Skelettmuskels**

Ein Muskel, wird vom kollagenen Bindegewebe des Epimysiums umgeben und in Muskelfaszien unterteilt, die aus vielen Muskelfaserbündeln aufgebaut sind. Die Muskelfaserbündel enthalten die Muskelfasern: zylindrische, mehrere Zentimeter lange Muskelzellen. Die Muskelfaszien, wie auch die Muskelfaserbündel werden vom Perimysium umschlossen. Die Muskelfasern umgibt das Endomysium. Die Muskelfasern enthalten die kontraktile Myofibrillen, deren kleinste kontraktile Einheit das Sarkomer darstellt. Die Querstreifung beider Muskel ist aus den auch lichtmikroskopisch erkennbaren I-Banden und A-Banden abgeleitet. Ein Sarkomer wird von den Z-Scheiben begrenzt. Die Plus-Enden der Aktinfilamente sind in den Z-Scheiben verankert. Das Modell veranschaulicht, daß die Inserierung der Aktinfilamente benachbarter Sarkomere alternierend erfolgt. Nebulin (grün) bindet entlang der Aktinfilamente, Titin (gelb) durchspannt ein halbes Sarkomer von Z-Scheibe zu M-Bande. (Abbildungen aus Purslow, 2002, Alberts et al., 2002)

Die Beobachtung, daß überdehnte Muskelzellen, bei der keine Überlappung der Myosinfilamente mit den Aktinfilamenten vorhanden war, ihre Ruheposition wieder einnehmen konnten, ließ schon früh die Vermutung eines dritten Filamentsystems aufkommen. Titin dient so mit seinen I-Banden-Abschnitten als molekulare Feder, die das Sarkomer vor Überdehnung schützt. (Labeit und Kolmerer, 1995, Linke et al., 1999, Li et al. 2002). Im Abschnitt der I-Bande ist Titin dehnbar. Die hier vorkommenden Domänen umfassen u.a. Tandemregionen von Ig-artigen Domänen, eine sogenannte PEVK-Region, die primär aus den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) besteht sowie die N2-B Region. Bei Dehnung dieser Regionen im physiologischen Bereich erfolgt eine schrittweise und reversible Entfaltung der PEVK- und N2-B-Regionen. Eine Auffaltung der Ig-Domänen würde erst oberhalb des physiologischen Bereiches erfolgen (Li et al., 2002). Ein in Nähe der Z-Scheibe gelegener, recht unflexibler Abschnitt des Titins, so zeigten Astier und Kollegen, bindet an Aktin (Astier et al., 1998).

Selbstverständlich sorgen weitere beteiligte Proteine für Stabilisierungen sowie Regulation der Kontraktion und Relaxation der Sarkomere.

1.4.2 Myofibrillogenese

Der Prozeß der Myofibrillogenese verläuft über die Assemblierung von Prämyofibrillen oder Streifzfaser-artigen-Strukturen (SFLS). Diese bestehen aus Bündeln von Aktinfilamenten mit sogenannten Z-Körperchen, die sarkomeres (sk)- α -Aktinin und später auch Titin enthalten, und den zytoplasmatischen Myosin-IIB Filamenten. Die Prämyofibrillen fusionieren lateral mit benachbarten Prämyofibrillen zu naszierenden Myofibrillen, in die die 1,6 μm langen Muskelmyosin-II Filamente integriert werden. Über den Einbau weiterer sarkomerer Proteine und der Assemblierung von A-Banden sowie Disassemblierung der zytoplasmatischen Myosin-IIB Filamente erfolgt die Fertigstellung der quergestreiften Myofibrille (Dabiri et al., 1997, Du et al., 2003). Diese Prozesse wurden überwiegend an kultivierten, embryonalen Kardiomyozyten von Vögeln beobachtet, in denen die ersten Assemblierungsprozesse in der Peripherie der Zellen, und zwar in Nähe der Plasmamembran, ablaufen.

Da die Architektur der Myofibrillen in den quergestreiften Muskeln der Vertebraten hoch konserviert ist, wird davon ausgegangen, daß dies ebenso für den Prozeß der Myofibrillogenese gilt. Dieser kann über das (sk)- α -Aktinin, das in den Z-Körperchen der Prämyofibrillen und naszierenden Myofibrillen sowie Z-Scheiben der Myofibrillen präsent ist, in der Immunfluoreszenzmikroskopie veranschaulicht werden (Sanger et al. 2002).

Proteine wie Titin und Nebulin haben wichtige Funktionen in der Assemblierung der Sarkomere. Titin, so wird postuliert, könnte die Muskelmyosin-II-Filamente mittig des Sarkomers positionieren (Maruyama, 1994), und Nebulin scheint als molekulares Maßband der Aktinfilamente in den Skelettmuskelzellen zu dienen (Labeit et al., 1991).

1.4.3 Das Aktinzytoskelett in kultivierten Nichtmuskelzellen

Die in kultivierten Zellen beobachtbaren Aktinzytoskelettstrukturen lassen sich hauptsächlich in das lamellipodiale Aktinfilamentsystem und die kontraktile Streifasern unterteilen.

Besonders in motilen, aber auch in stationären Zellen befindet sich am Saum der Zelle eine aktive Zone, die als Lamellipodium bezeichnet ein dynamisches Aktinfilamentsystem enthält. Im Lamellipodium erfolgen mit hohen Umsatzraten Nukleation, Polymerisation und Verzweigung der Aktinfilamente sowie deren Zerschneidung zur Generierung neuer Polymerisationskeime. Die in Richtung der Plasmamembran gerichtete Polymerisation fördert hierbei das Voranschreiten der Plasmamembran. Unterstützt wird dieser Prozeß durch parallele Zusammenlagerung von Aktinfilamenten zu Mikrospeikes und Filopodien, die wiederum dem Aufbau von Streifasern und Fokalkontakten dienen können (Pollard und Borisy, 2003, Small et al., 1998).

Streifasern stellen nadelförmige Bündel von kontraktile Aktinfilamenten dar, die in vielen Kulturzellen zu finden sind. Streifasern durchziehen die Zellen und sind mit ihren Enden an sogenannten Fokalkontakten (Abb. 3 auf S. 14 und Kapitel 1.5.1) fixiert (Kato et al., 1998). In der Verankerung der Stressfasern, in den Fokalkontakten der Zellen sowie in Zell-Zell-Kontakten, zeigen stets die Plus-Enden der Aktinfilamente in Richtung des Kontaktes. Streifasern stellen aufgrund ihrer Kontraktilität, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ein wichtiges Zytoskelettelement in den Zellen dar (Sanger und Sanger, 1980). Der molekulare Aufbau der Streifasern wird als zum Teil sarkomerartig beschrieben. Ein Charakteristikum stellen hierbei die α -Aktinin enthaltenden „dense bodies“ dar, in denen die Plus-Enden der 0,6 bis 1,9 μm langen Aktinfilamente verankert sind (Langanger et al., 1986, Sanger und Sanger, 1980). Die Assemblierung von Streifasern steht im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Fokalkontakten und der Aktivierung der Myosinfilamente und somit der Kontraktilität. Der Zusammenbau der Streifasern erfolgt vermutlich über den Einbau von schon fertigen Aktinfilamenten, deren Orientierung (Polarität) über die Myosinfilamente erfolgen soll. Filopodien oder Mikrospeikes werden außerdem als Basis für den Aufbau von Streifasern genutzt (Small et al., 1998). Neben diesen ventralen Aktinstrukturen existieren

dorsal verlaufende Streßfasern, die sich in bogenförmig-konvex und zentripetal verlaufende Streßfasern untergliedern lassen. Auch hierbei handelt es sich um kontraktile Streßfasern. Die als Arcs beschriebenen konvexen Streßfasern sind nicht mit Fokalkontakten assoziiert (Small et al., 1998).

1.5 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen

Für die nähere Betrachtung der Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Verbindungen ist es ratsam, einen kurzen Überblick zu den verschiedenen Verbindungstypen zu geben.

Mechanisch nicht belastbare Zell-Zell-Verbindungen sind die Nexus-Kontakte. Diese dienen der metabolischen und ionalen Kopplung benachbarter Zellen. So erfolgt in der Herzmuskulatur die Erregungsweiterleitung über diese auch als elektrische Synapsen bezeichneten Zellkontakte. Die Verbindung wird über das Connexin, hier Connexin-43, gebildet. Connexine stellen Transmembranproteine dar, bei der pro Plasmamembran 6 Connexine eine Art Tunnel zu weiteren 6 Connexinen der benachbarten Plasmamembran bilden (Alberts et al., 2002).

Für die mechanisch belastbaren Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Verbindungen gelten generell die folgenden Grundlagen: Intrazelluläre Anheftungsproteine vermitteln die Bindung zwischen Aktinfilamenten oder Intermediärfilamenten zu den Transmembranproteinen. Die Transmembranproteine binden wiederum über extrazelluläre Domänen an Proteine der Extrazellulärmatrix bzw. an Transmembranproteine benachbarter Zellen. Tab. 2 zeigt eine Übersicht zu den Verbindungstypen (Alberts et al., 2002).

Von den bisher bekannten Transmembranproteinen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sollen hier nur die Cadherine, Intergine und der Dystroglykankomplex behandelt werden.

Transmembranproteine der Familie der Cadherine sorgen über homophile Bindungen zu Cadherinen benachbarter Zellen für Zell-Zell-Verbindungen. Der extrazelluläre Abschnitt des Cadherins untergliedert sich in 5 Domänen, von denen die letzten drei Domänen Kalzium binden. Die Bindung von Kalzium ist hierbei wichtig für die Funktionalität. Man unterscheidet desweiteren verschiedene Isoformen, von denen im Herz- und Skelettmuskelgewebe hauptsächlich die N-Cadherine exprimiert werden (Green und Jones, 1996, Alberts et al. 1994). Intrazellulär sorgt das F-Aktin-bindende α -Catenin über β - und γ -Catenin für eine Anheftung der Aktinfilamente an Cadherin. Weitere F-Aktin-bindende Proteine wie α -Aktinin und Vinculin sorgen für die Organisation der Filamente (Pokutta und

Weis, 2002, Pokutta et al., 2002). Die Anheftung der Aktinfilamente an diesen Adhärenzverbindungen soll hierbei seitlich erfolgen (Alberts et al., 2002).

Die Zell-Matrix-Verbindungen der Aktinfilamente werden über die Integrine, einer grossen Familie heterodimerer Transmembranproteine, vermittelt. Die Integrine lassen sich in eine α - und eine β -Untereinheit, mit jeweils mehreren Familien und Spleiß-Varianten unterteilen. Die Kombination der Untereinheiten sorgt für die Spezifität der Bindung an extra- und intrazelluläre Liganden (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Hierbei determinieren zumeist die β -Untereinheiten den intrazellulären, und die α -Untereinheiten den extrazellulären Liganden (Hayashi et al., 1990, LaFlamme et al., 1992 Ylanne et al., 1993).

	<i>Transmembranprotein</i>	<i>Extrazellulärer Ligand</i>	<i>Intrazelluläres Zytoskelett</i>	<i>einige Adapterproteine</i>
Zell-Zell-Adhärenz	Cadherin	Cadherine der Nachbarzelle	Aktinfilament	Catenine, Vinculin, α -Aktinin, Plakoglobin
Desmosom	Cadherin (hier Desmogleine und -colline	Cadherine der Nachbarzelle	Intermediärfilamente	Desmoplakine, Plakoglobine
Zell-Matrix				
Adhärenz	Integrin Dystroglykan	Proteine der extrazellulären Matrix	Aktinfilamente Aktinfilamente	Talin, Vinculin, α -Aktinin Dystrophin Utrophin
Hemidesmosom	Integrin	Proteine der extrazellulären Matrix	Intermediärfilamente	Desmoplakin-ähnliche Proteine

Tab. 2 **Übersicht zu den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen**
(nach Alberts et al.,1994, Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996)

Eine weitere Zell-Matrix-Verbindung wird über das Heterodimer des Dystroglykankomplexes aufgebaut. Das β -Dystroglykan fungiert hierbei als Transmembranprotein und bindet extrazellulär das α -Dystroglykan. Die intrazellulären Adapterproteine Dystrophin und Utrophin vermitteln die Verankerung der Aktinfilamente. Der Dystroglykankomplex bindet über α -Dystroglykan an das Matrix-Protein Laminin (Ervasti und Campbell, 1993).

Alle drei Verbindungssysteme über Cadherin, Integrin und Dystroglykan sind an Signaltransduktionsprozessen beteiligt und dienen somit nicht nur einer mechanischen Verbindung. Ihre Rezeptorfunktionen können dabei in beide Richtungen der Zellmembran vermitteln (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka 1996, Henry und Campbell, 1999).

Zell-Zell-Verbindungen, die intrazellulär mit den Intermediärfilamenten in Kontakt stehen, werden als Desmosomen bezeichnet. Sie werden über die Cadherine Desmoglein und

Desmocollin aufgebaut, deren zytoplasmatischen Domänen entweder direkt (Desmoglein) oder indirekt (über Plakoglobin) Kontakt zu den Intermediärfilamenten aufnehmen. Die Anheftung der Intermediärfilamente soll hierbei, wie bei den Aktinfilamenten, seitlich erfolgen (North et al. 1999, Alberts et al., 2002).

Verankerungen der Intermediärfilamente in Zell-Matrix-Verbindungen werden über die, aus Integrinen aufgebauten, Hemidesmosomen vermittelt, in denen die Intermediärfilamente terminal inserieren (Alberts et al., 2002).

1.5.1 Fokalkontakte

In vivo wie auch *in vitro* unter Zellkulturbedingungen bilden adhärente Zellen Adhäsionskontakte mit der unterliegenden Matrix aus, die als Fokalkontakte (Abb. 3) bezeichnet werden. Sie stellen in kultivierten Zellen flache elongierte Strukturen dar in denen Aktinfilamentbündel (Streßfasern) enden und über Adapterproteine an Transmembranproteine gekoppelt werden. Die Streßfasern, die aus einer Vielzahl an Aktinfilamentbündeln aufgebaut sind, enden in fingerartigen Projektionen (Kato et al., 1998). Die Verbindung des Aktinzytoskeletts mit Transmembranproteinen und ferner der extrazellulären Matrix gewährleisten Adhäsion, Kontrolle von Wachstum und Migration sowie Signaltransduktion (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996, Geiger und Bershadsky, 2001).

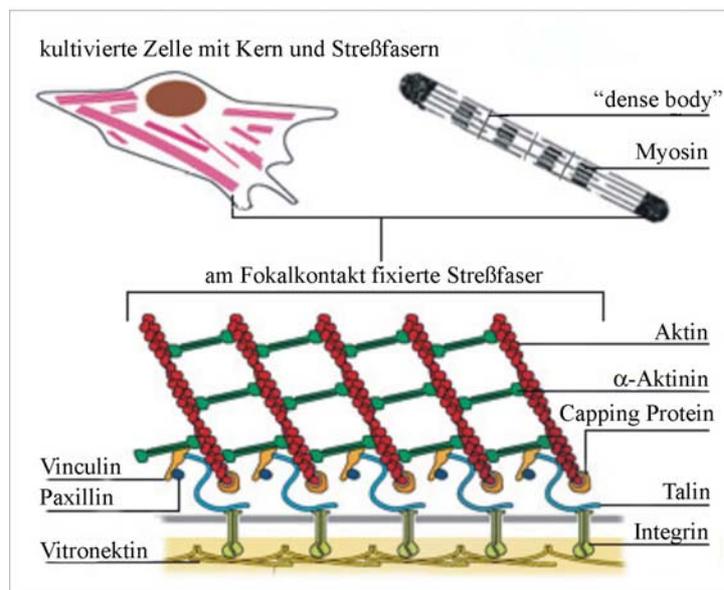


Abb. 3 **Fokalkontakt und Streßfasern**

Zellen enthalten als kontraktiles Zytoskelettelement Streßfasern, die sarkomerartig aus Aktin- und Myosinfilamenten aufgebaut sind und distal in Fokalkontakten enden. Die Fokalkontakte verankern die Streßfasern über eine Vielzahl an aktinbindenden Proteinen an Transmembranproteine, die weitere Verbindungen mit extrazellulären Matrixproteinen eingehen. Die graue Linie in der unteren Abbildung stellt die Plasmamembran dar. Die terminalen Aktinfilamente, über die eine Verankerung vollzogen wird weisen mit den Plus-Enden in Richtung der Plasmamembran. (Abb.: Alberts et al., 2002, Small et al., 1998, modifiziert)

Die Vielzahl an verschiedenen Proteinen (bisher sind es über 50), die als Fokalkontaktproteine charakterisiert wurden, zeichnen sich durch ihre Multidomänen-Struktur aus. Hierdurch wird es praktisch unmöglich, eine strukturell präzise Vorhersage über den molekularen Aufbau der Fokalkontakte zu machen, da eine Vielzahl an

Bindungsmöglichkeiten für (fast) jedes beteiligte Protein besteht. Vinculin, ein intrazelluläres Adapter- und Markerprotein für Fokalkontakte, kann an mindestens 10 andere Fokalkontaktkomponenten binden, zu denen Aktin, Paxillin, Talin, α -Aktinin, Vinexin, Ponsin, Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP) und das Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP2) zählen. Einige der hier genannten Komponenten sind desweiteren an Signaltransduktionsprozessen beteiligt, und biochemische Analysen zeigten, daß mindestens die Hälfte der bisher bekannten Fokalkontaktkomponenten in verschiedenen Signalwegen eine Rolle spielen (Geiger und Bershadsky, 2001, Zamir und Geiger, 2001).

Die Transmembrankomponente der Fokalkontakte wird primär über die Integrinheterodimere $\alpha\beta3$ und $\alpha5\beta1$ getragen (Zamir und Geiger, 2001, Burridge und Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Das $\alpha\beta3$ -Integrin bindet an das Matrixprotein Vitronektin, das eine rigide und somit stabile Oberfläche darstellt, auf die starke Zugkräfte wirken können, ohne daß es zu einer Translokation kommt (Zamir et al., 2000). In motilen Zellen stellen Fokalkontakte stationäre Strukturen dar, was bedeutet, daß die Zelle über die am Leitsaum der Zelle gebildeten Fokalkontakte (Podosomen bzw. Fokalkomplexe) hinwegwandert. Befindet sich der Fokalkontakt mehr zentral in der Zelle, erfolgt gewissermassen eine Reifung und Vergrößerung, dem ein Abbau am Ende der Zelle folgt. In stationären Fibroblasten, wie auch seitlich der motilen Zellen erfolgt trotz allem eine zentripetale Translokation (Smilenov, 1999, Ballestrem et al., 2001).

Assemblierung, Erhalt und Größe der Fokalkontakte sind von der Kontraktilität der Zelle abhängig. Eine Blockierung der Kontraktilität führt zur Auflösung dieser Strukturen (Zamir et al., 2000). Die mechanosensorische Komponente der Fokalkontakte wird in ihrer Reaktion auf applizierte Kräfte deutlich. Bei Erhöhung der Zugkräfte, die endogener (Kontraktilität) oder exogener (Dehnung) Natur sein können, erfolgt eine proportionale Vergrößerung des Fokalkontaktes, so daß eine konstante Zugkraft pro Fläche ($5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$) beibehalten wird. Diese proportionale Anpassung an eine applizierte Zugkraft erfolgt in einem zeitlichen Rahmen von Sekunden und ist lokal begrenzt (Balaban et al., 2001, Riveline et al., 2001).

Das $\alpha5\beta1$ -Integrin-Heterodimer, dessen Matrixpartner das Fibronektin darstellt, ist zentral im Fokalkontakt zu finden. Fibronektin bildet ein eher weiches, leicht translozierbares Oberflächenmaterial, das dementsprechend weniger Zugkräfte überträgt. Bei Zugbelastungen werden diese Adhäsionskontakte gewissermaßen aus dem Fokalkontakt transloziert und bilden so die in stationären Zellen zentral gelegenen fibrillären Adhäsionen. In den fibrillären Adhäsionen fungiert überwiegend Tensin als intrazelluläres Adapterprotein. Marker für Fokalkontakte wie Vinculin, Paxillin oder Phosphotyrosin sollen hier weniger präsent sein.

Bei Blockierung der Kontraktilität erfolgt keine Auflösung der fibrillären Adhäsionen, was darauf hinweist, daß diese Art der Zell-Matrix-Kontakte von den Fokalkontakten strukturell und funktionell unterschieden werden können (Zamir et al., 2000).

Viele der oben besprochenen Fokalkontaktproteine lassen sich in den folgenden Adhärenzverbindungen der quergesteiften Muskulatur und deren Muskelzellen wiederfinden.

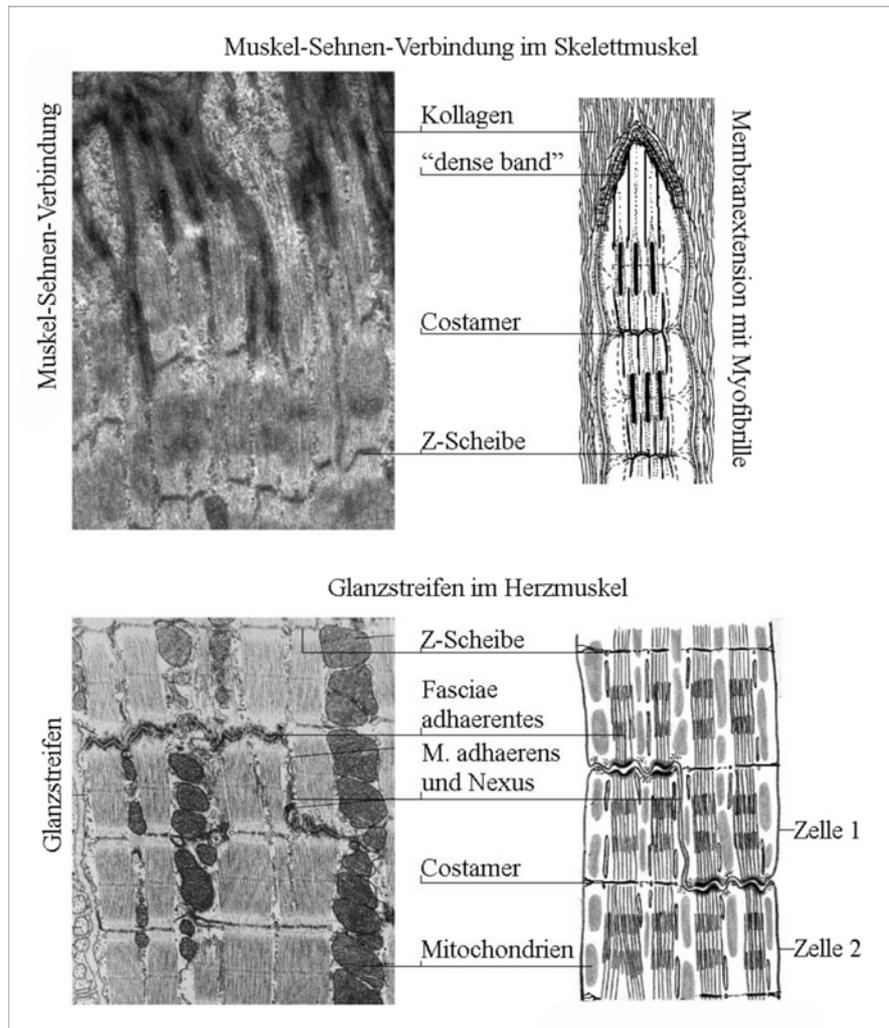
1.5.2 Muskel-Sehnen-Verbindungen

Die Muskel-Sehnen-Verbindung (Abb. 4) oder myotendinose Übergangszone der Skelettmuskeln stellt eine mechanisch stark belastbare Verbindung zwischen den distalen Enden der Muskelfasern und dem Sehngewebe (und somit einer extrazellulären Matrix) dar (Berthier und Blaineau, 1997, Trotter, 2002). Im Muskel existieren aber auch sogenannte myomyose Verbindungen, wo Muskelzellen innerhalb des Muskels enden. Hierbei handelt es sich um eine der myotendinosen Übergangszone ähnlichen Verbindung. Eine Zell-Zell-Verbindung zwischen den einzelnen Muskelfasern ist im Skelettmuskelsystem nicht vorhanden (Craig, 1994).

Die myotendinose Übergangszone zeichnet sich durch eine Reihe morphologischer Besonderheiten aus. So verjüngen sich die Muskelzellen konisch und besitzen distal eine durch fingerartige Extensionen und Invaginationen gekennzeichnete Plasmamembran. Die terminalen Aktinfilamente der Myofibrillen inserieren in diese Ausstülpungen oder enden an den Invaginationen (Yamaguchi et al., Trotter, 2002, Hyodo et al., 2001).

Die distalen Sarkomere bestehen aus einer proximalen Z-Scheibe, an die sich eine I- und A-Bande anschließt. Die terminalen Aktinfilamente, die dieser A-Bande folgen, sorgen für die eigentliche Verankerung des Sarkomers und somit der Myofibrille an die Plasmamembran. Diese Aktinfilamente sind zumeist länger als jene in herkömmlichen Sarkomeren. Auch hier weisen die Plus-Enden in Richtung der Plasmamembran, wo sie distal in einer recht diffusen elektronendichten Bande („dense band“) enden können (Yamaguchi et al., 1990, Trotter et al., 1981). Die eigentliche Verankerung der Aktinfilamente erfolgt über eine Vielzahl hier verstärkt lokalisierter, aktinbindender Proteine, wie z.B. Vinculin (Law et al., 1994) und Talin (Tidball et al., 1986), die weitere Verbindungen zu Transmembranproteinen aufbauen. Im Gegensatz zu den Glanzstreifen (1.5.3) des Herzens ist in den myotendinosen Übergangszonen das α -Aktinin kaum bis gar nicht detektierbar (Tidball, 1986, Trotter, 2002).

An der myotendinösen Übergangszone können zwei verschiedene Transmembranverbindungen unterschieden werden. Hierzu gehören zum einen der Dystroglykankomplex, der intrazellulär über Dystrophin und Utrophin Aktinfilamente bindet und extrazellulär Bindungstellen zu Proteinen der Basalmembran, wie Laminin, Perlecan und Agrin besitzt (Trotter, 2002, Henry und Campbell, 1999).



Das im adulten, quergestreiften Muskel primär und spezifisch exprimierte Integrin-Heterodimer ist das $\alpha 7\beta 1 D$ (Belkin et al., 1996, Bao et al., 1993). Dieses Heterodimer sorgt für eine Bindung an das extrazelluläre Protein Laminin-2 der Basalmembran sowie für eine Bindung an die intrazellulären F-Aktin bindenden Proteine Talin und α -Aktinin (BurrIDGE und Chrzanowska-

Abb. 4 Übersicht zu Muskel-Sehnen-Verbindung in Skelettmuskel und Glanzstreifen im Herzmuskel

Dargestellt sind elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen (links) und eine Modelldarstellung (rechts). Die Muskelsehnenverbindung in der EM-Aufnahme zeigt einzelne Myofibrillen einer Muskelzelle, die in fingerförmige Membranextensionen inserieren. Die Invaginationen enthalten extrazelluläre Matrixproteine, insbesondere Kollagen. Die Myofibrillen enden über ein terminales Sarkomer, dessen Bandenverlauf als Z-I-A-Aktinfilamente-, „dense band“ beschrieben werden kann. In dieser elektronendichten Bande, die der Plasmamembran unmittelbar aufliegt inserieren die Plus-Enden der Aktinfilamente. Bei der Muskel-Sehnen-Verbindung handelt es sich um eine Zell-Matrix-Verbindung. Im Glanzstreifen des Herzmuskels sind transversale und longitudinale Abschnitte unterscheidbar, die sich funktionell unterscheiden. Im longitudinalen Abschnitt liegen die aus den Connexinen aufgebauten Gap-junctions oder Nexus sowie die Macula adhaerens, die Desmosomen darstellen. Im transversalen Abschnitt, der Fascia adhaerentes, inserieren die Myofibrillen über eine terminale Z-Scheibe. Die F. adhaerens zeichnet sich durch Membranverzahnungen aus. Bei den Glanzstreifen handelt es sich um Zell-Zell-Verbindungen. In beiden Verbindungen sind Z-Scheiben sowie Costamere gekennzeichnet. Costamere stellen laterale Verankerungen der Myofibrillen an Plasmamembran und Extrazellulärmatrix dar. Die Verankerung findet in Höhe der Z-Scheibe sowie in geringerem Maße (hier nicht eingezeichnet) in Höhe der M-Bande statt. (Abbildung modifiziert nach Alberts et al., 2002, EM Aufnahmen: Muskelsehnenverb., <http://zellbio.ana.uni-heidelberg.de/ELMI/M3/m3ueb.html>, Glanzstreifen: Kühnel, 1995).

Wodnicka, 1996). Die Proteine der Basalmembran (z.B. Laminin) sorgen anschließend für eine Verbindung zum eigentlichen Sehngewebe, das reich an Kollagenfasern ist (Trotter, 2002).

Die fingerartigen Invaginationen und Extensionen, durch die die Grenzfläche zwischen Muskel und Sehne auf mehr als das Doppelte der Querschnittsfläche des Muskels vergrößert wird, sorgt für eine Verringerung der auftretenden Kräfte pro Oberfläche. Desweiteren treffen die weiterzuleitenden Kräfte in Längsrichtung des Sarkolemms auf, wodurch diese hauptsächlich als Scherkräfte auf die Membran wirken. All diese morphologischen Besonderheiten sorgen für eine stabile, mechanisch belastbare Verbindung (Trotter, 2002).

Vermutlich sorgen nicht nur die in Abb. 4 dargestellten terminalen Verknüpfungspunkte, sondern auch seitliche Verankerungen der Aktinfilamente an die Plasmamembran für eine mechanische Kopplung der Myofibrillen an die extrazelluläre Matrix.

Neben der mechanisch belastbaren Verbindung ist die Muskel-Sehnen-Verbindung auch Ort von Signaltransduktion und reagiert auf die vorhandenen Belastungen. Diese Reaktionen schließen morphologische Veränderungen der Membranextensionen sowie die Expression wichtiger Adapterproteine wie Vinculin und Talin ein (Trotter, 2002, Zamora et al. 1995, Tidball und Quan, 1992).

1.5.3 Glanzstreifen

Die Verbindung der Kardiomyozyten im Herzmuskelgewebe erfolgt über die Glanzstreifen (Abb. 4), in denen aufeinanderfolgende Zellen Kontakt aufnehmen. Die Glanzstreifen lassen sich in transversale und longitudinale Abschnitte unterteilen, wodurch es zu einem stufenartigen Verlauf kommt. Die beiden Abschnitte unterscheiden sich auch funktionell (Sommer und Johnson, 1979). In den transversalen, quer zur Längsachse der Zelle gelegenen Abschnitten befinden sich Zell-Zell-Kontakte, die gewisse Ähnlichkeiten mit der myotendinösen Übergangszone im Skelettmuskel aufweisen. Der Kontakt der beiden Zellen wird hierbei jedoch nicht durch fingerartige Invaginationen und Austülpungen, sondern vielmehr durch eine Verzahnung der Membranen erreicht. Diese Verzahnungen umschließen die terminalen Aktinfilamente der Myofibrillen (Yamaguchi et al., 1988). Die Verankerung der Plusenden der terminalen Aktinfilamente an den Glanzstreifen erfolgt in einer elektronendichten Bande, die in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran gelegen auch als terminale Z-Scheibe beschrieben wird (Yamaguchi et al., 1988). Im Gegensatz zur Muskel-Sehnen-Verbindung ist das sarkomere α -Aktinin in dieser Struktur präsent (Lu et al., 1992). Die auch Fasciae adhaerentes genannten transversalen Abschnitte beherbergen

Adhärenzverbindungen, die aus Cadherinen bzw. Integrinen aufgebaut werden, die intrazellulär u.a. über die Catenine bzw. α -Aktinin, Talin und Vinculin Verbindungen Aktinfilamenten der Myofibrillen aufbauen (Perriard et al., 2003, Thornell et al., 1999).

Die longitudinalen Abschnitte enthalten die Desmosomen (Macula adhaerens) mit Desmocollin und Desmoglein aus der Cadherinfamilie, an die zytoplasmatisch über Desmoplakin und Desmoglobin eine Verankerung der Desmin-Intermediärfilamente vermittelt wird. Weiterhin befinden sich hier die als Nexus-Verbindungen (Macula communicans) oder Gap-junctions genannten Zell-Zell-Verbindungen (Alberts et al., 2002).

1.5.4 Costamere

Die lateralen Anheftungsorte der Myofibrillen an die Plasmamembran werden Costamere (lat. costa: Rippe, griech. meros: Teilchen) genannt. Sie verlaufen sarkolemmal und im rechten Winkel zur Längsachse der Zellen in Höhe der Z-Scheiben, sie sind erstmals durch die Präsenz von Vinculin charakterisiert worden (Pardo et al., 1983).

Die Verankerung zwischen Z-Scheiben und Plasmamembran an den Costameren wird an kontrahierten Muskeln deutlich. Bei Verkürzung des Sarkomers wölbt sich die Plasmamembran bzw. das Sarkolemm zwischen zwei Costameren nach außen, während es durch die Costamere an der Myofibrille fixiert bleibt (Ozawa et al., 2001).

Die subsarkolemmalen Komponenten der Costamere sind u.a. die Intermediärfilamente des Desmins sowie γ -Aktin, Spektrin (Craig und Pardo, 1983), Dystrophin und Utrophin (Porter et al., 1992, Rybakova et al., 2000), Dystrobrevin und Syntropin (Durbeej und Campbell, 2002), Vinculin (Pardo et al., 1983) und Talin (Belkin et al., 1986). Diese Proteine sorgen für eine Bindung der Myofibrillen an Membran- bzw. Transmembranproteine wie den Dystroglykankomplex, den Sarkoglykankomplex, Sarkospan (Durbeej und Campbell, 2002) und Integrin (Wu et al., 2002), die wiederum an Proteine der extrazellulären Matrix binden und/oder als transmembrane Rezeptoren in Signalwegen eine entscheidende Rolle spielen. Da Costamere auch eine Verankerung der Plasmamembran mit der extrazellulären Matrix darstellen, sind sie in der Lage, einen Teil der Kontraktionskräfte lateral auf die extrazelluläre Matrix zu übertragen (Danowski et al. 1992). Desweiteren dienen sie auch der Kompartimentierung von Membranrezeptoren und Ionenkanälen (Berthier und Blaineau, 1997).

Die Entwicklung der Costamere erfolgt vermutlich aus Fokalkontakten über longitudinale Strukturen, die sarkolemmal und parallel zu den naszierenden Myofibrillen liegen. Die als primäre longitudinale Adhäsionsstrukturen (PLAS) bezeichneten Strukturen enthalten das

muskelspezifische Integrin $\beta 1D$ sowie Plektin, ein Adapterprotein für Aktin und Intermediärfilamente. Mit fortschreitender Entwicklung der naszierenden Myofibrillen zu quergestreiften und kontraktiven Myofibrillen erfolgt die Umorientierung von PLAS in Costamere (Schröder et al., 2002).

1.6 Die Funktion der extrazellulären Matrix in Skelett- und Herzmuskulatur

Die Muskelzellen der quergestreiften Muskulatur sind von einer extrazellulären Matrix umgeben, deren Hauptbestandteil verschiedene Spezies von Kollagenfibrillen sind. Der Zellmembran direkt aufgelagert ist die Basalmembran, deren Hauptbestandteile das ein flächiges Netz bildende Kollagen IV und Laminin sind. Dieser folgt die Gitterfaserhülle oder Retikularmembran aus hauptsächlich Kollagen I- und III- Fibrillen (Purslow, 2002). Dieser Komplex aus Plasmamembran, Basalmembran und Gitterfaserhülle wird als Sarkolemm bezeichnet, obwohl Sarkolemm auch als Synonym nur für die Plasmamembran der Skelett- und Herzmuskelzelle benutzt wird.

Die extrazelluläre Matrix des Skelettmuskels wird als intramuskuläres Bindegewebe bezeichnet und läßt sich in drei Bestandteile gliedern. Ein Muskel wird vom Epimysium umgeben. Innerhalb dieser Hülle befinden sich die Muskelfaszien, die vom Perimysium umgeben, eine große Anzahl individueller Myofasern (Muskelfasern) enthalten. Die einzelnen Muskelfasern werden wiederum vom Endomysium ummantelt. Die Kollagene I und III stellen hierbei die Hauptanteil der Kollagene in Epimysium und Perimysium. Die extrazelluläre Matrix ist in der Entwicklung des Muskels, als Gerüststruktur für Vaskularisierung und Innervierung sowie an der lateralen und longitudinalen Kraftübertragung beteiligt (Purslow, 2002). Die Muskelzellen bzw. der gesamte Muskel enden über die myotendinösen Übergangszonen in der Sehne. Die Sehnen, deren Hauptbestandteil das Kollagen I ist, sorgen u.a für die Übertragung der Kontraktionskräfte der Muskeln auf die Knochen und haben weitere (meist unterschätzte) Funktionen in Dehnung und Bewegungsenergiespeicherung (Benjamin und Ralphs, 1996).

Die extrazelluläre Matrix der Herzmuskulatur, die die einzelnen Kardiomyozyten umgibt wird als Interstitium bezeichnet, deren Kollagenmatrix (Kollagen I und III) eine kritische Rolle für die Funktionsfähigkeit und -erhaltung darstellt (Pelouch et al., 1993, Weber, 1989). Die kollagene extrazelluläre Matrix des Interstitiums verbindet die einzelnen Kardiomyozyten miteinander und dient so als Gerüst und Krafttransmitter. Desweiteren gibt sie dem Myokard einen optimalen Schutz gegen die starken Zugbelastungen, die während des Zyklus von Diastole und Systole auftreten können. Neben diesen Funktionen stellt das Interstitium auch

Gerüst und Schutz für die Vaskularisierung und Innervierung des Myokards dar (Weber, 1989).

1.7 Die Zielstellung der Arbeit oder die Frage nach dem Xin

Den Grundstein dieser Arbeit legte ein Hefe-Doppelhybrid-Assay in einer cDNA Bank von humanem Skelettmuskel, in dem die Ig-Domänen 19-21 des muskelspezifischen Filamin C als Köder benutzt wurden. Ein Interaktionspartner wurde in diesem Assay als C-terminale Portion des humanen Xin identifiziert. Das in quergestreifter Muskulatur spezifisch exprimierte Protein Xin (chinesisch: Herz) ist von Wang und Kollegen erstmals in Huhn und Maus beschrieben worden. Die Proteine cXin (chicken Xin) und mXin (mouse/murine Xin) sind durch neuartige repetitive Motive charakterisiert, deren Funktion bisher unbekannt ist. Die repetitive Sequenz wird von ca. 16 Aminosäuren gebildet. Xin zeigte in Hühnerembryonen eine spezifische Expression in den Herzvorläuferzellen und embryonalen Kardiomyozyten, die auch im Myokard des adulten Herzen vorhanden ist (Wang et al., 1999). Die Morphogenese des gekammerten Herzens verläuft über einen geraden Herzschlauch, der sich im „Dextral-Looping“-Prozeß zu einem C verformt, wobei die konvexe Seite kaudal zur rechten Körperhälfte zeigt (Männer, 2000). Das cXin besitzt während dieses Prozesses eine asymmetrische Expression, so daß eine höhere Expressionsrate in der inneren Krümmung des sich krümmenden Herzschlauches beobachtbar ist. Eine spezifische Repression der Expression von cXin in Hühnerembryonen durch Antisense-Oligos verhinderte effektiv und spezifisch den komplizierten Prozeß der dextralen Krümmung des Endokardschlauchs. In der Maus lokalisierte das Protein des weiteren in der adulten Herzmuskulatur an den Zell-Zellkontakten der Glanzstreifen (Wang et al, 1999) und in den Skelettmuskeln an den Muskel-Sehnen-Verbindungen und zeigte keine Lokalisation innerhalb der Z-Scheiben der Myofibrillen bzw. den Costameren (Sinn et al., 2002). Eine Expression von Xin ist außerdem in den Myotomen der Somiten gezeigt worden, die die Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur enthalten (Wang et al., 1999). Sinn und Kollegen konnten über Immunpräzipitation zeigen, daß Xin im Cadherin-Catenin-Komplex enthalten ist. Die Autoren vermuten für Xin Funktionen in der Myogenese, der Organisation des Aktinzytoskeletts, inklusive Myofibrillogenese und Zell-Zell-Kontaktformation.

Die vorliegende Arbeit behandelt die Fragestellung nach Lokalisation und möglichen Funktionen von Xin. Dieser Fragestellung wurde mit diversen zellbiologischen, fluoreszenzmikroskopischen und biochemischen Versuchen nachgegangen. Für diesen Zweck wurden anhand der Sequenzdaten verschiedene Domänen und trunkierte Varianten des

humanen Xin subkloniert. Diese Subklone wurden in Transfektionsstudien in verschiedenen Muskel- und Nichtmuskelzellen auf ihre Lokalisation und möglichen Einflüsse hin untersucht. Für die Analyse des räumlichen wie auch zeitlichen Expressionsmusters von Xin im Zusammenhang mit dem Prozeß der Myofibrillogenese wurden kultivierte humane Skelettmuskelzellen sowie myogenisierte Glattmuskelzellen genutzt. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Skelett- und Herzmuskelgewebe sollten weiteren Aufschluß über die Lokalisation von Xin in diesen Geweben geben. Des weiteren wurden die charakteristischen Motive von Xin biochemisch auf eine mögliche Funktion hin untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Laborchemikalien wurden in der Qualität *zur Analyse* der Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva, und Sigma verwendet. Nähere Angaben sind bei den verwendeten Substanzen zu finden.

2.1.2 Bakterienstämme

Folgende *E. coli*-Stämme wurden für cDNA-Klonierungen und Expressionen rekombinanter Proteine benutzt. Die *E. coli*-Stämme JM109 und SCS110 wurden für Klonierungen von Plasmiden (inclusive cDNA) verwendet. Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS diente der Expression rekombinanter Proteine.

E. coli **JM109** (Stratagene), Genotyp: *e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK-mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacI^qZΔM15*]

E. coli **SCS 110** (Stratagene), Genotyp: *rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galk galT ara tonA tsx dam dcm supE44D (lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacI^qZΔM15*]

Anmerkungen zum Genotyp beider Bakterien: Die Mutationen in der Rekombinase, *recA1*, sorgen für eine Insertstabilität, wohingegen Mutationen in den unspezifischen Endonukleasen, *endA1* und *hsdR17* einen Verdau der geklonten DNA verhindern und somit für eine erhöhte Ausbeute in der Plasmidpräparation sorgen. Die Mutation der Methylasen *Dam* und *Dcm* verhindern Methylierungen an Adenine bzw. Cytosin der DNA, womit ein Verdau der DNA (in nachfolgenden Klonierungsschritten) durch methylierungssensitive Endonukleasen (*XbaI*, *Clal*, *EcoR II*) nicht behindert wird.

E. coli **BL21(DE3)pLysS** (Novagen), Genotyp: F- *dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal λ (DE3)* [pLysS Cam^r]^a.

2.1.3 Antibiotika

Folgende Antibiotikakonzentrationen wurden eingesetzt:

Carbenicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml

2.1.4 Vektoren

Vektor pCMVT7

Der Vektor pCMV5FS bzw. pCMVT7 diente als Klonierungsvektor der cDNAs in *E. coli* und als Expressionsvektor für rekombinante Proteine in Säugetierzellen. Die Expression der Konstrukte lag unter der Kontrolle des Zytomegalie-Virus-(CMV)-Promotors. Die exprimierten Produkte besaßen N-terminal einen Fusionsteil, der einen 12-Aminosäuren langen T7-Immunitag darstellte, der eine immunologische Detektion der Produkte ermöglichte. Der T7-Tag kodiert für eine partielle Aminosäuresequenz die den N-terminalen Teil eines Capsidproteins des T7-Phagens darstellt. Die Vektorkarte für den pCMV5FS-Vektor befindet sich in Abb. 50 S. 129.

Vektor pMyP-G

Für die Klonierung der cDNA in *E. coli* und Expression der rekombinanten Proteine in Säugetierzellen wurde der Vektor pMyP-G verwendet. Für die Synthese des Vektors pMyP-G wurde der Vektor pCAT®3-Enhancer-Vektor (Promega) umgebaut. Die Grundlage bildete hierbei ein pCAT®3-Enhancer-Vektor mit einkloniertem und in Muskelzellen spezifisch aktiven Myomesinpromotor. Zuerst wurde eine im Ursprungsvektor enthaltene Schnittstelle für SalI und BamHI über Restriktionsverdau, „blunt end“ Generierung und Ligation ausgelöscht. Desweiteren wurde die CAT-Kassette gegen eine Klonierungskassette eingetauscht, die die cDNA für das EGFP (MluI-BamHI-HindIII*-SalI-EGFP-STOP-XbaI, *HindIII nicht einzigartig) beinhaltete. Das EGFP wurde aus dem EGFP-N3 Vektor (Clontech) herausamplifiziert. Da die cDNA für das EGFP am 3' Ende des Inserts lokalisiert ist, wird das exprimierte rekombinante Protein C-terminal mit dem EGFP fusioniert. Die Einklonierung der cDNA-Inserts in diesen neuen Vektor erfolgte über die Schnittstellen MluI-SalI. Der Vektor wurde speziell für die Expression in differenzierenden und differenzierten Muskelzellen hergestellt. Diese Spezifität konnte nicht erhalten werden, so daß eine Expression auch in transfizierten Nichtmuskelzellen, wie auch in proliferierenden Myoblasten zu beobachten war. Der Vektor wurde daher als Standardvektor für die Transfektionsstudien genutzt. Die Vektorkarte befindet sich in Abb. 51 S. 130

Vektor pET-23W2

Für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurde ein modifizierter pET-23a Vektor (Novagen) verwendet. Der originale Vektor besitzt 5' des Inserts eine T7-Tag sowie 3' einen Hexahistidin-Tag. Der in dem exprimierten Fusionsprotein C-terminal gelegene Hexahistidin-Immunitag diente der Aufreinigung des rekombinanten Proteins über eine Ni-NTA-Matrix. Die Expression der rekombinanten Proteine im *E. coli* Stamm

BL21(DE3)pLysS wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Abb. 52 auf S. 131 zeigt hierzu eine Übersicht.

pBluescript II KS+ MyoD

Der Vektor pBluescript II KS+ enthielt ein 1787 bp großes Fragment des bHLH-Proteins MyoD unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die Expression von MyoD wurde zur Myogenisierung von Nichtmuskelzellen genutzt, um eine (partielle) Myogenese zu induzieren. Die Expression des Transkriptionsfaktors wurde über die Immundetektion muskelspezifischer Proteine, wie sarkomeres α -Aktinin und Titin nachgewiesen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um Kontaminationen mit Fremd-DNA zu vermeiden, wurden Pipetten und PCR-Reaktionsgefäße separat aufbewahrt. Der PCR-Ansatz wurde auf Eis angesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz von 20 μ l und enthielt zwischen einigen fg bis zu 100 ng DNA, 2 μ l des vom Hersteller des verwendeten Enzyms mitgelieferten Reaktionspuffers, 200 μ M dNTPs, 10 pmol jeden Primers, 1,5 mM MgCl₂ (wenn nicht schon im Reaktionspuffer enthalten) und 0,5 U DNA-Polymerase (z. B. Pfu-DNA-Polymerase). Die PCR wurde mit vom Primer abhängigen *Annealing*-Temperaturen unter folgenden Parametern durchgeführt: 4 min Denaturierung bei 95°C; gefolgt von bis zu 40 Zyklen 95°C für 30 s, Annealing für 20 s, Elongation bei 68 °C - 72°C für 40 s bis 10 min; gefolgt von einer Elongation für 7 min. Vom PCR-Produkt wurden für weitere Klonierungsschritte 5 μ l des Ansatzes mit den geeigneten Restriktionsenzymen verdaut.

2.2.2 Restriktionsverdau von DNA

Für die gerichtete Ligation eines Inserts in ein Plasmid bedarf es kohäsiver Enden, die mit Hilfe von Restriktionsenzymen generiert werden können. Hierbei müssen Plasmid und Insert mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut worden sein. Restriktionsenzyme schneiden DNA an spezifischen, zumeist palindromen Sequenzen, die häufig aus 4 bis 6 Basenpaaren bestehen. Ein typischer Restriktionsverdau enthielt die in ddH₂O gelöste DNA, Restriktionsenzym (2 U/ μ g DNA) und den vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffer. Der Ansatz wurde bei 37°C oder Raumtemperatur inkubiert. Je nach Zweck des Verdaus, analytisch (Überprüfung der DNA-Sequenz eines Inserts) oder präparativ (Generierung der

kohäsiven Enden) wurde die Inkubationsdauer von 1 bis 8 h ausgedehnt. Die verdauten DNA-Proben wurden mittels einer Agarosegelelektrophorese analysiert und präpariert.

2.2.3 Desphosphorylierung der 5'-Enden der Plasmid-DNA

Zur Verhinderung einer unerwünschten Rückligation der präparativ verdauten Plasmid-DNA wurde eine Desphosphorylierung der 5'-Enden der Plasmid-DNA durchgeführt. 10 µg Plasmid-DNA wurden mit 1 Einheit der alkalischen Phosphatase (CIP, Calf Intestine Phosphatase, Boehringer Mannheim, Deutschland), 4 µl 10x Puffer und A. bidest in einem Volumen von 40 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Zugabe von 50 µl A. bidest und 1 µl 500 mM EDTA sowie einer Inkubation bei 65° C für 10 min.

2.2.4 Ligation von Insert und Plasmid

Der Ligation eines DNA-Inserts in ein vorgegebenes Plasmid geht der Verdau beider DNAs durch gleiche Restriktionsenzyme voraus. Weiterhin sollten Insert und Plasmid aufgereinigt vorliegen. Für eine Ligation wurden 1,0 µl Plasmid-DNA, 2,0 µl Insert-DNA, 1,0 µl 10x Enzypuffer, 1U T4-Ligase (1 U/µl) und 6,8 µl dH₂O (Endvolumen 10 µl) zusammenpipettiert. Die Ligationszeiten betragen zwischen 3 h bei RT und über Nacht bei 16 °C.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA-Präparationen erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm in einer 1 cm breiten Quartzküvette. Hierbei entspricht 1 OD bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient der Extinktionswerte aus 260 und 280 nm gibt die Reinheit der DNA-Lösung bzw. Verunreinigung durch Proteine wieder. So stellt ein Quotient von 1,8 eine reine und 1,5 eine mit 50 % Protein verunreinigte DNA-Lösung dar. Die Messungen erfolgten in 1x TE-Puffer.

2.2.6 Hitzeschock-vermittelte Transformation von *E. coli* mit Plasmid - DNA

Zu 100 µl (auf Eis aufgetauten) kompetenten Bakterienzellen (z.B. *E. coli*, Stamm BL21, JM109, SCS110) wurden 1-4 µl DNA-Lösung gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit bindet die DNA an die Oberfläche der Bakterien. Das Einbringen der DNA in die Bakterienzellen erfolgte über Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 80 s. Die Zellen wurden hiernach zum Abkühlen 2 min auf Eis gestellt und mit 500 µl SOC-

Medium (10 mM Glukose in SOB-Medium: 2 % (w/v) Bacto Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 7,0) verdünnt. Die Bakterien wurden für 1h bei bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Es folgte eine kurze Zentrifugation zum Sedimentieren der Bakterien, eine Resuspension in 100 µl SOC und das Ausplattieren von 10µl und 90 µl der Resuspension auf einer antibiotikumhaltigen Agar-Platte (1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB Medium). Nach einer Übernacht-Inkubation bei 37° C im Inkubator, wurden die Kolonien für die Mini-Plasmidpräparation oder Proteinexpression weiterverwendet.

2.2.7 Übernacht-Kultur von *E. coli*

5 ml LB-Medium, 1,5 % (w/v) Bacto-Agar, 1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 8,5 mM NaCl, pH7,5), 37 °C, inklusive eines auf das verwendete Plasmid abgestimmten Antibiotikums, wurden mit je einem Klon, d. h. eine Bakterienkolonie der Transformationsplatten bzw. Glycerolkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Für größere Ansätze wurde eine Vorkultur von 5 ml für 3-5 h herangezogen, die zur Inokulation einer 50 - 200 ml Kultur benutzt wurde.

2.2.8 Plasmidpräparationen aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation aus den Übernachtskulturen von *E. coli* erfolgten im Mini-Maßstab (1,5 ml Kultur) mittels TELT-Puffer und im Midi-Maßstab mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Deutschland).

2.2.9 Mini-Plasmidpräparation

Von einer 3 ml *E. coli*- Übernachtskultur wurden 1,5 ml bei 4000 x g für 5 min abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 150 µl TELT Puffer (50 mM Tris-HLC, pH 7,5 , 60 mM EDTA, 0,4 % Triton X-100, 2,5 M LiCl, A. bidest) resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde Lysozym (Boehringer Mannheim, Deutschland), in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zur Resuspension pipettiert und vorsichtig gemischt. Hiernach folgten Inkubationen für 5 min bei RT, 2 min bei 95 °C und 5 min auf Eis. Das Lysat wurde bei 20.000 x g für 15 min abzentrifugiert, das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und der Überstand weiterverarbeitet. Zum Überstand wurden 0,6 bis 0,8 Volumina Isopropanol dazugegeben, gemischt , und optional für 30 min bis 1h bei -20 °C inkubiert, und anschließend 15 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet (DNA) zwei mal mit je 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, dem sich jedesmal ein weiterer Zentrifugationsschritt,

20.000 x g für 6 min, anschliess. Das gereinigte Pellet wurde luftgetrocknet und in 50 µl 1x TE-Puffer (10 mM TrisHCl, pH 8, 1mM EDTA), inklusive RNase A, aufgenommen. Da in dieser Präparation RNA vorhanden ist, wurde der 1x TE-Puffer mit RNase A (Boehringer Mannheim, Deutschland), Endkonzentration 10 µg/ml, versetzt. Der 1x TE/RNase-DNA-Ansatz wurde für 5 min bei RT und hiernach 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Die DNA wurde mittels Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.10 Midi Plasmidpräparation

Die Präparation größerer und reiner Mengen an Plasmid-DNA wie sie z.B. für die Transfektionen verwendet wurden erfolgten unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Midi Kits (Qiagen, Deutschland) und folgte den Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurde in mit RNase A versetzten 1x TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde gemessen und auf 1 µg/µl eingestellt.

2.2.11 Agarosegelelektrophorese

In TAE Puffer (50x TAE: pH8,3, 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 50mM EDTA) wurde 1 % (w/v) Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlung auf 60 °C und Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) in die Gelformen mit Plastikrücken für die Geltaschen gegossen. Die DNA-Probe wurde mit 0,5-fach TAE-Puffer und Probenpuffer (60 mM EDTA, 30 % (v/v) Glycerol, 0,5 ng/ml Bromphenolblau) auf 10 µl aufgefüllt. Die Probe wurde in die Geltaschen des Geles pipettiert und das Gel bei einer Spannung von 50 V zum Einziehen der Probe und 80 V zum Auftrennen der Probe elektrophoriert. Die Laufweite des Geles wurde anhand der Bromphenolblaubande eingeschätzt und die Elektrophorese bei Erreichen der gewünschten Auftrennung der DNA beendet. Die (meist bekannten) Größen der DNA wurden im Vergleich mit dem mitaufgetragenen Molekulargewichtsmarker abgeschätzt.

2.2.12 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die durch Ethidiumbromid markierten DNA-Banden wurden auf dem UV-Leuchttisch ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Isolation der aufgetrennten bzw. aufgereinigten DNA-Fragmente bzw. Plasmide aus dem Agarosegel mit dem NuClean Kit von ENERGENE (Energene, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

2.3.1 Expression und Präparation rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Von einer Übernachtskultur *E. coli* BL21(DE3)pLysS, in die die Vektoren pET-23W2 mit cDNA-Insert transformiert worden war, wurden 1 ml für die Animpfung von 500 ml LB-Medium, inklusive 100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol und 2 % (w/v) Glucose, genutzt. Der Ansatz wurde bei 37°C auf dem Schüttler bei 175 rpm für 3 h kultiviert bis die Kultur eine OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1 erreicht hatte. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von von X µl 1M IPTG (Endkonzentration 0,1 -0,5 mM) induziert und die Bakterien für weitere 3 h kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend bei 4000-5000 x g, für 5 min, bei 4 °C sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde bei -20 °C gelagert und für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine verwendet. Die Aufreinigung der mit einer C-terminalen Hexahistidinsequenz fusionierten rekombinanten Proteine über eine Ni-NTA-Matrix erfolgte mit dem Qiagen Kit (The QIAexpressionist) unter nativen Bedingungen. Das Bakterienpellet wurde auf Eis für 15 min aufgetaut und in Puffer A (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert und durch Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 1mg/ml) für 30 min auf Eis lysiert. Die lysierten Zellen wurden auf Eis sonifiziert (5 x 10 s, 200-300 W mit UP50H, Hielscher Systems GmbH) und anschließend bei 10.000 x g, 4 °C für 20-30 min pelletiert. Der Überstand wurde 4:1 mit Ni-NTA-Agarose (v/v) gemischt und für eine Stunde bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. In dieser Zeit banden die Hexahistidin-Sequenzen an die Ni-NTA-Agarose. Unspezifische Bindungen von bakteriellen Proteinen über Histidine an die Ni-NTA-Agarose- wurden durch 10-20 mM Imidazol im Puffer A und B (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) unterbunden. Der Ansatz wurde bei 300 x g sedimentiert, der Überstand verworfen, das Pellet 2 x mit 4 ml Puffer B gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde hiernach in 500 µl Puffer B aufgenommen und in die mit Puffer B (2 ml) equilibrierte Leersäule (mit Fritte) transferiert. Nach Durchlauf des Waschpuffers wurde das Protein mit 4 x 500 µl Elutionspuffer (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) von der Ni-NTA-Matrix eluiert. Die 500-µl-Fractionen wurden in Eppendorfgefäßen aufgefangen und anschließend weiterverwendet bzw. auf Eis im Kühlraum gelagert. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktion wurden durch folgenden Schnelltest überprüft: 1 µl der Fraktion wurden auf Nitrozellulosemembran getropft, getrocknet und 5min mit Ponceau-Rot-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau-Rot, 0,01 % (v/v) Essigsäure, 0,15 % (w/v) Trichloressigsäure, 0,15 % Sulfosalicylat, alles in A.dest) gefärbt, in

A. dest entfärbt und getrocknet. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden in einer SDS-PAGE überprüft.

2.3.2 Präparation von Aktin aus Muskelgewebe

Es wurden 500g gehacktes Hühnerfleisch (hier Brustmuskel) mit 1,5 l eiskaltem Hochsalz-Extraktionspuffer (300 mM KCl, 150 mM KHPO₄ 20 mM EDTA, 5mM MgCl₂, 1 mM ATP, pH 6.5) gemischt. Nach Zugabe von 1,5 l eiskaltem A. dest wurde das Hühnerfleisch mittels Blender homogenisiert und bei ca. 3500 x g und 4°C für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in 0,5 Vol Waschpuffer (40 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM EGTA, 10 mM Imidazol, 10 mM TRIS, pH 6.5) und 0,5 Vol A.dest. erneut homogenisiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Das Pellet wurde hiernach in eiskaltem Wasser homogenisiert und abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch weitere 3x wiederholt, wobei die letzte Zentrifugation auf 30 min ausgedehnt wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 3 Vol eiskaltem Aceton versetzt, homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Dieser Schritt, der zur Entfernung des Wassers diente, wurde weitere 3x wiederholt. Abschließend wurde das Pellet nochmals in eiskaltem Aceton homogenisiert. Das Aceton wurde über Vakuumpumpe, Fritte und Filterpapier vom Pellet abgetrennt und verworfen. Das so „trockene“ Pellet wurde (mit Handschuhen) zerkleinert und zur weiteren Trocknung über Nacht auf Filterpapier ausgelegt. Anschließend wurde das Gewicht bestimmt. Das fertige Acetonpuder wurde bei -20°C bzw. -70°C gelagert. Es enthält neben Aktin auch diverse aktinbindende Proteine wie Tropomyosin und α -Aktinin.

Die Isolierung von G-Aktin aus einer Acetonpuderpräparation erfolgte folgendermaßen: Hierzu wurden 1 g Acetonpuder in 10 ml eiskaltem G-Aktin-Puffer (0,2 mM ATP, 0,2 mM CaCl₂, 20 mM Imidazol, pH 8.0) für 30 min bei 4 °C vermischt. Der G-Aktin-Puffer mit dem extrahierten Aktin wurde in ein anderes Gefäß überführt und auf Eis bei 4 °C gelagert. Das Acetonpuderpräparat wurde wiederum in 10 ml G-Aktinpuffer aufgenommen und die oben beschriebene Prozedur wiederholt. In einer Ultrazentrifugation von 20 min bei 4 °C und 10.000 g wurden mögliche im Extrakt vorhandene denaturierte Proteine sedimentiert. Der klare Extrakt wurde, zur Anreicherung von G-Aktin, einem Zyklus an Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation unterzogen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von MgCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM) und KCl (Endkonzentration 100-150 mM) induziert und für 45 bis 90 min auf Eis gerührt, bis die Lösung viskos wurde. Eine Ultrazentrifugation bei 100.000 g, 1-2 h, 4 °C sedimentierte das F-Aktin. Das Pellet wurde in 5-10 ml G-Aktinpuffer aufgenommen. Das Pellet, in G-Aktinpuffer resuspendiert, wurde gegen frischen G-

Aktinpuffer (2 l) über 2 Tage bei 4 °C, dialysiert, um eine Depolymerisation des F-Aktins zu erreichen. Der zur Dialyse verwendete G-Aktin-Puffer wurde alle 12 Stunden, frisch angesetzt, erneuert. Die G-Aktin Präparation wurde für maximal 1 Woche auf Eis gelagert und für die Aktin-Kosedimentations-Versuche eingesetzt.

2.3.3 Aktinbindungsassay

Der Aktinbindungsassay erlaubt die Analyse von Proteinen oder Proteindomänen auf ihre mögliche Aktin-bindenden und -bündelnden Aktivitäten. Weiterhin kann über die Sättigung der F-Aktinfilamente mit dem Protein X das molare Verhältnis zwischen Aktin und Protein X ermittelt werden. Das G-Aktin wurde aus einer Acetonpuderpräparation des Brustmuskels des Huhnes extrahiert. Die Konzentration der G-Aktinpräparation wurde mit dem BCA-Assay festgestellt. Der Assay wurde in den Ultrazentrifugengefäßen in einem Gesamtvolumen von 100 µl und mit einer Aktinkonzentration von 5 µM durchgeführt. Es wurden 20 µl 25µM G-Aktinpräparation mit 8 µl 10x Polymerisationspuffer (2 mM ATP, 10 mM EGTA, 20 mM MgCl₂, 1000 mM KCl, 200 mM Imidazol, pH 7,5) 52 µl A. bidest versetzt. Die Ansätze wurden für 45 min bei RT zur vollständigen Polymerisation des G-Aktins inkubiert. Zu dem polymerisierten Aktin wurden 20 µl steigender Konzentrationen an Protein X (in 1x Polymerisationspuffer) gegeben, so daß das Gesamtvolumen 100 µl betrug. Die Ansätze wurde für weitere 45 min bei RT inkubiert und anschließend bei 4 °C und 100.000 g für die F-Aktinbindungsanalyse (Sedimentation der F-Aktinfilamente) bzw. 10.000 g für die F-Aktinbündelungsanalyse (Sedimentation der F-Aktinbündel) für 45 min ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 25 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde in 100 µl 1x Polymerisationspuffer und 25 µl 5x SDS Probenpuffer aufgenommen. Beide Proben wurden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese miteinander verglichen. Bei einer Bindung des Proteins X an F-Aktin wird dieses mit dem F-Aktin sedimentieren. Eine Sättigung des F-Aktins mit Protein X ist in den Pelletfraktionen daran erkennbar, daß eine Zunahme des Proteins im Ansatz keine Zunahme im Pellet folgt, sondern dieses im Überstand verbleibt. Bei Bündelung des F-Aktins durch das Protein X erfolgt eine von der Konzentration des Proteins X abhängige Zunahme an sedimentierten F-Aktinbündel (F-Aktinfilamente werden nicht sedimentiert).

2.3.4 Proteinextraktion aus Zellkulturzellen

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellkulturzellen wurden diese zweimal kurz mit kaltem PBS gewaschen, anschließend mit 95 °C heißem 4x SDS-Probenpuffer versetzt und mit Gummischaber von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, für 2 min bei 95 °C inkubiert und durch eine dünne Spritzenkanüle zur Homogenisation und Scheren von DNA aufgezogen. Die Endkonzentration von 1 x SDS-Probenpuffer wurde durch entsprechende Zugabe an A. dest und die vollständige Denaturierung durch Inkubation der Proben für weitere 2 min bei 95 °C erreicht. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine erfolgte durch einen Bicinchoninsäure (BCA)-Assay (Interchim, Österreich) nach Angaben des Herstellers. In diesem durch hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit gekennzeichneten Assay bindet Cu^{2+} in einer Biuretreaktion insgesamt 4 Amidgruppen zweier Proteine oder Peptide in einer alkalischen Lösung. Die Bindung reduziert Kupfer zu Cu^{1+} , das von der Bicinchoninsäure chelatiert und einen Farbumschlag von Apfelgrün (freie BCA) nach Blau-Violett (mit Kupfer komplexierte BCA) ergibt. Die Farbintensität ist von der Proteinkonzentration linear abhängig. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm. Als Standard wurde BSA (Interchim, Österreich) benutzt.

2.3.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele

Die Proteinproben wurden mit einem Drittel ihres Volumens mit SDS-Probenpuffer (10 % SDS (w/v), 15 % β -Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, 0,3 % (w/v) Bromphenolblau, 3 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 8,4) gemischt und für 1 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden in die Geltaschen der Sammelgele der SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Bei den hier verwendeten SDS-PA-Trenngelen handelte es sich um lineare Polyacrylamidgele verschiedener Konzentrationsbereiche (6-12 %), die in Abhängigkeit von den Größen der zu separierenden Proteine gegossen wurden. Die Sammelgele besaßen eine Polyacrylamidkonzentration von 3 %. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke (10 mA) oder konstanter Spannung (100 V) in einem Laufpuffer (0,1 % (w/v) SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glyzin). Die Anfärbung der Proteinbanden im Gel erfolgte für 20-30 min in einer Färbelösung (5 g Coomassie Blau R 250, 185 ml Essigsäure, 900 ml

Methanol, A. dest auf 2 l) mit anschließend er mehrstündiger Entfärbung (1,5 l Essigsäure, 1 l Methanol, A. dest auf 3 l).

2.3.7 Proteintransfer

Der Proteintransfer der über die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte über das Nassverfahren (Tankblot). Filterpapier, Schaumstoffkissen und Nitrozellulosemembran wurden jeweils in Puffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glyzin, 18 % Methanol, 0,01 % SDS) getränkt. Auf die Kathodenseite der Kassette wurden 1 Schaumstoffkissen und 2 Filterpapiere gelegt, worauf das Gel platziert wurde. Auf das Gel wurden, in Richtung Anode, Nitrocellulosemembran sowie 2 Filterpapiere und 1 Schaumstoffkissen platziert. Die fertige Kassette wurde in die mit kaltem Puffer gefüllte Blot-Kammer gesetzt. Der Proteintransfer erfolgte im Kühlraum, auf einem Rührer, bei konstanter Stromstärke (250 mA) über Nacht. Die Nitrozellulosemembran wurde hiernach abgenommen, kurz in A. dest gewaschen und für 2-3 min in Ponceau-Rot gefärbt, in A. dest entfärbt, getrocknet und dokumentiert. Markerbanden usw. wurden mit Bleistift markiert.

2.3.8 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulose

Der Nachweis spezieller Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran erfolgte über die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern. Die Nitrozellulosemembran wurde zur Verhinderung unspezifischer Signale für 1 h mit 5 % Blockmilch (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS/T) inkubiert. Die Blockmilch wurde abgesaugt und die Antikörper-PBS/T-Lösung für mindestens 1 h bei RT aufgetragen. Die Membran wurde anschließend zwei mal kurz und zwei mal 5 min mit TBS/T gewaschen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper und ein Waschschrift. Die Detektion des sekundären Antikörpers, der mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, erfolgte über Chemilumineszenz. Die Nitrozellulosemembran wurde für 5 min in einer Luminol-Verstärkerlösung getränkt. Hierbei oxidiert die Peroxidase Luminol, was zu einer Emission bei 430 nm und Belichtung des Röntgenfilms führt. Die Nitrozellulose wurde in Klarsichtfolie eingelegt, um das Naßwerden des Films zu verhindern, und zur Belichtung des Röntgenfilms in eine Filmkassette gelegt. Die Belichtungsdauer wurde der Stärke des Signals angepaßt. Es wurde das Chemilumineszenz Kit Supersignal[®] West Pico von Pierce benutzt (Pierce Biotechnology Inc. USA).

2.3.9 Antikörper-Antigen-Bindungsassay

Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper wurde ein Antikörper-Antigen-Bindungsassay durchgeführt. Hierzu wurden rekombinant exprimierte Proteine in verschiedenen Konzentrationen, die die Antigene bzw. ein Negativ-Kontrollpeptid darstellten mit den zu testenden Antikörpern für 24 h bei 4 °C inkubiert. Mögliche Aggregationen wurden anschließend kurz abzentrifugiert. Die Ansätze wurden wie beschrieben für die Immunmarkierung (Nitrozellulose, Zellen, oder Gewebe) weiterverwendet. Spezifische Immunsignale (Immundetektion) sollten konzentrationsabhängig durch die Bindung des Epitops am Antikörper reduziert bzw. eliminiert werden. Die Kontrolle sollte hierbei keinen Einfluß aufweisen. Unspezifische Signale bleiben erhalten. Die verschiedenen Konzentrationen an Antigen und Kontrollpeptid verhindern, daß eine beobachtete Blockierung der Immunreaktivität des zu überprüfenden Antikörpers oder Antiserum nur auf unspezifische, allgemeine Blockierung durch z. B. zu viel Protein erfolgte.

2.4 Histologische und immunhistologische Methoden und Mikroskopie

2.4.1 Präparation von Gefrierschnitten

Skelettmuskelgewebe wurde in von flüssigem Stickstoff gekühlten Isopentan schockgefroren. Das Schneiden der Gefrierschnitte (5- 8 µm Dicke) erfolgte mit dem Mikrotom-Kryostat HM 500 OM von MICROM bei -20 °C. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und bei -80 °C gelagert. Die Fixierung und Permeabilisierung für die Immundetektion erfolgte für jeweils 5 min in Methanol und Aceton (beide -20 °C). Die Schnitte wurden luftgetrocknet, mit einem Fettstift umrandet, in PBS gewaschen und hiernach für die Immunfluoreszenz weiterverwendet.

2.4.2 Präparation von Zellen

2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Detektion der intrazellulären Verteilung zell- und gewebespezifischer oder ektopisch exprimierter Proteine wurden die Zellen bzw. Gewebeschnitte fixiert und permeabilisiert. Nach einem Waschschrift in PBS wurden zur Blockierung von unspezifischen Immunreaktionen 10 % normales Ziegen Serum in PBS/T auf die Präparate für 15 min bei RT aufgetragen. Der primäre Antikörper (in PBS/T), zur Detektion des nachzuweisenden Proteins

wurde für 1 h bei RT auf die Präparate appliziert. Nichtgebundene Antikörper wurden anschließend in einem 2 x 5 minütigen Waschschrift in PBS/T entfernt. Hiernach erfolgte zur Detektion des primären Antikörpers die Applikation des sekundären Antikörpers für 1 h bei RT. Dem anschließenden Waschschrift folgte die Einbettung in Mowiol. Die hier verwendeten Antikörper sind im Anhang unter Tab. 13 S. 128 aufgelistet.

2.4.4 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Zeiss Axiovert 200 (Zeiss, Deutschland) mit dem „Plan Neofluar“-Objektiv , 63x/1,25, Öl, Ph3 (Zeiss) unter Verwendung einer CCD RT Monochrome SPOT Camera (Diagnostics instruments, Inc. USA), durchgeführt. Das Mikroskop war mit einem extern ansteuerbaren Filterrad (Visitron Systems, Deutschland) mit Filtern für eine Einzelanregung bei 395 nm (DAPI), 484 nm (FITC, GFP) und 555 nm (TRITC, Cy3) ausgestattet, die auf einen Filterkubus mit einem Farbteiler und Emissionsfilter (61000 v2 SBX, Chroma Technology Corp., USA) für die 3 entsprechenden Emissionen abgestimmt waren. Desweiteren wurden Aufnahmen unter Verwendung der Filtersets 02 (BP 530-583 FT 600 LP 615 nm; Texasred) und 10 (BP 450-490 FT 510 BP 515-565, GFP, FITC) von Zeiss (Zeiss, Deutschland) gemacht. Die Lebendaufnahmen der Zellen erfolgten im geschlossenen Focht Chamber System, FCS2 unter Verwendung der Heizeinheiten; Bioptechs Objective und FCS2 Controller (Bioptechs, Inc., USA) bzw. im offenen Kammersystem von Warner Instruments, Inc., USA unter Verwendung der Heizeinheit one Chan Heat Controller (Warner Instruments, Inc., USA). Die Aufnahmen erfolgten mit dem auf Mikroskop und Kamera abgestimmten Programm Metamorph 4.6 (Visitron Systems, Deutschland), das Filterrad und CCD Kamera steuerte. Die Nachbearbeitungen der Aufnahmen erfolgten im Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., USA) und Corel Draw 10 (Corel Corp., USA).

2.5 Zellkultur von Säugerzellen

2.5.1 Auftauen, Passagierung und Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden (in einem 2 ml Einfriergefäß eingefroren) aus dem Stickstoff geholt und in einem 37° C warmen Wasserbad schnellstmöglich aufgetaut. Das Auftauen sollte schnell erfolgen, da im Einfriermedium DMSO enthalten ist, und dieses in einigen Primärkulturen und etablierten Zelllinien den intrazellulären Kalziumgehalt ansteigen läßt (Morley und Whitfield, 1993). Kalzium kann in einigen Zellkulturen u.a. als Differenzierungsstarter wirken (Morley und Whitfield, 1993). Die Zellen wurden daher mindestens 1:5 bis 1:10 in

vorgewärmten, 37° C warmen Zellkultur-Medium verdünnt. Eine anschließende Zentrifugation bei ca 200 g für 5 min bei Raumtemperatur sedimentierte die Zellen. Der Überstand wurde abgesaugt und einer anschließenden, schonenden Resuspension im warmen Zellkulturmedium folgte die Aussaat der Zellen in geeigneter Zelldichte und Zellkulturschale.

Zum Passagieren der Zellen wurden alle verwendeten Medien und Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden kurz und vorsichtig mit 0,5mM EDTA/PBS gespült. Das EDTA soll hierbei Kalzium binden, welches in der Adhäsion der Zellen beteiligt ist. Der Waschschrift sorgt desweiteren für die Ablösung und Herauswaschung toter Zellen und Zelltrümmer. Das EDTA/PBS wurde abgesaugt. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1-2 ml einer PBS-Trypsin-Lösung. Der in % angegebene Trypsingehalt wurde der Empfindlichkeit der verwendeten Zellen angepaßt. Für die Ablösung und Vereinzelung der Zellen wurden die Zellen bei 37 ° C im Brutschrank inkubiert. Je nach Zelllinie dauerte diese Ablösung zwischen 2 bis 8 min. Der Trypsinisierungsprozeß wurde mit 2 Volumen des Kulturmediums abgeblockt und die vereinzelt und nun abgerundeten Zellen wurden vorsichtig resuspendiert. Diese Suspension wurde nun in geeigneter Zelldichte passagiert.

Für das Einfrieren der Zellen wurden diese wie gehabt für die Passagierung trypsinisiert. Der Trypsinierungsprozeß wurde durch Zugabe von mindestens 2 Volumen an warmem Zellkulturmedium abgeblockt. Die Zellen wurden schonend resuspendiert. Eine Zentrifugation bei 200 g für 5 min bei Raumtemperatur sedimentierte die Zellen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in einem eiskalten Zellkulturmedium oder FCS resuspendiert, welches mit DMSO, als „Frostschutzmittel“ versetzt war. Die genaue Zusammensetzung des Einfriermediums war den verschiedenen Zellen angepaßt. Die resuspendierten Zellen wurden als 1 ml-Aliquot in einem Einfriergefäß für 1 Stunde bei -20 °C und -80 °C über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff (für eine „unbegrenzte“ Dauer) gelagert. Bei der Aliquotierung ist darauf zu achten, daß eine für die Starterkultur ausreichende Zelldichte vorhanden ist.

Alle hier verwendeten Zelllinien und Zellkulturen wurden in einem NuAir Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer gesättigten Luftfeuchte kultiviert.

2.5.2 *In vitro* Kultur von A7r5-Zellen

Die A7r5-Zellen (ATCC, CRL-1444) sind Glattmuskulatur-Zellen mit adultem Phänotyp, die aus der Aorta von Rattenembryonen (*Rattus norvegicus*) gewonnen wurden (Firulli et al. 1998). Die Aussaat und Kultivierung erfolgte in DMEM mit 10 % FCS, 2 % L-Glutamin, 1 %

Penicillin/Streptomycin, 2 % Na-Pyruvat und 1 % MEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Das Medium der Zellen wurde alle 2 bis 3 Tage erneuert und die Zellen bei Erreichen der optischen Konfluenz 1:2 bis 1:3 subkultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit 0,1 % Trypsin-PBS. Die Zellen wurden in Kulturmedium mit 5 % DMSO eingefroren.

Für die Lebendaufnahmen wurde das Medium statt mit DMEM mit L-15 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) angesetzt.

Für die Kultivierung der myogenisierten, konfluenten A7r5-Zellen wurden diese 24 h nach Transfektion auf einer 50/50 Mischung aus Differenzierungsmedium für Skelettmuskelzellen (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) und einem Medium aus DMEM supplementiert mit 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,4 % Ultrosor G (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert

2.5.3 *In vitro* Kultur von B16F1-Zellen

Bei den B16F1-Zellen (ATCC, CRL-6323) handelt es sich um eine Melanomzelllinie der Maus (*Mus musculus*). Die Aussaat und Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 10 % FCS, 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 % Na-Pyruvat und 1 % MEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Das Medium der Zellen wurde alle 2 bis 3 Tage erneuert und die Zellen bei Erreichen der optischen Konfluenz 1:10 subkultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit 0,25 % Trypsin-PBS. Die Zellen wurden in Kulturmedium mit 5 % DMSO eingefroren.

B16F1-Zellen auf Laminin beschichteten Glas- oder Zellkulturschalenoberflächen zeigen eine erhöhte Motilität mit ausgeprägten Lamellipodien. Die Beschichtung der Oberfläche erfolgte mit 25 µl/ml Laminin (L-2020, Roche Diagnostics).

Für die Lebendaufnahmen wurde das Medium statt mit DMEM mit L-15 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) angesetzt.

2.5.4 *In vitro* Kultur von Humanen Skelettmuskelzellen

Bei den Humanen Skelettmuskelzellen, HSkM, handelt es sich um eine Primärzellkultur aus humanen, adulten Satellitenzellen (*Homo sapiens sapiens*, Muskelbiopsie), die unter speziellen Kulturbedingungen proliferativ oder differenzierend gehalten werden können (van der Ven et al., 1992). Differenzierende HSkM Myoblasten fusionieren zu multinukleären Myotuben und großflächigen Synzytien und bilden quergestreifte und kontraktile Myofibrillen aus. Die Aussaat und Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 20 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 % Ultrosor G (alles Invitrogen,

Karlsruhe, Deutschland). Für eine Differenzierung wurden die Zellen in Differenzierungsmedium für Skelettmuskelzellen (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) überführt. Während des Differenzierungsprozesses wurde das Medium alle 2 Tage zur Hälfte aufgefrischt. Zum Einfrieren der Zellen wurde FCS mit 10 % DMSO verwendet.

2.5.5 *In vitro* Kultur von PtK2-Zellen

Bei den PtK2-Zellen handelt es sich um epitheliale Zellen aus der Niere der Känguruh-Ratte (*Potorous tridactylis*). Die Aussaat und Kultivierung erfolgte in DMEM mit, 10 % FCS, 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 % Na-Pyruvat und 1 % MEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Das Medium der Zellen wurde alle 2-3 Tage erneuert, die Zellen mit 0,1 % Trypsin/PBS abgelöst und 1:2 bis 1:3 subkultiviert. Zum Einfrieren der Zellen wurde Kulturmedium mit 5 % DMSO verwendet.

Für die Lebendaufnahmen wurde das Medium statt mit DMEM mit L-15 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) angesetzt.

2.6 Transiente Transfektionen von Säugerzellen

Die Transfektion von DNA und deren Expression in verschiedenen Zellsystemen ist ein wichtiges Werkzeug in der Erforschung von Genen und Genprodukten. Das Einbringen der DNA kann hierbei vielfältig erfolgen.

2.6.1 Transfektionen mit FuGENE 6

FuGENETM von Boehringer Mannheim enthält ein Gemisch aus Lipiden und nicht näher benannten Komponenten in 80 % Ethanol (Handbuch, FuGENE Boehringer Mannheim).

Für die Transfektion einer im Durchmesser 2 cm großen Kulturschale wurden in einem Eppendorfgefäß auf 97 - 94 µl DMEM 3-6 µl FuGENE 6-Reagenz gegeben (Gesamt 100 µl). Hierbei ist es wichtig, das Reagenz direkt in das DMEM zu geben, da eine Adsorption am Plastikröhrchen eine Ablösung von Kunststoffmachern bewirken kann. Diese würden sich negativ auf die Transfektionseffizienz auswirken. Das Röhrchen mit der verdünnten FuGENE-Reagenz verblieb für 5 min bei RT. Zu dem Ansatz wurden 1-2 µg DNA pipettiert und mit dem DMEM/Reagenz durch sanftes Pipettieren gemischt. Der Ansatz wurde für 10-15 min bei RT belassen. Die Zellen wurden mit frischem Medium versorgt und der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 5 bis 8 Stunden oder über Nacht transfiziert, das Medium hiernach gewechselt. Die Analyse der Transfektionsrate und der Expression der rekombinanten Proteine erfolgte frühestens 12 bis

24 Stunden nach Transfektionsbeginn (pT). Für Doppeltransfektionen wurden die gleichen Mengen an DNA für jedes Plasmid (1-2 µg DNA) beibehalten ohne die Volumina der Transfektionsreagenz zu erhöhen.

2.6.2 Transfektionen mit Superfect

SuperfectTM von Qiagen enthält Dendrimere die miteinander interagieren und somit eine verzweigte spherikale Architektur, mit definierter Größe und Struktur aufbauen. Diese spherikale Architektur, endet in positiv geladenen Aminogruppen, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren interagieren. Die Interaktion erfolgt hierbei ähnlich wie zwischen Histon und DNA. Die DNA-Dendrimer-Komplexe besitzen weiterhin eine positive Nettoladung und können so mit negativ geladenen Rezeptoren, wie z.B. sialylierten Glykoproteinen, in Kontakt treten. Eine Endozytose bringt die Komplexe als Lysosom in die Zelle. Die SuperfectTM-Reagenzien bewirken 1. eine Assemblierung der DNA in kompakten Strukturen, 2. eine Anlagerung an die Zelloberfläche und 3. eine Abpufferung der Lysosomen (pH-Inhibierung der lysosomalen Nukleasen) nach Fusion mit den Endosomen. Somit wird ein sicherer Transport der Superfect/NS-Komplexe in den Zellkern gewährleistet (Superfect Handbuch, Qiagen).

Für eine Transfektion einer kleinen Kulturschale mit 2 cm Durchmesser wurden in ein Eppendorf-Gefäß 2µg DNA, 100µl DMEM und 10µl Superfect durch 10 s Vortexen miteinander vermischt und für 10 min stehen gelassen. In dieser Zeit, bildeten sich die DNA-Superfect-Komplexe aus. Nach 10 min erfolgte die Zugabe von 600 µl Kulturmedium zum DNA-Superfect-Ansatz. Das Kulturmedium der Zellen wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 2ml DMEM vorsichtig gespült. Nach Absaugen des DMEMs erfolgte das Auftragen der Superfect/DNA/Kulturmedium-Lösung. Nach einer 3 bis 5 stündigen Inkubation im Inkubator (37°C, 5 % CO₂) wurde die Lösung abgesaugt, die Zellen mit DMEM gewaschen und 2 ml Kulturmedium dazugegeben (nach Handbuch Superfect, Qiagen). Für die Expression des Plasmid bzw. des Inserts wurde den Zellen für mindestens 24 Stunden Zeit gelassen.

Für Doppeltransfektionen wurden die gleichen Mengen an DNA für jedes Plasmid (1-2 µg DNA) beibehalten, ohne die Volumina der Transfektionsreagenzien zu erhöhen.

2.7 Latrunculin-A-Behandlung der Zellen

Latrunculin-A stellt ein membrangängiges Gift dar, das an Aktinmonomere bindend, eine Polymerisation dieser zu F-Aktin verhindert. Die Wirkung ist konzentrationsabhängig und reversibel (Yarmola et al., 2000). Latrunculin A (Mr 421,6 g/mol), aus *Latruncula magnifica* (L5163, Sigma-Aldrich) wurden als 100 µg in 80 % Ethanol gelöst. Diese Stammlösung (46 µM) wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert. Für die Versuche mit einer Molarität von 0,5 µM Latrunculin A wurden 5 ml Kulturmedium mit 54 µl Latrunculin A-Ethanol Gemisch versetzt. Das Medium wurde auf die Zellen appliziert und die Zellen zu bestimmten Zeitpunkten fixiert. Als Negativkontrolle dienten hierbei Zellen, denen nur das entsprechende Volumen an Ethanol zugegeben wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse von hXirp1 und hXirp2

Wang und Kollegen beschrieben das durch multiple charakteristische 16-AS-Motive gekennzeichnete Protein zum erstenmal im Huhn (*G. gallus*) und bezeichneten es als cXin (AF051944). Weiterhin beschrieben sie ein zu cXin homologes Protein der Maus (*M. musculus*) und bezeichneten es als mXin (AC092053, RP11-331G2, Wang et al., 1999). Die repetitiven 16-AS-Motive stellten in beiden Fällen die Hälfte des Proteins dar.

Ein zu mXin und cXin homologes humanes Xin-Protein wurde erstmals in unserer Arbeitsgruppe kloniert. In weiteren Datenbankrecherchen wurden für Maus und Mensch jeweils eine weitere von einem eigenen Gen kodierte Xin-Variante gefunden, die größer als die bisher beschriebenen waren. Dies war für das Huhn nicht möglich. Diese langen Varianten sind zu ihren kürzeren Paralogen homolog, zeichnen sich aber durch eine höhere Anzahl an repetitiven Motiven sowie einen längeren N- und C-Terminus aus. Sie sollen aufgrund der Unterschiede bzw. Homologie zum cXin mit „Xin related protein 2“, Xirp2 benannt werden. Dem Akronym wird ein Buchstabe vorangestellt, der auf die Herkunft hinweist. So stellen mXirp2 das murine Xirp2 und hXirp2 das humane Xirp2 dar. Desweiteren werden die kürzeren, mit cXin verwandten Varianten der Maus und des Menschen zu „Xin related protein 1“, Xirp1 zusammengefaßt, dem ebenso ein Buchstabe vorangestellt wird, der auf die Spezies hinweist.

3.1.1 Analyse der Nukleotidsequenz für hXirp1

Durch die Analyse der verfügbaren ESTs, cDNAs (XM_093522) und genomischer Contigs (NT_005498) wurde der genomische Locus für das humane hXirp1 dem Chromosomenabschnitt 3p21.33 zugeordnet. Partielle cDNA-Klone (AL713648, AK096421) sowie die Nukleotidsequenz NT_037575.20 weisen im UCSC Genome Browser auf 3p22.2 hin. In jedem Fall kodiert hier ein ungewöhnlich großes Exon von 5664 Nukleotiden für ein Protein von 1843 Aminosäuren. Die mRNA enthält 5' eine nicht translatierten Region (UTR) von 132 Nukleotiden. Die Sequenz der mRNA wies eine Vielzahl möglicher interner Spleißstellen auf, von denen sich eine durch RT-PCR verifizieren ließ. Durch die Nutzung der Spleiß-Stelle der Nukleotide 3357 und 3783 kommt es zum Verschieben des Leserasters und zur Generierung eines Stop-Kodons, wodurch eine kleinere Variante von hXirp1, die für die

Aminosäuren 1 – 1121 kodiert, entsteht. Die Aminosäuren 1 – 1119 entsprechen hierbei den Aminosäuren der langen hXirp1 Variante. Die beiden C-terminalen Aminosäuren 1120 und 1121 stellen hierbei zwei Leuzine dar. Diese kürzere Variante des hXirp1 wird als hXirp1-S der großen Variante hXirp1-L zur Seite gestellt (unpublizierte Daten). Die Aminosäuresequenz für hXirp1 ist in Abb. 46, S. 123 im Anhang dargestellt. Eine modellhafte Darstellung für hXirp1 befindet sich in der Abb. 5 sowie als ausklappbare Abbildung im Anhang (Abb. 44, S.121).

3.1.2 Analyse der Nukleotidsequenz für hXirp2

Der genomische Locus des humanen hXirp2 befindet sich auf Chromosom 2q24.3. Das hXirp2 liegt hier in einer noch nicht näher bestimmten Intron-Exon-Struktur vor. Bisher gelang der Nachweis, daß ein sehr großes Exon (auf AC093684) von 9407 Nukleotiden für 3136 Aminosäuren kodiert, die einen Sequenzabschnitt darstellen, der die repetitiven 16-Aminosäure Motive und fast den Großteil des C-Terminus dieses Proteins beinhaltet. Diese Sequenz entspricht den Aminosäuren 169 – 3296 im bislang hypothetischen hXirp2, wie sie in Abb. 47 auf S. 124 im Anhang zu sehen ist. Dieses vorerst 3319 AS lange Sequenz ist eine Zusammenstellung der bisher verfügbaren Sequenzdaten aus elektronischen Datenbanken. Eine modellhafte Darstellung für hXirp2 gibt Abb. 5 wieder, die des weiteren als ausklappbare Version im Anhang vorhanden ist (Abb. 44 S. 121).

3.1.3 Die charakteristischen repetitiven Motive in hXirp1 und hXirp2

Die charakteristischen repetitiven Motive (rM) in hXirp1 und hXirp2 bestehen aus mindestens 16 Aminosäuren mit einer gemeinsamen Konsensussequenz von GDVXXXRRLFETXPLD (Einbuchstabenkode für Aminosäuren, s. Abbkürzungsverzeichnis). Mit dieser Konsensussequenz lassen sich in hXirp1 mindestens 18 und in hXirp2 mindestens 36 dieser Motive erfassen (Tab. 3, sowie Abb. 46, S. 123 und Abb. 47, S. 124 im Anhang). Die Motive in hXirp1 sind im Vergleich zu denen in hXirp2 weniger gut konserviert. In beiden Proteinen werden die einzelnen 16-AS-Motive durch Verbindungssequenzen von durchschnittlich 20 Aminosäuren miteinander verbunden. Im Detail kann die Länge der Verbindungssequenzen allerdings erheblich variieren. So gibt es in hXirp1 Verbindungssequenzen von minimal vier AS (nach hXirp1 rM-10) bis maximal 44 AS (nach hXirp1 rM-9) und in hXirp2 von minimal 10 AS (nach hXirp2 rM-30) bis maximal 42 AS (nach hXirp2 rM-28). Auch hier zeigt hXirp1 eine größere Variabilität in den Längen der Verbindungssequenzen, als es in hXirp2 der Fall ist.

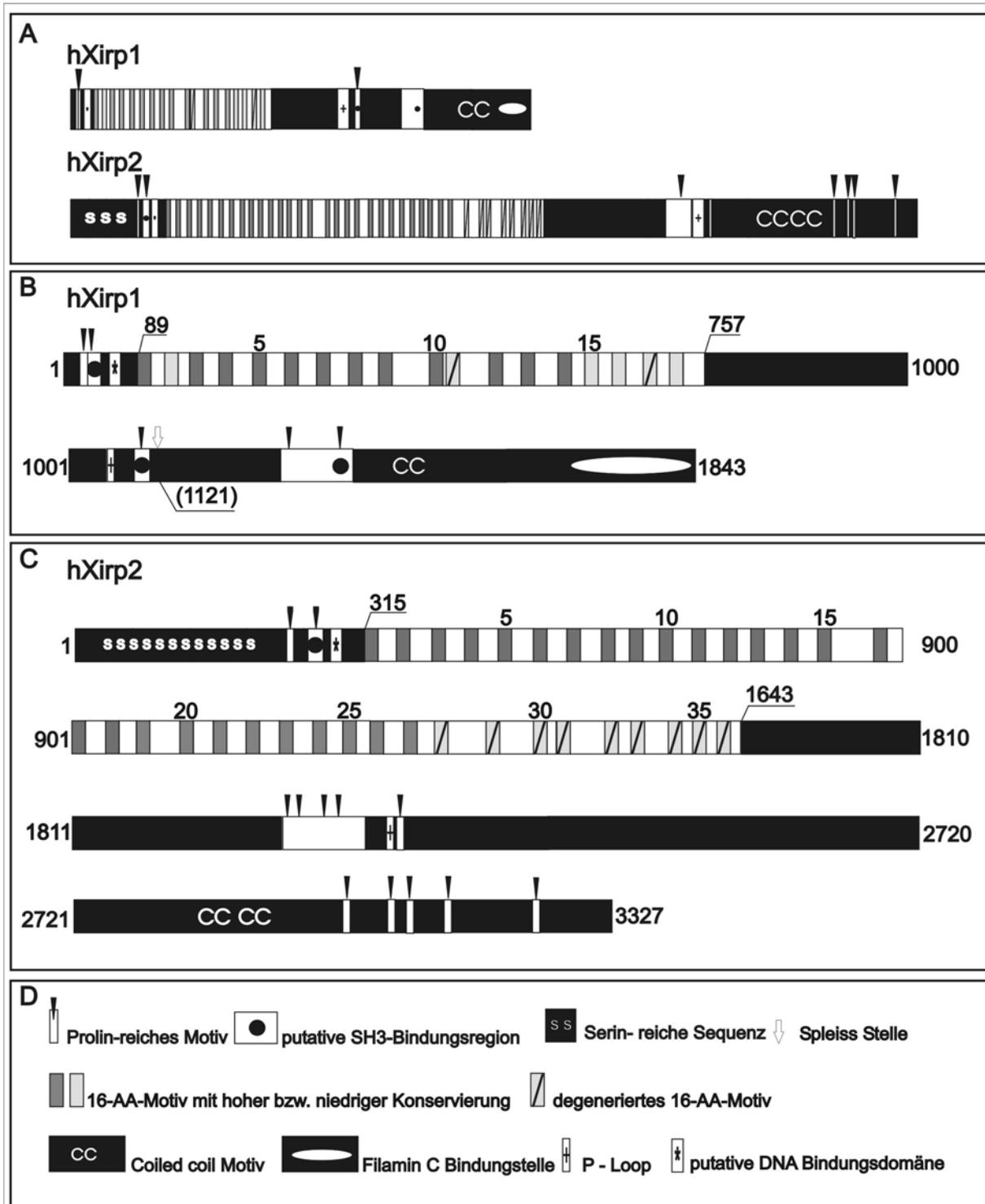


Abb. 5 Schematische Darstellung von humanem hXirp1 und hXirp2

Gesamtansicht der Primärsequenz von hXirp1 und hXirp2 A) und Detailansicht zu hXirp1 (B) und hXirp2 (C) mit bisher erkannten putativen und verifizierten Motiven und Domänen, die in B) und C) angegebenen Zahlen stellen jeweils die Aminosäureposition dar. D) Legende der in A, B und C verwendeten Symbole.

Bei näherer Betrachtung der Motivsequenz zeigt sich, dass in der Mitte des 16-AS-Motivs (Positionen 8-10) sich ein hydrophober Kern befindet, der aus Tryptophan, Leuzin und Phenylalanin (WLF) gebildet wird. Flankiert wird dieser Bereich durch positiv bzw. negativ geladene Aminosäuren (R bzw. E). Das Grundmotiv wird durch die Aminosäuren Glyzin (G) und Aspartat (D) begrenzt, dem ein Prolin (P) an Position 14 vorausgeht (Tab. 4). Abb. 48 auf S. 125 und Abb. 49 auf S. 126 (im Anhang) zeigen u.a. die 16-AS-Motive von hXirp1 und hXirp2. Identische und ähnliche Aminosäuren innerhalb der Motive wurden bei einem gegebenen Schwellenwert von 50 % Homologie gekennzeichnet. Anhand dieser Darstellung wurden die Motive als degeneriert oder schwach konserviert eingestuft. Als degeneriert gelten hierbei z.B. Motive, deren Kernmotiv durch Aminosäuresubstitutionen nicht mehr in die Konsensussequenz paßt bzw. der hydrophobe Kern verloren gegangen ist.

<i>Protein</i>	<i>Konsensussequenz</i>	<i>Gesamtzahl</i>	<i>davon degeneriert</i>
hXirp1	GDVQXXRWLFETXPLD	18	rM 11, rM 17
hXirp2	GDVXXXRWLFETQPLD	36	rM 28 – 36

Tab. 3 **Das 16-AS-Motiv in hXirp1 und hXirp2**

Vergleich von Anzahl und Konsensussequenz der in hXirp1 und hXirp2 vorhandenen repetitiven 16-AS-Motive

Anhand des höheren Konservierungsgrades der Motive selbst und eines Teils der Verbindungssequenzen in hXirp2 ließ sich das 16-AS-Grundmotiv N- und C-terminal um einige Aminosäuren aus den flankierenden Verbindungssequenzen erweitern. Somit sind diese Sequenzen eher als Flanken zu sehen, die das Grundmotiv einbetten. Eine daraus resultierende, auch für hXirp1 anwendbare Konsensussequenz von 25 Aminosäuren zeigt Tab. 4.

In hXirp2 befinden sich im 25-Aminosäure-Motiv an der Position -1 häufig Arginin bzw. Lysin, die in hXirp1 nicht überdurchschnittlich häufig auftreten. Das gesamte erweiterte Motiv wird N-terminal von Glutamatresten flankiert, die in den meisten Motiven von hXirp2 auch C-terminal vorhanden sind, wo ihnen eine positiv geladene Aminosäure (zumeist Lysin) vorangestellt ist. Sie stellen möglicherweise die eigentlichen Grenzen der Motive dar (Abb. 48, S. 125 und Abb. 49, S. 126). Negativ wie auch positiv geladene Aminosäuren befinden sich, gefolgt von hydrophoben Aminosäuren, peripher des hydrophoben Kerns (Positionen 8-10) in fast regelmäßiger Anordnung. In den auf 23 Aminosäuren erweiterbaren Motiv von hXirp1 befinden sich C-terminal keine negativ geladenen Aminosäuren, so daß die eigentliche, in Tab. 4 dargestellte Konsensussequenz mit den Positionen +2 endet, da die Positionen +3 und +4 mit beliebigen Aminosäuren belegt sind.

Positionen der Aminosäuren im Motiv																								
-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	+1	+2	+3	+4
hXirp1 Konsensussequenz erweitertes Sequenzmotiv																								
E	E	ψ	ψ	X	G	D	V	Q	X	X	R	W	L	F	E	T	X	P	L	D	X	ψ	/	/
hXirp2 Konsensussequenz erweitertes Sequenzmotiv																								
E	E	I	X	+	G	D	V	X	X	X	R	W	L	F	E	T	Q	P	L	D	X	I	L	E
hXirp1 Ladungseigenschaften erweitertes Sequenzmotiv																								
-	-	ψ	ψ	+	G	-	ψ	Q	X	X	+	ψ	ψ	ψ	-	T	X	P	ψ	-	X	ψ	/	/
hXirp2 Ladungseigenschaften erweitertes Sequenzmotiv																								
-	-	ψ	X	+	G	-	ψ	+	X	X	+	ψ	ψ	ψ	-	T	Q	P	ψ	-	X	ψ	+	-

Tab. 4 Das erweiterte Aminosäuremotiv in hXirp1 und hXirp2

Konsensussequenz zum erweiterten Motiv in hXirp1 und hXirp2, mit bekannten 16-AS-Motiv (Fettdruck, Positionen 1-16). Den Positionsangaben der N- bzw C-terminalen Erweiterungen sind ein Minus (-) bzw. Plus (+) vorangestellt und liegen dem 16-AS Motiv zugrunde. Die Ladungseigenschaften der Aminosäuren im erweiterten Motiv sind mit Plus (+) bzw. Minus (-) für positiv bzw. negativ geladene Aminosäuren und mit Psi (ψ) für hydrophobe Aminosäuren bezeichnet. Zu erkennen sind der hydrophobe Kern auf Position 8-10, Glyzin (G) und Prolin (P) auf Positionen 1 und 14 und weitere Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren ohne auffälliges Muster. Für hXirp1 kann das Motiv in den Positionen +3 und +4 nicht erweitert werden (/). Weitere Erläuterungen im Text.

Berechnungen des isoelektrischen Punktes für die alle repetitiven Motive und Verbindungssequenzen enthaltende Aminosäuresequenz ergaben für hXirp1 sowie hXirp2 pH 4,9 (im Anhang Abb. 48, S. 125 und Abb. 49 S. 126). Die meisten der 16- bzw. erweiterten Aminosäuremotive von hXirp1 und hXirp2 besitzen einen isoelektrischen Punkt um 4 bis 5. Einzelne 16-Aminosäuremotive in hXirp1 (rM: 3, 5, 6, 18) und hXirp2 (rM: 6, 14, 15, 22, 23, 29, 30, 34) weichen mit Pi-Werten zwischen pH 6.25 bis 10.00 vom Mittelwert ab. Die Erweiterungen des Motivs bewirkt eine Validierung des Pi-Wertes um pH 5, was eine negative Nettoladung bei einem physiologischem pH-Wert von 7.4 zur Folge hätte.

Strukturvorhersageprogramme (Combet et al., 2000), die verschiedene Algorithmen zur Ermittlung der Sekundärstruktur von Polypeptidsequenzen nutzen, wiesen dem Bereich um den hydrophoben Kern zumeist als α -helikal aus, der von unstrukturierten Bereichen flankiert wurde. Die gesamte Aminosäuresequenz, die die repetitiven Motive und Verbindungssequenzen enthält, weist eine starke Tendenz zu α -Helices auf, die von ungeordneten Abschnitten unterbrochen werden. Hierbei spielen die Aminosäuren Glyzin und Prolin als Helixbrecher eine Rolle. Innerhalb der Verbindungssequenzen von hXirp1 wie auch hXirp2 befinden sich in unregelmässiger Abfolge eine Vielzahl weiterer Proline und Glyzine.

Für übergeordnete Strukturen in der Verteilung der repetitiven Motive bzw. Verbindungssequenzen in hXirp1 oder hXirp2 wurden in Clusteranalysen keine Hinweise gefunden. Eine vergleichende Clusteranalyse zwischen hXirp1 und hXirp2 wies keine ähnlichen Verteilungsmuster der repetitiven Motive bzw. Verbindungssequenzen zwischen hXirp1 und hXirp2 auf, die auf eine gemeinsame phylogenetische Abstammung kürzerer

Genabschnitte hinweisen könnte. Die Analysen wurden auf Nukleotid- sowie Aminosäuresequenzen durchgeführt.

3.1.4 Prolinreiche Sequenzmotive in hXirp1 und hXirp2

Während man hXirp1 mit 10 % Prolingehalt als prolinreiches Protein bezeichnen kann, trifft diese Einteilung für hXirp2 mit 5 % nicht mehr zu. Beide Proteine enthalten jedoch in analogen Bereichen der Primärsequenz mehrere prolinreiche Abschnitte. Prolinreiche Motive dienen diversen Domänen, wie z.B. Src-Homologie 3 (SH3), Ena-VASP Homologie 1 (EVH1) und WW als Bindungsmotiv und haben Anteil an Protein-Protein-Interaktionen (Zarrinpar und Lim, 2000). Die Prolin-Motive werden von den oben genannten Domänen als linksgängige Polyprolinhelix II (PPII) in ähnlicher Weise erkannt und können überlappen, so daß ein Motiv Ligand für SH3, WW und EVH1-Domänen darstellen kann (Zarrinpar und Lim, 2000; Fedorov et al., 1999). Die verschiedenen Ligandenmotive für die drei Domänen sind in Tab. 5 aufgeführt.

<i>Domäne</i>	<i>Bindungsmotiv</i>	<i>Konsensussequenz</i>
<i>EVH1</i> ¹		(ED) - (FLWY) PPPPX - (DE)
<i>SH3</i> ²	Grundmotiv Grundmotiv Klasse I Klasse II	PXXP ψPXψP ⊕XψPXψP ψPXψPX⊕
<i>WW</i> ³	Gruppe I Gruppe II Gruppe III Gruppe IV	PPXY PPLP (R) -R/K/X- PP bzw. PP - R/x-(R) , p- SP , p- TP

Tab. 5 **Ligandenmotive für EVH1, SH3 und WW –Domänen**

Übersicht zu den bekannten prolinreichen Konsensussequenzen für die Domänen EVH1, SH3 und WW, ¹Renfranz und Beckerle, 2002, ²Weng et al, 1995, ³Sudol und Hunter, 2000

3.1.4.1 Ligandenmotive für EVH1-Domänen

In hXirp1 wie auch in hXirp2 befinden sich eine Reihe an polyprolinreichen Sequenzen die sich teilweise in eine Konsensussequenz für Liganden der EVH1 Domäne (Tab. 5) einreihen lassen und mit ihrer Sequenz mit möglichen SH3-Ligandenmotiven überlappen. EVH1-Domänen binden an Liganden, deren Prolinmotiv PPPP von den Aminosäuren Phenylalanin (F), Leucin (L), Tryptophan (W) oder Tyrosin (Y) angeführt wird. Eine Flankierung des Motivs durch die Aminosäuren Glutamat (E) bzw. Aspartat (D) erhöht die Spezifität der Bindung an Ena/VASP Proteine (Niebuhr et al., 1997; Renfranz und Beckerle, 2002). Weitere

Substitutionen innerhalb des Prolinmotives erhöhen bzw. verringern die Bindungsspezifitäten (Niebuhr et al., 1997).

In hXirp1 und hXirp2 befinden sich N-terminal jeweils zwei prolinreiche Motive von denen mindestens ein Motiv potentiell als Ligand für EVH1-Domänen in Frage kommt (siehe Tab. 6). Das zweite hier vorkommende Prolin-Motiv ist in hXirp1 auch und in hXirp2 nur als SH3- bzw. WW-Ligandenmotiv charakterisierbar. Weitere mögliche Liganden für EVH1 Domänen befinden sich C-terminal der repetitiven Module und liegen in einem Sequenzabschnitt, der auch Bindungsmotive für SH3-Domänen enthält. Das hXirp2 (AS: 2063 – 2204) weist hier fünf in enger Nachbarschaft liegende Polyprolinsequenzen auf. In hXirp1 (AS: 1201 – 1333) läßt sich nur ein mögliches Prolinmotiv finden (Tab. 6).

3.1.4.2 Putative Ligandenmotive für SH3-Domänen

Prolinreiche Motive, die in der Form PXXP bzw. ψ PX ψ P vereinfacht werden können, werden als Minimalmotiv für SH3-Bindungsdomänen angesehen (Tab. 5), wobei die Positionen X einer beliebigen Aminosäure und Positionen Psi (ψ) nur von hydrophoben Aminosäuren eingenommen werden. Die Spezifität der Bindung zwischen Ligand und SH3-Domäne erfolgt durch die flankierenden Aminosäuren (Kay et al. 2000; Weng et al, 1995). So erweitern präzisere Betrachtungen der Liganden für SH3-Domänen dieses Motiv zu \oplus X ψ PX ψ P (Klasse I) und ψ PX ψ PX \oplus (Klasse II) (Mayer und Eck, 1995; Rickles et al., 1995; Politou et al. 2002; Zarrinpar und Lim, 2000). Die N- bzw. C-terminalen Erweiterungen durch positiv geladene Aminosäuren wie Lysin (K) und Arginin (R) weisen darauf hin, daß SH3-Domänen ihre Liganden in zwei Orientierungen binden können, wobei die Lage der positiv geladenen Aminosäure (und dementsprechend auch die der hydrophoben) die Spezifität und/oder Affinität der Bindung beider Partner definiert (Mayer und Eck, 1995, Kay et al., 2000).

In hXirp1 und hXirp2 lassen sich eine Vielzahl an potentiellen SH3-Bindungsmotiven auffinden, die stellenweise mit den EVH1- bzw. WW-Bindungsmotiven überlappen. In hXirp1 (AS: 31 – 42) wie auch in hXirp2 (AS: 251 – 263) ist das zweite N-terminale Prolinmotiv als Klasse II SH3-Bindungsmotiv charakterisierbar. Weitere, nicht eindeutig zur Klasse I oder II zählende Motive, lassen sich in beiden Proteinen in den Sequenzabschnitten C-terminal der repetitiven Motive finden. In einem analogen Sequenzabschnitt von hXirp1 (AS: 1311–1333) und hXirp2 (AS: 2140 – 2157) lassen sich zwei bzw. eine putative SH3 Bindungsstelle feststellen. Weitere, mit putativen WW-Bindungsmotiven überlappende Sequenzen finden sich in hXirp1 und hXirp2 C-terminal dieses Abschnitts. Eine Übersicht der gefundenen putativen SH3-Bindungsdomänen stellt die Tab. 6 dar.

<u>hXirp1</u>	<i>Prolinreiche Sequenzmotive für</i>	<i>EVH1</i>	<i>SH3</i>	<i>WW</i>
19–30	AEDL PLPPPP AL	DLPLPPPP	PLPPPPA	–
30–40	LEDL PLPPPK ES	DLPLPPPK E	LPLPPK II	–
1108–1120	GSD PRIPAA PRK ** VS... * LL	–	RIPAA PRK I/II	–
1250–1260	HNAFV PPPP TL	(FV PPPP)	VPPPP T	–
1311–1333	TPKLD PTMP PKKKPQL PPK PAH	–	KLDPTMP I? LPPKPAH II?	–
1340–1352	QRL PKPLPL SPSF	–	LPLSPS ?	PLSP IV
1790–1801	TEQAE PPRN PGS	–	EPRNP ?	PPR III
<u>hXirp2</u>	<i>Prolinreiche Sequenzmotive für</i>	<i>EVH1</i>	<i>SH3</i>	<i>WW</i>
225–237	GMTEEF PPPP PDV	EFPPPP PD	PPPP	–
251–263	PEL PSPP RR LVP	–	LPSPP RR II	PPRR III PSPP IV
2063–2078	SECL PLPPSPPPP PS	LPPPS ?	PLPPSPPPP	PPSP IV
2083–2095	EIEF PLPPPP LM	EFPLPPPP	PLPPPP	–
2117–2131	ESF PGLPLPP PVDE	LPLPPPP VD	PGLPLPP P	–
2140–2157	MFL PPPPPT PSQ KPAH L	FLPPPP P	PPPPPT P	PPTP IV
2192–2204	GKTGV LPPPTL PK PKL P	LPPPT ?	LPPPTL PK PKL	–
2887–2889	I PPPS LKTR PPS PTF	–	PPSP	RPP III RPPSP IV
2929–2939	VE PPRR PMSQ	–	PPRRP ?	PPRR III
2946–2958	ANT SPSP RRSRSE	–	SPSP RR ?	SPSP RR IV PPR III
3077–3086	VAV PPRL SEH	–	–	PPR III
3230–3239	KHA PP TYEDV	–	–	PPTY I

Tab. 6 Prolinreiche Motive in hXirp1 und hXirp2

und ihre möglichen Funktion als Bindungsmotiv für die EVH1-, SH3- und WW- Domänen, Proline in der Ligandensequenz und konservierte AS im Motiv sind in Fettdruck dargestellt, römische Zahlen weisen die Gruppierung der Motive aus, die mit Fragezeichen versehenen Motive können nicht eindeutig eingeordnet werden. Die (*) und (**) weisen drauf hin, daß an dieser Stelle das hXirp1-S (*) mit – LL endet (Spleiß-Stelle) und hXirp-L (**) –VS... weiterverläuft.

3.1.4.3 Putative Ligandenmotive für WW-Domänen

Bindungsmotive für WW-Domänen (benannt nach zwei konservierten Tryptophanen, W) unterteilen sich in vier Gruppen (Sudol und Hunter, 2000, Bork und Sudol, 1994). Die Konsensussequenzen dieser Gruppierungen sind in Tab. 5 aufgelistet. Die Aminosäuresequenzen von hXirp1 bzw. hXirp2 enthalten einige wenige putative WW-Bindungsmotive der Gruppe I (PPXY) bzw. Gruppe III (PPR-Motive). Motive der Gruppe IV (SP, TP) traten in hXirp1 und hXirp2 sehr häufig auf und wurden in die Tab. 6 nur aufgenommen, wenn sie repetitiv auftraten, in einer prolinreichen Sequenz eingebettet und/oder von einem Arginin flankiert wurden (Verdecia et al., 2000).

3.1.5 C-terminale Heptadenmotive in hXirp1 und hXirp2

Mit Hilfe eines Suchprogramms für Heptadenmotive (Lupas et al., 1991) wurde die gesamte Sequenz von hXirp1 und hXirp2 nach Sequenzmotiven durchsucht, die in „coiled-coil“ Protein-Protein-Interaktionen mitwirken können. „Coiled coil“-Strukturen repräsentieren eine effiziente Möglichkeit zwei Proteinhelices miteinander interagieren zu lassen (Crick, 1953). Ein „coiled coil“ stellt einen linksgängigen helikalen Strang aus zwei (oder mehreren) umeinander gewundenen α -Helices dar. Die α -Helices interagieren miteinander durch hydrophobe Aminosäuren, die einen apolaren Streifen entlang jeder Helix bilden. Flankierende geladene Aminosäuren können des Weiteren für elektrostatische Wechselwirkungen sorgen. Die Primärsequenz der beteiligten α -Helices setzt sich aus einer Abfolge von Heptaden zusammen. Eine Heptade umfaßt sieben Aminosäuren, die in einer regelmäßigen Abfolge von hydrophoben und geladenen Aminosäuren organisiert sind. In den Positionen a und d (der Heptade abcdefg) sind gewöhnlich hydrophobe Aminosäuren wie Leuzin, Isoleuzin und Valin (Cohen und Parry, 1990) zu finden, während die Positionen e und g von geladenen Aminosäuren eingenommen werden. Diese sorgen im „coiled coil“-Dimer für intramolekulare Salzbrücken (McLachla und Steward, 1975).

Die Tab. 7 gibt Sequenzabschnitte in hXirp1 und hXirp2 wieder, in denen mit hoher Wahrscheinlichkeit Heptadenmotive von mindestens 21 bzw. - 42 Aminosäuren als „coiled coil“, Sequenzen in Frage kommen. Diese Regionen wurden von Strukturvorhersageprogrammen als α -helikal ausgewiesen. In Tab. 7 sind die hydrophoben Aminosäuren der Positionen a und d in Fettdruck dargestellt. Aminosäuren der Positionen f und g sind, sofern es sich um geladene Aminosäuren handelt, unterstrichen. Das Heptadenmotiv ist umrandet und von der schematischen Heptadensequenz „abcdefg“ unterlegt.

Der Sequenzabschnitt 1457 bis 1500 in hXirp1 enthält maximal ein Sequenzmotiv von 3 Heptaden (21 Aminosäuren) und wird in die schematische Darstellung von hXirp1 (Abb. 5 S. 43) aufgenommen. Das Sequenzmotiv der Aminosäuren 2311 bis 2350 in hXirp2 stellt nur ein Heptadenmotiv dar und wird deshalb nicht in der schematischen Darstellung von hXirp2 in Abb. 5 S. 43 integriert, da diese Art der kurzen Heptaden auch in Zufallsmustern innerhalb der Sequenzen auftauchen können. Weiterhin ist hier die Aminosäure Prolin, die als Helixbrecher fungiert, und direkt vor dem Heptadenmotiv liegt zu beachten. Im hXirp2 Sequenzmotiv 2719 bis 2746 fällt die Verschiebung der Abfolge der Heptaden auf, die durch Pfeilspitzen (>>>) angedeutet ist und ein Heptadenmotiv von einem 14 Aminosäuren Motiv trennt. Ein Heptadenmotiv in der Länge von 35 bzw. 36 Aminosäuren ist im Sequenzabschnitt

AS 2774 bis 2813 in hXirp2 enthalten. Die potentiellen „coiled coil“-Module der Sequenzabschnitte AS 2719-2746 und 2774-2813 werden in das Schema von hXirp2 (Abb. 44 S. 121) integriert.

<i>Protein</i>	<i>Aminosäuresequenzen mit markierten Heptaden-Motiven</i>	
hXirp1	1457–1500	APESPDS <u>LQRNQKE</u> <u>LQGLLNQVQALEKEA</u> ASSVDVQALRRLFEA abcdefgabcdefgabcdefga
hXirp2	2311 – 2350	PKPYMRKFKTP <u>LMIAEEKY</u> RQOKEEIEKQKQESSYYNIVK abcdefga
	2719 – 2746	A <u>LNIVEFL</u> RKREE <u>LQQILSRVKQFEAE</u> P abcdefg>>>>abcdefgabcdefg
	2774 – 2813	AV <u>HIAMENNLEKVKEEITHIKTQ</u> <u>AEDMLVSYENIIQTA</u> MM abcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefga

Tab. 7 Heptaden enthaltende Sequenzen in hXirp1 und hXirp2

Dargestellt sind die vorhergesagten „coiled coil“ Sequenzen. Die Heptadenmotive wurden so gewählt, daß das Kriterium der hydrophoben Aminosäuren an den Positionen „a“ und „d“ innerhalb der Heptade zutrif. Eine solche Heptadensequenz ist umrandet dargestellt und mit der Heptadenabfolge „abcdefg“ unterlegt. Die hydrophoben Aminosäuren in den Positionen „a“ und „d“ sind fettgedruckt. Die geladenen Aminosäuren in den Positionen „e“ und „g“ sind unterstrichen. Die Pfeilspitzen (>>>) deuten auf die Verschiebung der Heptadenabfolge in diesem Sequenzabschnitt hin.

3.1.6 Putative Phosphonukleotidbindungsstelle in hXirp1 und hXirp2

Das humane Xirp1 und Xirp2 enthalten jeweils ein Sequenzmotiv, das als Bindungsmotiv von Phosphonukleotiden (ATP bzw. GTP) bekannt ist und als P-loop oder A-Motiv beschrieben wird. Die Aminosäuresequenz GMAVLGKS im Xirp1 (AS: 1029-1036) und AKIITGKT im Xirp2 (AS: 2187-2194) entspricht der bekannten Konsensussequenz von [AG]-x[4]-GK-[ST] (Saraste et al., 1990).

3.1.7 Putatives DNA-Bindungsmotiv in hXirp1 und hXirp2

N-terminal, den ersten beiden prolinreichen Sequenzen folgend, befindet sich eine mögliche DNA-Bindungsstelle (hXirp1: AS: 56 – 68; hXirp2: AS: 271 – 290), die eine Ähnlichkeit zu der DNA-Bindungsstelle der beiden Oncogene MybA und MybB aufweist (Wang et al., 1999; Foos et al., 1992, 1994; Trauth et al. 1994). Tab. 8 zeigt diese Sequenzabschnitte für Myb A&B, hXirp1 und hXirp2.

<i>Protein</i>	<i>Sequenzmotiv</i>
Myb A&B ¹ hXirp1 (AS: 56 – 68) hXirp2 (AS: 277 – 290)	ERW ^{H} N ^{H} LN ^{PE} VKKS RRL ^{YR} H ^{I} H ^{PE} LRKN NRL ^{YK} H ^{I} H ^{PE} LRKN

Tab. 8 Putatives DNA-Bindungsmotiv in hXirp1 und hXirp2

Hochkonservierte Aminosäuren zwischen hXirp und MybA und -B sind in fettgedruckt, ähnliche Aminosäuren kursiv dargestellt; ¹⁾ Foos et al, 1992

3.1.8 Weitere Motive in hXirp1 und hXirp2

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde eine C-terminale Portion des humanen Xirp1 (Abb. 5) durch eine Interaktion mit den im Filamin C C-terminal gelegenen Domänen 19-21 im Hefe-Doppelhybrid-System entdeckt. Die eingegrenzte Filamin C Bindungsstelle, die im Hefe-Doppelhybrid-System verifiziert wurde, umfaßt in hXirp1 die Aminosäuren 1685 – 1843 (unpublizierte Daten).

Neben den oben beschriebenen Sequenzmotiven und Domänen finden sich ein an Serinen reicher N-Terminus in hXirp2 und eine Vielzahl an Sequenzmotiven in beiden Proteinen. Aufgrund der unspezifischen Häufigkeit des Auftretens dieser (sehr kurzen) Sequenzmotive werden sie hier nicht näher betrachtet. Es handelt sich hierbei um potentielle Motive für Phosphorylierung, Glykosylierung, Myristylierung sowie Amidierung und Signalsequenzen für den Import in den Zellkern.

3.2 Herstellung rekombinanter hXirp-Konstrukte

Da Recherchen in elektronischen Datenbanken zeigten, daß die kodierende Sequenz für hXirp1 als ein einziges Exon im Genom vorlag (3.1.1), wurde die lange Isoform hXirp1-L aus dem Genom der HSkM-Zellen (mittels Extend Long Template-PCR) amplifiziert. Durch die primervermittelten Schnittstellen (MluI-Sall bzw. BamHI-Sall) wurden beide Isoformen gerichtet in verschiedene Expressionsvektoren für Bakterien und Säugetierzellkulturen kloniert. Die cDNA von hXirp1-L wurde sequenziert und war Grundlage für die Amplifikationen und Klonierung verschiedener trunkierter Konstrukte. Die Klonierung von hXirp1-S erfolgte auf der Grundlage der langen Isoform. Der 3' Primer enthielt hierbei die Sequenzinformation für das 3'-Ende der kurzen Isoform. Die Klonierung der 28 repetitiven Motive von hXirp2 erfolgte über Extend Long Template-PCR auf dem Genom der HSkM-Zellen, da ein großes Exon für den Großteil von hXirp2 kodierte. Die verwendeten Primer sind in Tab. 12 S. 127 aufgelistet.

Die hier verwendeten Vektoren waren der Vektor pET-23W2 für die bakterielle Expression sowie den EGFP-Vektor pMyP-G für die transiente Expression eines EGFP-

Fusionsproteins in Säugetierzellkulturen. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Vektoren findet sich unter 3.2.9. Die in pET-23W2 klonierten cDNAs wurden 5'- und 3'-terminal von Sequenzen flankiert, die für einen T7-Immuntag bzw. eine Hexahistidinsequenz kodierten. Die in Bakterien exprimierten Polypeptide wurden über ihre C-terminale Hexahistidinsequenz in einer Ni²⁺-NTA-Affinitätsaufreinigung angereichert und aufgereinigt und anschließend z.B. für die Aktinbindungsassays eingesetzt werden. Die in den pMyP-G Vektor klonierten cDNAs sind 3'-terminal von einer Sequenz flankiert, die für das EGFP kodiert. Diese Konstrukte wurden als Fusionsproteine mit C-terminalem EGFP exprimiert und für Transfektionstudien in der Immunfluoreszenzmikroskopie und Videomikroskopie verwendet.

Abb. 45 auf Seite 122 stellt eine schematische Übersicht der verwendeten Konstrukte dar. Tab. 9 bezeichnet die hergestellten hXirp-Konstrukte, die in ihr enthaltenden Sequenzmotive sowie ihre Lage in der Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenz im Vergleich zur hXirp1-L- bzw. hXirp2-Sequenz. . Zu Beginn stehen die Isoformen von hXirp1, die als lange (hXirp1-L; long) und kurze (hXirp1-S, short) Variante beschrieben werden. Diesen folgen die „N-Terminus“-Konstrukte, die den N-Terminus bis zum Ende der repetitiven Motive umfaßten.

<i>Konstrukt</i>	<i>kodiert für</i>	<i>Lokalisation Aminosäuren</i>	<i>Lokalisation Nukleotide</i>
hXirp1	Isoform		
hXirp1-S	kurze hXirp1 Variante	1 – 1121	1 – 3363
hXirp1-L	lange hXirp1 Variante	1 – 1843	1 – 5529
hXirp1	N-Terminus		
hXirp1-NPP	N-terminales prolinreiches Sequenzmotiv	1 – 54	1 – 162
hXirp1 NPPDBD	N-terminales prolinreiches Sequenzmotiv mit putativer DNA Bindungsdomäne	1 – 89	1 – 267
hXirp1-2rM _s	2 repetitive Motive (Motive 3-4)	146 – 205	436 – 615
hXirp1-3rM _s	3 repetitive Motive (Motive 10-12)	432 – 526	1294 – 1579
hXirp1-6rM _s	6 repetitive Motive (Motive 1-6)	83 – 285	247 – 855
hXirp1-18rM	18 repetitive Motive (Motive 1-18) ohne N-terminalen Anteil	83 – 749	247 – 2247
hXirp1-N	N-terminaler Teil mit allen 18 repetitiven Motiven	1 – 749	1 – 2247
hXirp1	C-Terminus		
hXirp1-757- 1162	Abschnitt nach rM bis C-terminaler putativer SH3 Bindungsdomäne, enthält möglichen P-loop	757 – 1162	2271 – 3486
hXirp1-CPP	Putative C-terminale SH3-Bindungsdomäne	1120 – 1416	3360 – 4248
hXirp1-CPP-CC	Putative C-terminale SH3-Bindungsdomäne bis „coiled coil“ Sequenz	1201 – 1565	3603 – 4695
hXirp1-Y	C-Terminus ohne (putative) „coiled coil“ Sequenz, inklusive der Filamin C Bindungsstelle	1498 – 1843	4494 – 5529
hXirp1-FC	C-Terminus, eingegrenzte Filamin C Bindungsstelle	1686 – 1843	5056 – 5529
hXirp2	N-Terminus		
hXirp2-28rM	28 repetitive Motive (Motive 1 – 28)	314 – 1327	942 - 3981

Tab. 9 Übersicht zu den hergestellten hXirp Konstrukten

Bezeichnung, Beschreibung und Lokalisation in der Amino- und Nukleotidsäuresequenz innerhalb der hXirp1 bzw. hXirp2 Sequenzen sind angeben.

Die unter „C-Terminus“ aufgelisteten Konstrukte kodierten für Sequenzen, die C-terminal an die repetitiven Motiven anschließen. Den Abschluß bildet das für 28 der 36 repetitiven Motive des hXirp2 kodierende Konstrukt hXirp2-28rM. Die Konstrukte hXirp1-6rM und hXirp1-Y dienten zur Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die repetitiven Motive bzw. den C-Terminus der langen Variante von hXirp1. Die Produktion der Antikörper in Mäusen wurde über DNA-Immunisierung angeregt.

3.3 Immunologische Untersuchungen zur Lokalisation und Expression von Xirp in Muskelgewebeschnitten und Humanen Skelettmuskel-Zellen

Um Expressionstatus und Lokalisation des exprimierten hXirp in verschiedenen Zellen bzw. Geweben zu überprüfen und die beiden Varianten hXirp1-L und hXirp1-S detektieren zu können, wurden zwei Antikörper gegen hXirp1 generiert, die jeweils ihr Epitop in den repetitiven Motiven 1-6 (AS: 83 – 285) bzw. C-terminal der langen Variante (AS: 1497 – 1843) besaßen. Die jeweiligen Antigene wurden durch die Konstrukte hXirp1-6rM und hXirp1-Y kodiert. Die Generierung der Antikörper erfolgte in verschiedenen Mäusen, die über DNA Injektion immunisiert wurden. Die Antiseren gegen die repetitiven Motive wurden mit $\alpha X1rep$ bezeichnet. Die gegen den C-Terminus von hXirp1-L gerichteten Antiseren wurden mit $\alpha X1ct$ benannt. Die Untersuchungen wurden an Muskelschnitten, Muskelkulturzellen und -extrakten durchgeführt. Die Präimmunseren der zu immunisierenden Mäuse wurden auf Westernblot und in der Immunfluoreszenz getestet und waren nicht immunreaktiv (nicht gezeigt).

3.3.1 Überprüfung der Immunreaktivität der Seren gegen hXirp1

Wang et al. (1999) beschrieben eine spezifische Expression von mXin in quergestreiftem Muskelgewebe der Maus. Die Überprüfung der Immunreaktivität der Maus-Antiseren im Westernblot erfolgte daher auf Zellextrakten differenzierter Muskelzellen in Kultur. Hierzu wurde eine primäre Zellkultur aus humanem Skelettmuskel (HSkM) benutzt

Die polyklonalen Antikörper des Serums $\alpha X1rep$ gegen die repetitiven Motive 1 bis 6 sollten in der Lage sein, die kurze (hXirp1-S), wie auch die lange Variante (hXirp1-L) von hXirp1 detektieren zu können, da diese Sequenz in beiden Proteinen präsent ist. Antikörper des Antiserums $\alpha X1ct$ gegen den C-Terminus von hXirp1-L sollten dementsprechend nur hXirp1-L detektieren, da dieser Abschnitt in der kurzen Variante fehlt. Die Antiseren $\alpha X1rep$ detektierten, wie erwartet, im Westernblot zwei Proteinbanden, deren Molekulargewicht in etwa mit den aus der Primärsequenz abgeleiteten Molekülmassen der beiden hXirp1-

Varianten korrelierten: ca. 198 kDa für die lange Variante und 122 kDa für die kurze Variante von hXirp1 (Abb. 6). Das Serum detektierte des weiteren einige schwache unspezifische Banden unterhalb der 200 kDa- bzw. 130 kDa-Bande. Es wurden keine Unterschiede in der Immunreaktivität dieser Antiseren festgestellt. Die Seren wurden mit α X1rep1, 2 und 3 bezeichnet. Eine Detektion von hXirp2 wurde in diesem Assay nicht beobachtet.

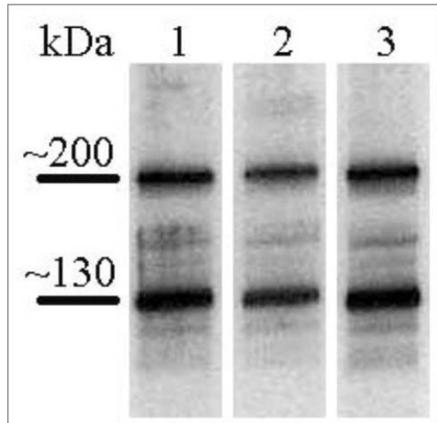


Abb. 6 Immunreaktivität der α X1rep -Antiseren

Westernblotanalyse der Antiseren **1** bis **3**) α X1rep, gerichtet gegen die repetitiven Motive 1-6 (AS: 83-285) von hXirp1 auf Zellextrakt differenzierter HSkM-Zellen, Verdünnung der Antiseren 1:1000. Antiseren α X1rep detektieren neben einigen unspezifischen Banden hauptsächlich zwei Banden in Höhe von ca. 200 kDa und 130 kDa, die hXirp1-L bzw. hXirp1-S entsprechen. Die Seren wurden mit α -X1rep1 bis 3 bezeichnet.

Die Antiseren gegen den C-Terminus (AS: 1497 – 1843) der langen Xirp1-Isoform wiesen keine eindeutige Immunreaktivität auf. Zur Überprüfung der Spezifität der ungereinigten polyclonalen Antiseren sowie zur Verifizierung der fluoreszenzmikroskopisch gefundenen Lokalisationen von hXirp1 in den HSkM-Zellen (Abb. 7) wurde ein Antikörper-Antigen-Bindungsassay durchgeführt (3.3.1). Die Analyse wurde mit dem Antiserum α X1rep1 durchgeführt, um die zusätzlich auftretende Kernlokalisierung dieses Serums zu überprüfen. Die Spezifität der polyklonalen Antikörper wurde fluoreszenzmikroskopisch auf differenzierten HSkM-Zellen bzw. im Immunoblot von Zellextrakten differenzierter HSkM-Zellen untersucht.

Das Antiserum wurde mit bakteriell exprimiertem und gereinigtem, rekombinantem hXirp1-6rM, das als Antigen gedient hatte, inkubiert. Um ausschließen zu können, daß eine Blockierung der Immunreaktivität der Antiseren nur auf einer allgemeinen und unspezifischen Blockierung basierte, wurden dieses Protein bzw. ein Kontrollpolypeptid in steigenden Konzentration von 1 ng/ml bis 50 μ g/ml angeboten. Als Kontrolle diente hierbei ein Fragment des M-Banden-Proteins Myomesin. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die entsprechend behandelten Antiseren für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, bzw. für die Westernblotanalyse weiterverwendet. Abb. 7 A bis C zeigt die typischen immunreaktiven Signale des Antiserums α X1rep1 in differenzierten humanen Skelettmuskelzellen (siehe auch Abb. 15). Die Signale lokalisierten an peripheren Streifasern bzw. Prämyofibrillen, dem Kern und als einzelne punktförmige Aggregate. Eine Blockierung

der polyklonalen Antikörper durch das hXirp1-6rM war schon ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ deutlich zu erkennen, wobei nur die Kernanfärbung in der Immunfluoreszenz sichtbar blieb. Im Kontrollversuch waren selbst 50 $\mu\text{g/ml}$ des Myomesinfragments (Domäne 9–11) nicht fähig die Immunreaktivität des Antiserums zu blockieren (Abb. 7, G-I). Die Detektion der Zellkerne durch die Antiseren stellte somit eine unspezifische Immunreaktion dar.

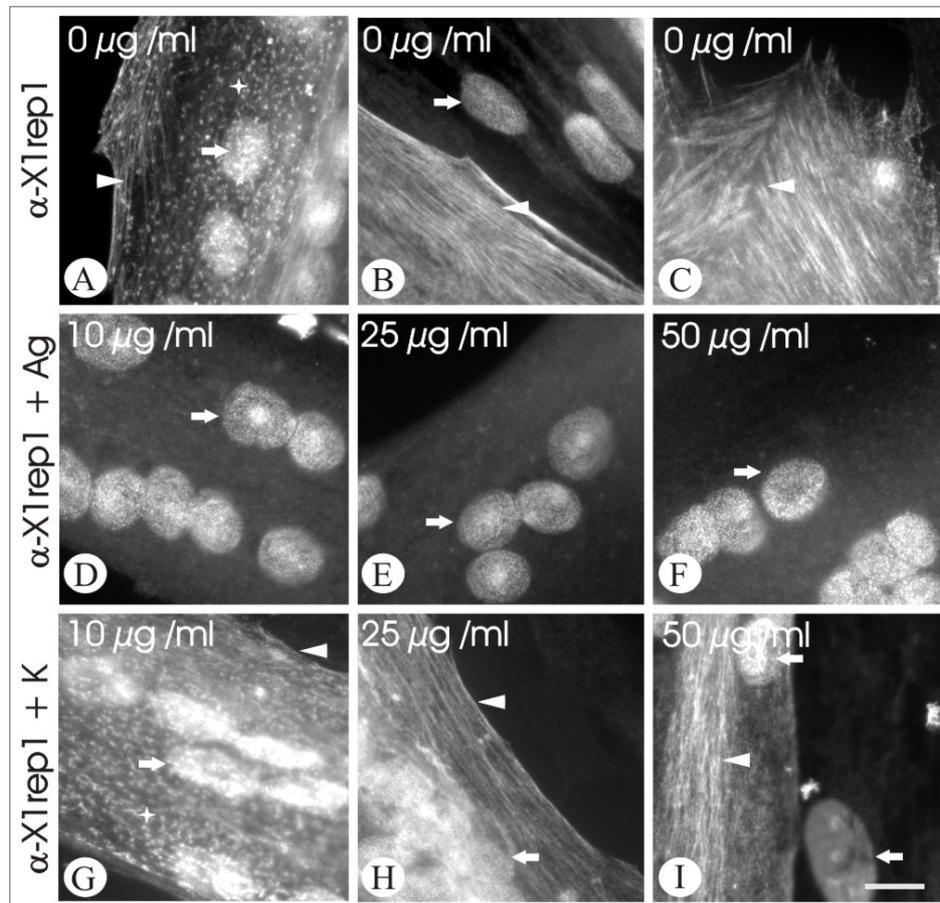


Abb. 7 Antikörper-Antigen-Bindungsassay für das Antiserum αX1rep1

Die Aufnahmen zeigen HSkM-Zellen des Differenzierungstages 6. In A-C sind typische Immunsignale der αX1rep -Antiseren zu erkennen. Aufnahmen A) bis C) zeigen Immunlokalisationen für hXirp1 ohne Vorinkubation des Antiserums, in D) bis F) erfolgte Blockierung mit Antigen (Ag) hXirp1-6rM in den Konzentrationen D) 10 $\mu\text{g/ml}$, E) 25 $\mu\text{g/ml}$ und F) 50 $\mu\text{g/ml}$. In G) bis H) erfolgte eine Blockierung mit Kontrollpolypeptid (K) Myomesin (Domäne 9-11) in gleichen Konzentration, wie sie für hXirp1-6rM angegeben sind. Die Blockierung der spezifischen αX1rep1 -Signale war bei 10 $\mu\text{g/ml}$ Antigen deutlich erkennbar. Die unspezifische Färbung des Kerns hingegen blieb erhalten. Es erfolgte keine Blockierung durch das Kontrollpeptid. Pfeil: Kerne, Stern: Aggregate, Pfeilspitze: Prämyofibrillen, Maßstabsbalken: 10 μm

Wie die Analyse der Immunreaktivität für αX1rep1 im Westernblot zeigte, waren schon 10 ng/ml hXirp1-6rM für deutliche Blockierung des Antiserums ausreichend (Abb. 8). Die Abnahme der Signalstärke für die Banden von 200 kDa und 130 kDa korrelierte mit der Zunahme an eingesetztem Epitop und stellt somit die konzentrationsabhängige Blockierung der polyklonalen Antikörper durch hXirp1-6rM dar. Die Detektion der „unspezifischen“

Bande zwischen 200 kDa und 130 kDa wurde hingegen durch die Blockierung nicht derartig beeinflusst, so daß diese Bande eine unspezifische Immunreaktion darstellt.

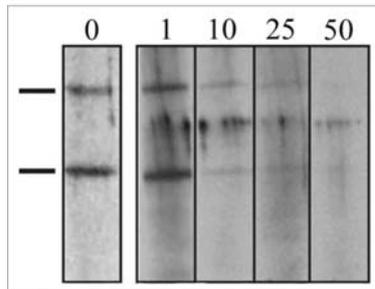


Abb. 8 Antikörper-Antigen-Bindungsassay auf Westernblot

Westernblot von Zellextrakten differenzierter HSkM-Zellen ohne Antigenblockierung (0) und mit Antigenblockierung Bei Vorinkubation des Antiserums mit steigenden Konzentrationen an Antigen (1-50 ng/ml), zeigte sich bereits bei 10 ng/ml hXirp1-6rM eine erkennbare Blockierung. Die Markerbanden entsprechen 200 und 130 kDa.

Westernblotanalysen der Zellextrakte von A7r5 bzw. PtK2-Zellen, die transient mit hXirp1-L oder -S transfiziert wurden, zeigten die jeweils exprimierten hXirp1 als eng zusammenliegende Doppelbanden, die vermutlich proteolytische Fragmente darstellten (Abb. 9). Weiterhin trat eine zusätzliche Doppelbande für hXirp1-L auf, die unterhalb der Größe von hXirp1-S lag. Dieser Unterschied, der erst in einem 4 %-SDS-PA-Gel auszumachen war, widerlegte die Vermutung eines Spleißens der langen Isoform in PtK2- und A7r5-Zellen. Wahrscheinlich wird es sich auch hierbei um ein proteolytisches Fragment handeln.

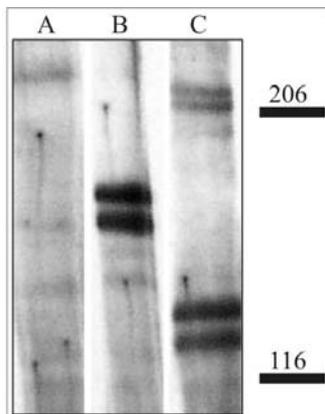


Abb. 9 Westernblotanalyse der ektopisch exprimierten hXirp1-S und -L

Zellextrakte von A) untransfizierten und B) mit hXirp1-S bzw. C) hXirp1-L transfizierten A7r5-Zellen. Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 4 % SDS-PA-Gel. In untransfizierten A7r5 wurde keine, hXirp1 entsprechenden Banden detektiert. Die in A7r5-Zellen exprimierten hXirp1 Konstrukte wurden als eng zusammenliegende Doppelbanden detektiert, die vermutlich proteolytische Fragmente darstellten. hXirp1-L wies zudem zwei Doppelbanden auf, von denen, die schwächere, oberhalb der 206 kDa, dem hXirp1-L entsprach. Die zweite, stärkere Doppelbande, knapp oberhalb der 116 kDa, befand sich unterhalb der hXirp1-S Bande. Markerbanden sind angegeben.

Eine weitere Überprüfung der Spezifität der Antiseren α X1rep war die Detektion verschiedener, in A7r5-Zellen transfizierter, hXirp1-Konstrukte, die die repetitiven Motive enthielten (Abb. 10).

Die Antiseren detektierten alle Konstrukte, die die repetitiven Motive 1-6 enthielten.

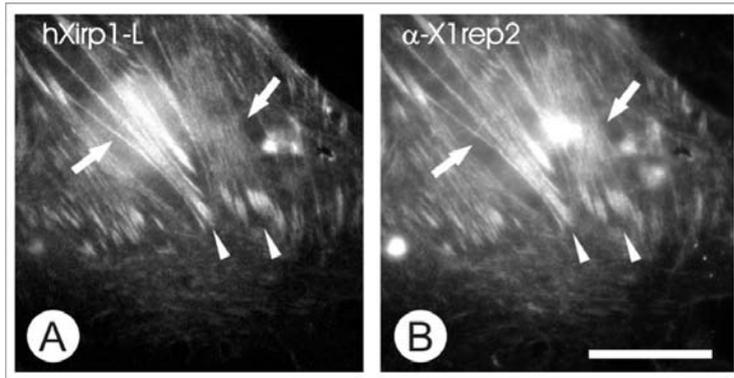


Abb. 10 **Detektion von in A7r5-Zellen ektopisch exprimiertem hXirp1-L durch α X1rep2**

Aufnahmen von A7r5-Zelle nach transienter Transfektion mit hXirp1-L und Detektion durch Antiserum α X1rep2. Darstellung des A) transfizierten Konstruktes (EGFP) und B) Detektion über das Antiserum α X1rep2 (Texasrot). Man beachte Kolokalisation beider Darstellungen. Pfeil: Strebfaser, Pfeilkopf:

3.3.2 Lokalisation von Xirp1 im Herz- und Skelettmuskel der Ratte durch hXirp1-Antiseren

Die im Westernblot immunreaktiven, wie auch nicht immunreaktiven Antiseren wurden auf ihre Verwendbarkeit in der Immunfluoreszenzmikroskopie getestet. Die Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:20 auf Muskelpräparaten getestet. Bei den Muskelpräparaten handelte es sich um den Herzmuskel und Skelettmuskel (M. soleus) der Ratte (Abb. 11 und Abb. 12). In allen Färbungen wurden als Referenz polyklonale Antikörper gegen das sarkomere α -Aktinin genutzt, da dieses in den Z-Scheiben des quergestreiften Muskels und den Glanzstreifen des Herzmuskels lokalisiert ist.

Die Antiseren α X1rep1, 2 und 3 detektierten Xirp1 in den Muskelproben, wohingegen die α X1ct-Antiseren keine Immunreaktivität zeigten. Alle drei α X1rep-Antiseren zeigten ein starkes Immunsignal an den Glanzstreifen des Ratten-Herzmuskels sowie ein schwächeres Signal an den Z-Scheiben der Kardiomyozyten (Abb. 11, A-C). Herzmuskelzellen, die im Querschnitt zu sehen waren, wiesen ein schwaches zytoplasmatisches Signal auf. Eine allgemeine sarkolemmale Dekoration durch die Antiseren war nicht zu beobachten.

Die Untersuchung am M. soleus der Ratte erfolgte mit dem Antiserum α X1rep2. Hier wurde Xirp1 wiederum in den Z-Scheiben des Muskels (Abb. 11, D-F) sowie verstärkt in der myotendinösen Übergangszone (Abb. 12) detektiert. In den Z-Scheiben kolokalisierten Xirp1 und sarkomeres α -Aktinin miteinander. Diese Kolokalisation war in den myotendinösen Übergangszonen (MTZ) nicht beobachtbar, wo die Signale für beide Proteine alternierten. Diese Zone stellt die Muskelsehnenverbindung dar, in der die Muskelzelle mit der kollagenreichen extrazellulären Matrix der Sehne in Kontakt tritt. Sie ist gekennzeichnet durch eine starke Invagination des Sarcolemms, um die bei der Kontraktion am Sarcolemma auftretenden Kräfte relativ zur Fläche zu verringern (Trotter, 2002). Die in der MTZ durch α X1rep2 detektierten Substrukturen wiesen einen zur Muskelfaser longitudinalen Verlauf auf (Abb.

12). Die regelmäßige Anordnung der Sarkomere und Z-Scheiben war in diesen Abschnitten nicht mehr gegeben. Diese Unregelmäßigkeit stellte vermutlich einen Artefakt dar, der durch das Schneiden zustande kam.

Die Ergebnisse verifizierten die von Wang und Kollegen (1999) gefundenen Resultate, daß das mXin (bzw. hier Xirp1) in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten präsent ist. Die hier angeführten Ergebnisse wiesen zudem darauf hin, daß Xirp1 auch einen integralen Bestandteil der Z-Scheiben im quergestreiften Muskel darstellen könnte. Die schon von Sinn et al. (2002) beschriebene Lokalisation von mXin in den myotendinosen Übergangszonen im Skelettmuskel wurde auch hier noch einmal deutlich.

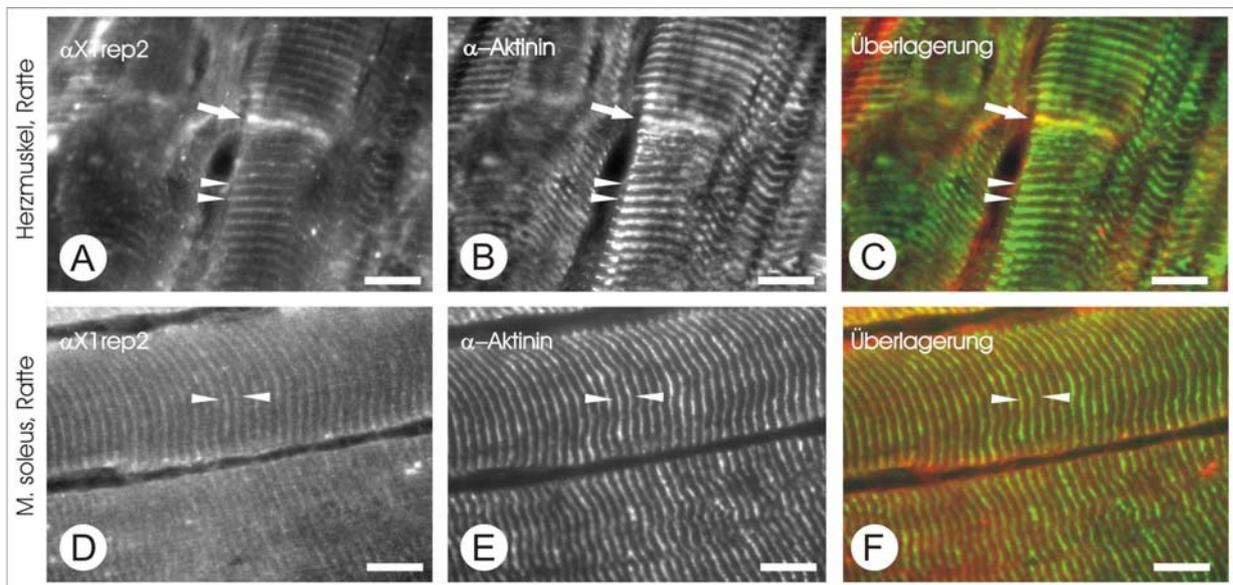


Abb. 11 Immunlokalisierung von Xirp1 im Herzmuskel und M. soleus der Ratte

Gefrierschnitte von A-C) Herzmuskel und D-F) M. soleus der Ratte. A) und D): Darstellung des α X1rep2-Signals (Texasrot). B) und E): Lokalisation des sarkomeren α -Aktinins (FITC). In C), F) Überlagerungen der Aufnahmen aus A) und B) bzw. D) und E). Das Antiserum detektierte rXirp in den Glanzstreifen und Z-Scheiben des Herzmuskels der Ratte. Im M. soleus detektierte das Antiserum Xirp1 in den Z-Scheiben und MTZ (s. Abb. 4.3-3). Das durch α X1rep2 detektierte Xirp1 kolokalisierte mit sarkomerem α -Aktinin in den Glanzstreifen und Z-Scheiben. Pfeil: Glanzstreifen, Pfeilspitze: Z-Scheibe, Maßstabsbalken: 10 μ m

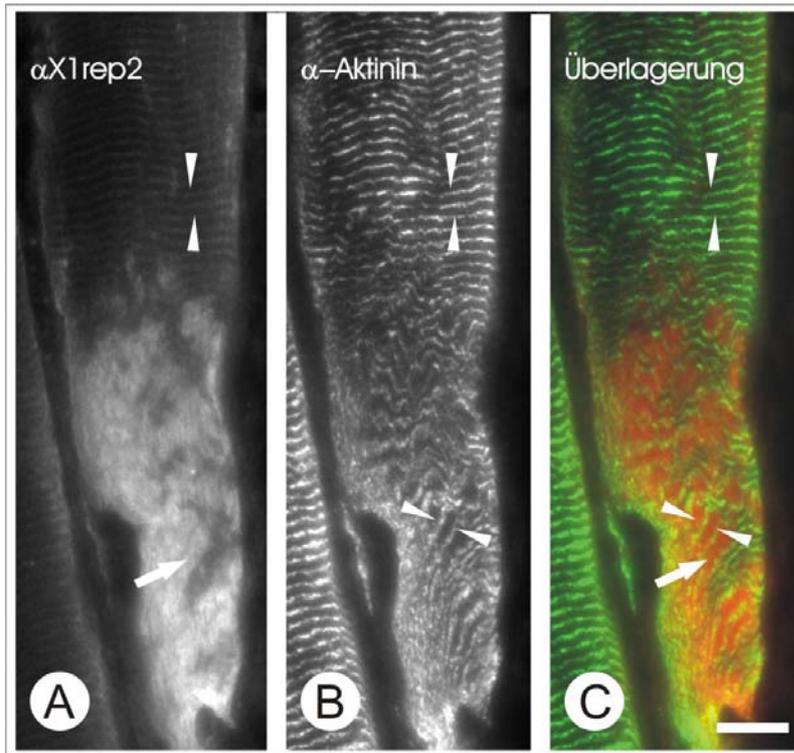


Abb. 12 **Immukalisation von Xirp1 in Muskel-Sehnen-Verbindung**

Gefrierschnitte von *M. soleus* der Ratte wurden mit A) α X1rep2 (Texasrot) und B) gegen sarkomeres α -Aktinin (FITC) gefärbt. C): Überlagerung beider Aufnahmen, Das Antiserum detektierte Xirp1 in den Z-Scheiben des Muskels und ist verstärkt in den myotendinösen Übergangszonen (MTZ). In den Z-Scheiben kolokalisierten α -Aktinin und das von α -X1rep2 detektierte Xirp1. In den MTZ wurde diese Kolokalisation nicht beobachtet und die Signale für α -Aktinin und rXirp alternierten. Das rXirp erschien in den MTZ in Strukturen, die longitudinal zur Muskelfaser orientiert waren, im Gegensatz zur orthogonalen Orientierung der Z-Scheiben. Pfeil: MTZ, Pfeilspitze: Z-Scheibe, Maßstabsbalken: 10 μ m

3.3.3 Lokalisation und Expression von hXirp1 in Humanen-Skelettmuskel-Zellen

Für die Untersuchung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters des humanen Xirp1 während der Myogenese wurden als Modellsystem die HSkM-Zellen genutzt. Die Kulturbedingungen der HSkM-Zellen wurden so gewählt, daß dem Stadium der proliferierenden Myoblasten (mononukleär) die verschiedenen Stadien der Differenzierung entgegengestellt werden konnten. Während des Differenzierungsprozesses, der durch Kontaktinhibition der Zellen bei Konfluenz der Kultur induziert wird oder durch serumarmes Medium stimuliert werden kann, stellen die Myoblasten ihre Zellteilung ein und fusionieren zu mehrkernigen Myotuben und vielkernigen, ausgedehnten Synzytien. Der Differenzierungsprozeß beinhaltet die Expression einer Vielzahl an Muskelproteinen und den Aufbau der quergestreiften und kontraktile Myofibrillen. Dieser Prozeß mit all seinen Expressionen und physiologischen und phänotypischen Veränderungen folgt selbstverständlich einem zeitlichen und räumlichen Muster (Sanger et al., 2002, Du et al., 2003).

Der Expressionsstatus des humanen Xirp1 in HSkM-Zellen ließ sich anhand von Zellextrakten verschiedenener Differenzierungsstadien im Westernblot und Immunfluoreszenzmikroskopie untersuchen. Die Immundetektion im Westernblot wurde mit dem Antiserum α X1rep1 durchgeführt, um die Expression beider Xirp1-Varianten zu

detektieren. Die Untersuchungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde primär mit α X1rep2 durchgeführt.

3.3.3.1 Zeitliche Expression von hXirp1 in Humanen-Skelettmuskel-Zellen

In Zellextrakten der proliferierenden, undifferenzierten Myoblasten (Abb. 13, Spur: M) wie auch in Myoblasten die unmittelbar vor der Differenzierung standen (Abb. 13, Spur: 0 h) konnte keine hXirp1-Expression nachgewiesen werden. Die Unterscheidung zwischen „M“-Myoblasten und „0h“-Myoblasten weist darauf hin, daß in „M“ die Myoblasten nicht konfluent, und somit unter proliferierenden Bedingungen, und in „0h“ konfluent, und am Beginn des Differenzierungsprozesses standen. Zum Zeitpunkt „0h“ wurden die Zellen auf (serumarmes) Differenzierungsmedium umgesetzt. Schon acht Stunden (8h) nach Differenzierungsbeginn wurde im Zellextrakt dieser Myoblasten eine Expression für hXirp1-L und hXirp1-S detektiert, die bis zum Zeitpunkt „16 h“ weiter anstieg. Eine Erhöhung des Expressionsniveaus konnte bis Tag 2 bzw. 4 der Differenzierung beobachtet werden. Ab dem Tag 4 des Differenzierungsprozesses liegt die Mehrzahl der Muskelzellen als fusionierte Myotuben und kleinere Synzytien vor.

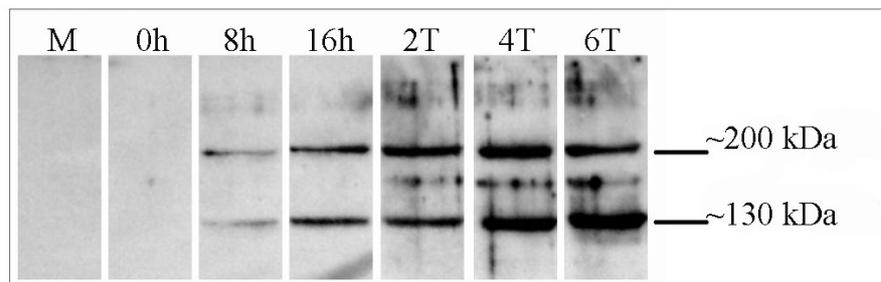


Abb. 13 Zeitlicher Expressionsstatus von hXirp1 in HSkM-Zellen

HSkM Zellextrakte verschiedener Differenzierungsstadien von proliferierenden (M) nicht konfluenten und konfluenten Myoblastenkulturen (0h). Zellen wurden bei 0h auf Differenzierungsmedium gesetzt. Die Differenzierungsstadien sind in der Kopfzeile durch 8h, 16h bzw. 2 bis 6 Tage (2T-6T) angegeben. Proteinbanden in Höhe von 200 kDa bzw. 130 kDa stellen hXirp1-L bzw. hXirp1-S dar. Die Expression beider Proteine wird mit Beginn des Differenzierungsprozesses induziert und steigt bis Tag 4 (4T) an. Die Verringerung der Expression von hXirp1-L in 6T stellt möglicherweise eine leichte Herabregulierung der hXirp1-L Isoform dar.

Der Differenzierungstag 6 stellte den Höhepunkt der Differenzierung der HSkM-Zellen dar, in dem ausgedehnte Synzytien mit quergestreiften und kontraktile Myofibrillen vorhanden sind. Zu diesem Zeitpunkt wies hXirp1-L einen leichten Abfall in seiner Expressionstärke gegenüber Tag 4 auf, wohingegen ein leichter Anstieg für hXirp1-S zu verzeichnen war.

Die Immunoblots zeigen deutlich, daß die Expression von hXirp1-L und hXirp1-S durch den Beginn der Muskeldifferenzierung induziert wurde.

Da die Expression der kurzen und langen Isoformen von Xirp1 zwar bis Tag 4 in Kultur in etwa gleichem Maße anstieg, danach aber deutlich weniger hXirp1-L nachzuweisen war, liegt der Verdacht nahe, daß beide Isoformen genetisch unterschiedlich reguliert werden.

3.3.3.2 Zeitliche und räumliche Expression und Lokalisation von hXirp1 in Humanen Skelettmuskel-Zellen

Für die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung an der räumlichen und zeitlichen Expression und Lokalisation von hXirp1 in HSkM-Zellen wurde primär das Antiserum α X1rep2 genutzt. Eine Unterscheidung zwischen hXirp1-S und -L konnte somit nicht erlangt werden. Die Zellen wurden wie beschrieben kultiviert und für die Immunfluoreszenz präpariert.

Da sarkomeres (sk)- α -Aktinin ein früher Marker für den Beginn des Differenzierungsprozesses in HSkM-Zellen ist und es in differenzierten Zellen in der Z-Scheibe lokalisiert, wurde dieses Protein wiederum als Referenz gewählt. Sarkomeres α -Aktinin wird in diesen Zellen innerhalb weniger Stunden nach Differenzierungsbeginn exprimiert.

In der Untersuchung wurden die verschiedenen Entwicklungsstadien der HSkM-Zellen getestet. Proliferierende Myoblasten einer nicht konfluenten Kultur exprimierten weder hXirp1 noch sk- α -Aktinin (nicht gezeigt). Erst in einer konfluenten Kultur ließ sich mit Hilfe des Antiserums hXirp1 in einigen wenigen Myoblasten lokalisieren. Die Abb. 14 A zeigt einen der Myoblasten, die in den konfluenten Kulturen hXirp1 exprimierten. Das Antiserum α X1rep2 detektierte hierbei das Protein an Fokalkontakten und Stressfasern ähnliche Strukturen, die möglicherweise schon frühe Prämyofibrillen darstellten. Eine Expression von sk- α -Aktinin lag in diesen Myoblasten noch nicht vor, doch ist anzunehmen, daß diese Myoblasten am Beginn der Differenzierung standen. Im weiteren Verlauf der Differenzierung, Tag 1 bis 4, zeigte sich eine Kolokalisation von sk- α -Aktinin und dem Signal des Antiserums an den Prämyofibrillen der Myotuben. Das hXirp1-Signal wies hier, wie sk- α -Aktinin, eine perlschnurartige Verteilung an den Prämyofibrillen auf (Abb. 14). In vielen Myotuben war zu beobachten, daß eine starke sk- α -Aktinin Lokalisation mit einer Abschwächung des Signal für hXirp1 einherging und vice versa. Die Lokalisation des hXirp1 an Fokalkontakten fiel in den Myotuben ab dem Differenzierungstag 2 deutlich verringert aus, jedoch lokalisierte hXirp1 verstärkt an den Enden der Zellen (Abb. 14, C).

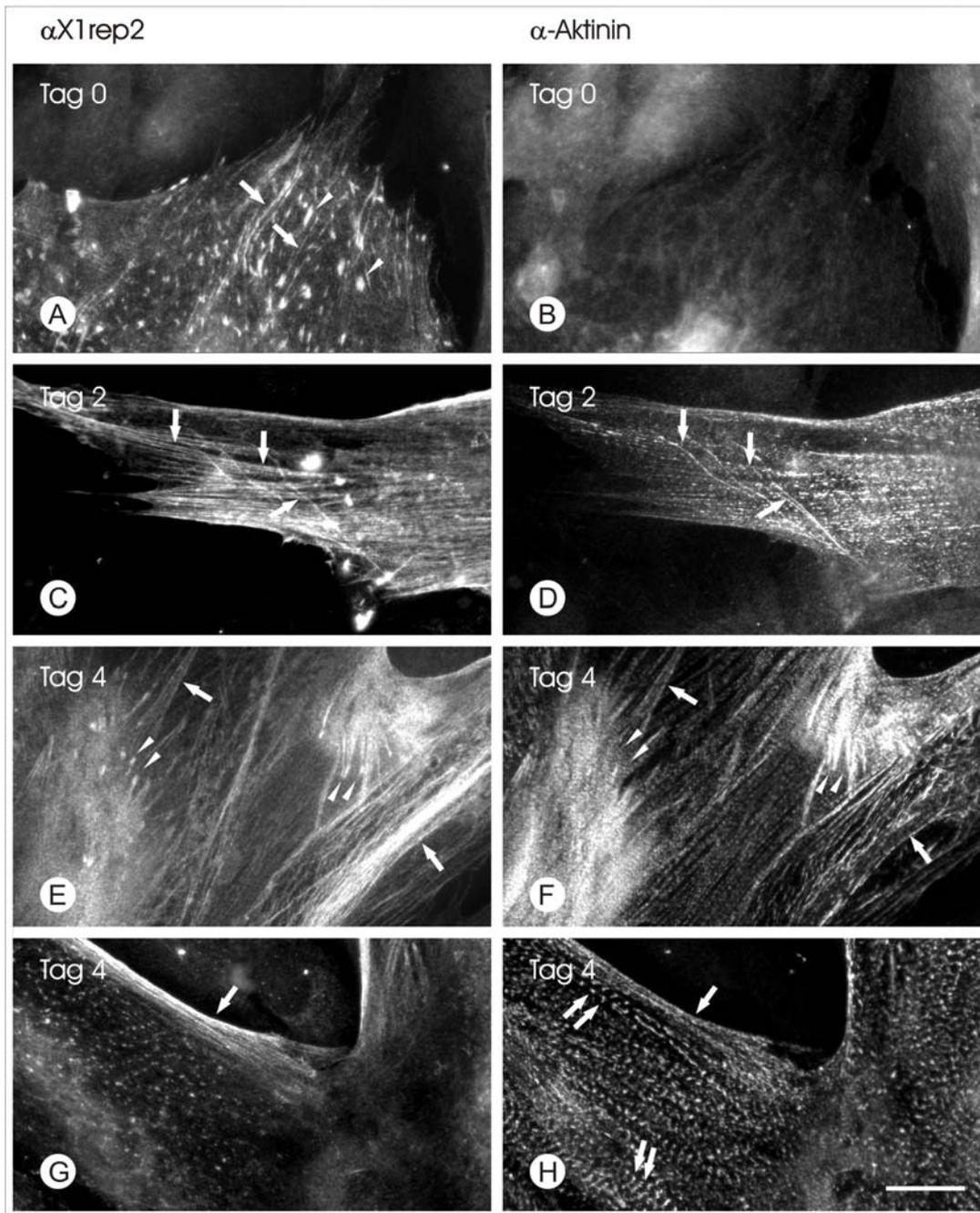


Abb. 14 Zeitliche und räumliche Expressionmuster von hXirp1 in HSkM (1)

Detektion von hXirp1 über das Antiserum α X1rep2 (A,C,E,G) mit Referenzfärbungen gegen sarkomeres α -Aktinin (B,D,F,H). Die Aufnahmen zeigen die Lokalisationen von hXirp1 und α -Aktinin (sk) in den Muskelzellen zu unterschiedlichen Differenzierungsstadien, die hier mit Tag 0 (A,B), Tag 2 (C,D) und Tag 4 (E bis H) angegeben sind. Die Expression von hXirp1 läuft der des sarkomeren α -Aktinins voraus (A,B) und kolokalisiert in späteren Differenzierungsstadien mit diesem (C bis H). In den Zellen ergab sich der Eindruck, daß Lokalisationen mit hohem α -Aktinin Anteil weniger hXirp1 zeigten. In Myotuben mit frühen Myofibrillen (G, H) fand sich hXirp1 primär an der Zellperipherie an Prämyofibrillen bzw. Streifasern. In G) ist punktförmige Lokalisation von hXirp1 erkennbar. Weitere Erläuterungen im Text. Pfeil: Prämyofibrillen, Pfeilspitze: Fokalkontakt, Maßstabsbalken: 10 μ m

In den Myotuben des Differenzierungstages 4, in denen die ersten quergestreiften Myofibrillen sichtbar waren, kam es zu einer dramatischen Umverteilung von hXirp1. Während α -Aktinin (sk), wie bekannt, die Z-Scheiben dieser Myofibrillen färbte, war das

hXirp1 Signal nur an der Peripherie und den distalen Enden der Myotuben und Synzytien vertreten (Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 8, C). Diese Trennung von sk- α -Aktinin und hXirp1 wurde in den Differenzierungstagen 5 und 6 verstärkt.

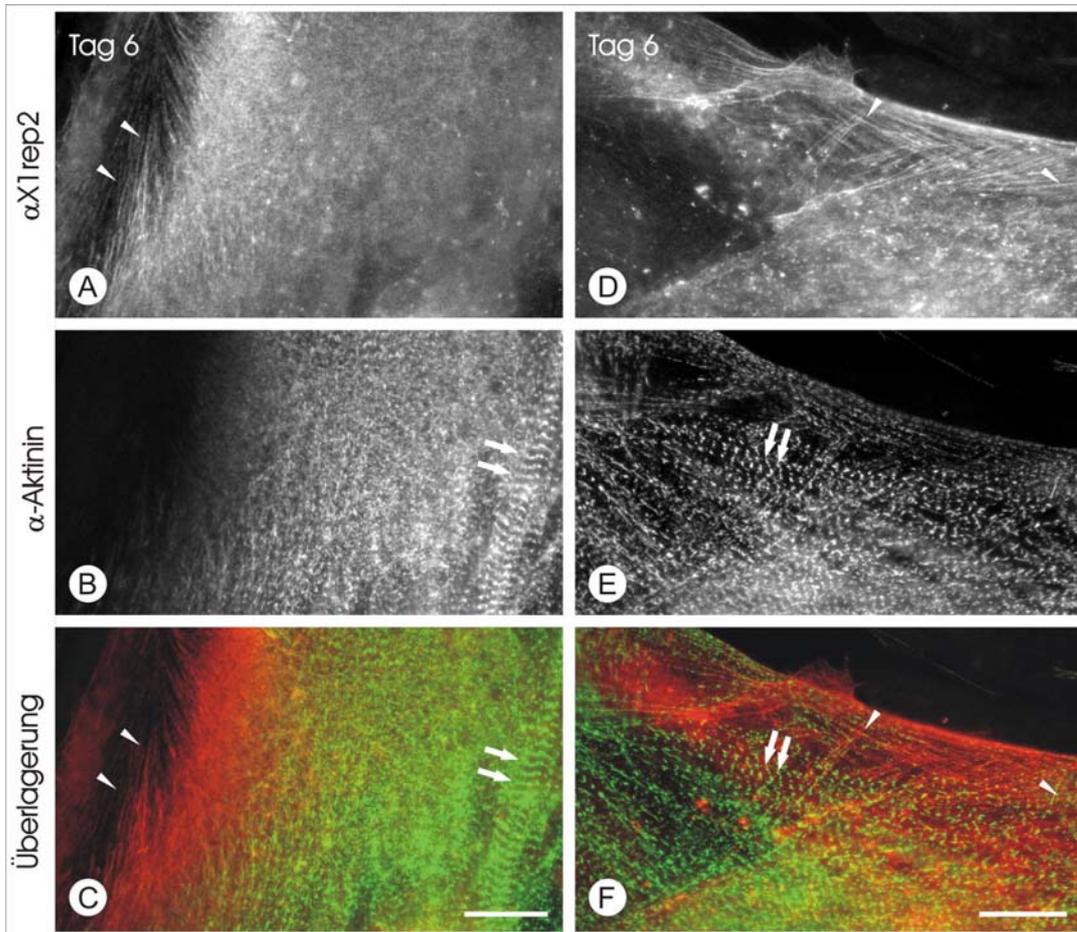


Abb. 15 Zeitliche und räumliche Expressionsmuster von hXirp1 in HSkM (2)

Detektion von hXirp1 über das Antiserum α X1rep2 (A,D, Texasrot) mit Referenzfärbungen gegen sarkomeres α -Aktinin (B, E, FITC) und den Überlagerungen in C) und F). Die Aufnahmen zeigen die Lokalisation beider Proteine am Differenzierungstag 6 mit quergestreiften Myotuben (B, E). Nach Tag 4 erfolgte eine dramatische Umverteilung der Lokalisation von hXirp1, so daß in Myotuben des Differenzierungstages 6 hXirp1 ausschließlich in der Peripherie der Zellen detektiert wurde. Hier fand sich hXirp1 an Prämyofibrillen (oder Strebfasern), an denen sarkomeres α -Aktinin kaum präsent war. dagegen war hXirp1 in den Myofibrillen nicht zu detektieren. Pfeil: Z-Scheiben der Myofibrillen, Pfeilspitze: periphere Lokalisation von hXirp1, Maßstabsbalken: 10 μ m

Das hXirp1 Signal in den Zellenden und der Peripherie besaß filamentösen Charakter und war nahezu sk- α -Aktinin-negativ (Abb. 15). Das sk- α -Aktinin stellte die mehr zentral liegenden, quergestreiften Myofibrillen, wie auch die nicht quergestreiften Prämyofibrillen dar, in denen ein Signal für hXirp1 bis auf einen diffusen Hintergrund fehlte. Einige Zellen wiesen punktförmige Verteilungen für hXirp1 auf, die stellenweise in Verbindung mit den sk- α -Aktinin Färbungen standen (Abb. 14, G und Abb. 8, A). Anhand dieser Ergebnisse ließ sich bestätigen, daß hXirp1-L bzw. hXirp1-S in differenzierenden Myoblasten und differenzierten Myotuben, nicht aber in den proliferierenden Myoblasten exprimiert wurde. Die Expression

für hXirp1 lief während des Differenzierungsprozesses der des sarkomeren α -Aktinins voraus. Das hXirp1 lokalisierte an Fokalkontakten und Prämyofibrillen. Mit Fortschreiten des Differenzierungsprozesses, zeigte sich eine Relokalisation von hXirp, die eine weniger ausgeprägte Fokalkontakt- und Prämyofibrillenlokalisation ab Differenzierungstag 4 beinhaltet. Das Protein ist in den differenzierenden und differenzierten HSkM-Zellen an den distalen Enden und der Peripherie in Prämyofibrillen oder streßfaserartigen Strukturen zu finden. Die Kolo-kalisation mit sk- α -Aktinin, wie sie in differenzierenden Myoblasten erkennbar war, war nicht zu beobachten.

3.4 Transiente Transfektionen mit hXirp Konstrukten in kultivierten Säugerzellen

Um einen Hinweis auf die Funktion und die Lokalisation eines Proteins, eines Teilpeptids oder einer Domäne eines Proteins zu erhalten, ist ein Mittel der Wahl die Expression dieses Proteins oder eines entsprechenden Fragments in lebenden Zellen. Über eine anschließende immunologische Anfärbung läßt sich das exprimierte Polypeptid visualisieren und durch eine Referenzfärbung mit bekannten Komponenten in einen Zusammenhang setzen. Eine weitere Möglichkeit, das zu untersuchende Protein zu visualisieren, ist die Fusion mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP bzw. EGFP). Bei dieser Art der experimentellen Herangehensweise wird davon ausgegangen, daß das in den Zellen exprimierte Protein bzw. Polypeptid sich ähnlich verhalte, wie in seiner nativen Umgebung. Somit kann man man aus den Lokalisationen des Proteins bzw. des Fragmentes und seinen möglichen Effekten in der Zelle, Rückschlüsse auf Funktionen ziehen.

Eine lange und kurze Variante sowie verschiedene trunkierte Konstrukte von hXirp1 bzw. hXirp2 wurden in unterschiedliche Säugerzellkulturen transient transfiziert. Hierzu gehörten A7r5-Glattmuskelzellen (aus der Ratte), die epithelialen PtK2-Zellen (aus der Beutelratte), B16F1-Melanomzellen (aus der Maus) sowie Myoblasten aus humanem Skelettmuskel (HSkM), die eine Primärzellkultur aus Satellitenzellen darstellen.

Da Xin spezifisch in der Skelett- bzw. Herzmuskulatur exprimiert wird (Wang et al., 1999), handelte es sich bei den Transfektionen in A7r5, PtK2 und B16F1 um ektopische Expressionen. Eine zuvor durchgeführte immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen mit dem Antiserum α X1rep2 stellte sicher, daß kein endogenes Xirp in diesen Zellen exprimiert wurde.

Die hier verwendeten Konstrukte und Konstruktgrenzen sind der Tab. 9 S.52 zu entnehmen und im Anhang Abb. 45 S. 122 dargestellt.

3.4.1 Transfektionen mit hXirp1-L, -S und -N in A7r5-, PtK2- und B16F1- Zellen

Mehrere Konstrukte, die jeweils die repetitiven Motive von hXirp1 enthielten, wurden in A7r5- und PtK2-Zellen transfiziert. Das Konstrukt der langen hXirp1 Isoform **hXirp1-L** (AS: 1 - 1843), und kurze Variante **hXirp1-S** (AS: 1 - 1121), wie auch das trunkierte Fragment **hXirp1-N** (AS: 1 - 749) exprimierten ein Protein bzw. Polypeptid, das, ausgehend vom Beginn der Sequenz, die N-terminalen Prolinmotive und repetitiven Motive (rM) (also den N-Terminus) von hXirp1 umfaßte. Die Unterschiede der Konstrukte lagen somit nur in der C-terminalen Erweiterung. Da keine generellen Unterschiede in Verhalten und Lokalisation dieser Konstrukte in den Transfektionsstudien auffielen, werden die Ergebnisse nachfolgend gemeinsam unter **hXirp1-rM** (repetitive Motive) behandelt. In den beiden verwendeten Zelltypen A7r5 und PtK2 lokalisierte hXirp1-rM an den Fokalkontakten und am Aktinzytoskelett. In den A7r5-Zellen war für hXirp1-rM eine stärkere Lokalisation am Aktinzytoskelett zu beobachten, als es in den PtK2-Zellen der Fall war.

Eine immunologische Vergleichsfärbung gegen Vinculin, einem Markerprotein für Fokalkontakte (Geiger et al., 1980), wies eine Kolo-kalisation mit hXirp1-rM an diesen Stellen auf. Das Signal der Vinculinfärbung nahm hierbei zusätzlich eine mehr distale (Ende der Streßfaser) und hXirp1-rM eine mehr proximale (ins Zellinnere gerichtete) Position innerhalb der Fokalkontakte ein. Das Signal der Phalloidinfärbung zur Darstellung der Aktinfilamente war hier analog zum hXirp1-rM Signal. Abb. 16 veranschaulicht unter anderem diesen Zusammenhang. Abb. 16 B zeigt desweiteren Vinculin-positive fibrilläre Adäsionen, wie sie in nichttransfizierten und transfizierten Zellen zu beobachten waren. Die mehr zentral in der Zelle liegenden, fibrillären Adhäsionen (1.5.1) bestehen u.a. aus einer etwas anderen Zusammenstellung an Ankerproteinen, als es in den Fokalkontakten der Fall ist (Katz et al., 2000; Zamir et al., 2000). Die longitudinal zu den Streßfasern verlaufenden Adhäsionen wiesen keine verstärkte Signalintensität für hXirp1-rM bzw. Phalloidin (F-Aktin) auf. Die Konstrukte hXirp1-rM zeigen also eine über das Aktinzytoskelett vermittelte Präferenz für Fokalkontakte. Eine durch die exprimierten hXirp1-rM vermittelte Vergrößerung der Fokalkontakte wurde in den untersuchten Zellen nicht beobachtet.

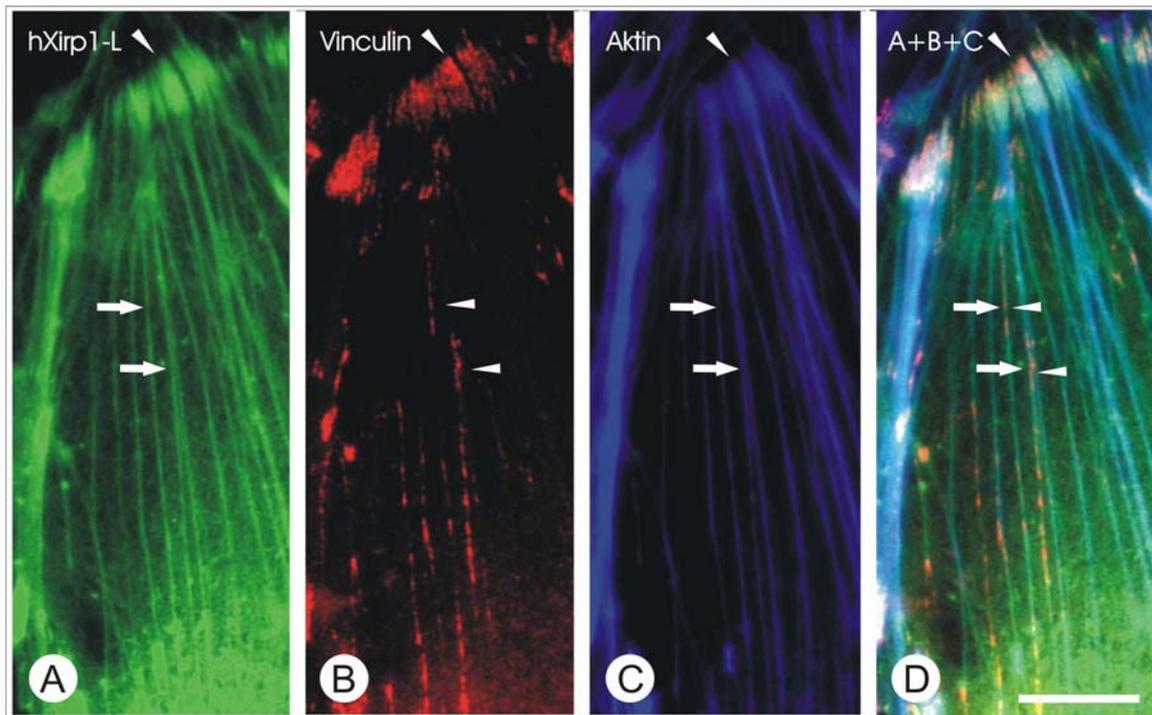


Abb. 16 **Transfektion von PtK2-Zellen mit hXirp1-L**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PtK2-Zellen nach transients Transfektion mit hXirp1-L mit A) Darstellung des transfizierten Konstruktes (EGFP), B) Immunfärbung gegen Vinculin (Texasrot) und C) Darstellung des Aktinzytoskeletts durch Phalloidinanlagerung (CPITC). Überlagerung D) von A, B und C zeigt Assoziation von hXirp1-L am Aktinzytoskelett und Kolokalisation mit Vinculin an Fokalkontakten, in denen die mehr distale Lokalisation von Vinculin zu erkennen ist. Man beachte fehlende Signalintensität für hXirp1-L und Phalloidin an Vinculin-positiven fibrillären Adhäsionsstellen innerhalb der Zelle. Pfeil: Streßfaser, Pfeilkopf: Fokalkontakt bzw. Adhäsionsstelle, Maßstabsbalken: 10 μm .

In den Zellen (A7r5 und PtK2), in denen die Expression der hXirp1-rM Konstrukte relativ schwach war, wurden in einigen Zellen nur die Fokalkontakte markiert und eine Lokalisation am Aktinzytoskelett nicht beobachtet. Weiterhin waren transfizierte A7r5 bzw. PtK2-Zellen zu beobachten, in denen hXirp1-rM trotz vorhandener Fokalkontakte nur an das Aktinzytoskelett band. In manchen A7r5-Zellen fielen fein gewundene Aktinfilamente auf, die möglicherweise einen Indikator für Streß darstellen sollen. Eine Bündelung von Aktinfilamenten durch die überexprimierten hXirp1-rM wurde nicht beobachtet.

Eine Zeitreihe über 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion und anschließender Immunfärbung gegen Vinculin und das Aktinzytoskelett (Phalloidin) konnte keine Klarheit darüber erbringen, ob die Konstrukte primär die Fokalkontakte und erst danach das restliche Aktinzytoskelett banden, da zu jeglichem Zeitpunkt die beschriebene Variabilität zu finden war. Die Lokalisation am Aktinzytoskelett in den transfizierten Zellen war zumeist als kontinuierlich beschreibbar. In einigen der transfizierten Zellen wurde für hXirp1-rM eine perlschnurartige Verteilung entlang der Streßfasern beobachtet, die - α -Aktinin positiv - als „dense bodies“ in Fibroblasten und Glattmuskelzellen bekannt sind (Langanger et al., 1986,

Bond und Somlyo, 1982). Abb. 17 zeigt hierzu ein Beispiel. In Zellen mit kontinuierlicher Lokalisation des hXirp1-rM am Aktinzytoskelett war diese perlschnurartige Verteilung stellenweise nur sehr schwach ausgeprägt bzw. fehlte komplett.

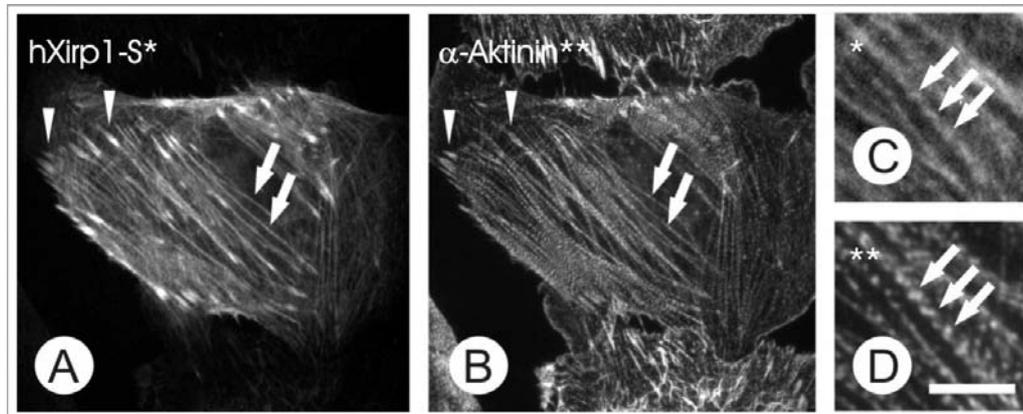


Abb. 17 **Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-S**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von A7r5-Zellen nach transien-ter Transfektion mit hXirp1-S mit A) Darstellung des transfizierten Konstruktes (EGFP), B) Immunfärbung gegen α -Aktinin (Texasrot). Das hXirp1-S zeigte klare Lokalisationen an Streifasern und Fokalkontakten. Vergrößerungen in C) hXirp1-S und D) α -Aktinin zeigen Verteilungen des Proteins hXirp1-S in „dense body“-Strukturen. Selbe Verteilungsmuster wurden auch für hXirp1-L und hXirp1-N beobachtet. Pfeile: Streifaser in A) und B) und „dense bodies“ in C) und D), Pfeilkopf: Fokalkontakt, Maßstabsbalken aus D) beträgt in A) und B) 20 μ m, in C,D): 5 μ m.

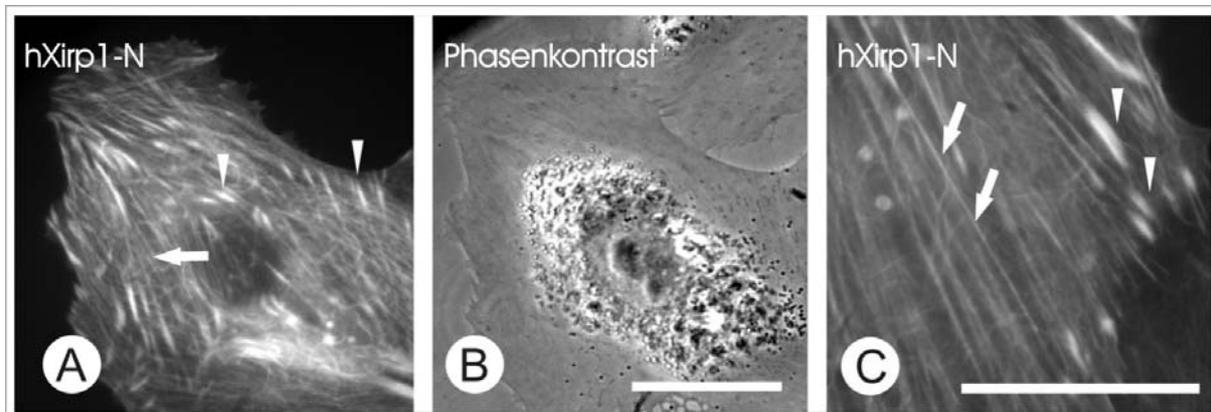


Abb. 18 **Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-N**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme lebender A7r5-Zellen nach transien-ter Transfektion mit hXirp1-N mit Darstellung des A) transfizierten Konstruktes (EGFP) und B) korrespondierender Phasenkontrastaufnahme. C) Darstellung des transfizierten Konstruktes (EGFP) in Vergrößerung. Deutliche Assoziation von hXirp1-N mit den Fokalkontakten und Streifasern, Pfeile in C) deuten auf schwach erkennbare knötchenartige Verdickungen hin, die möglicherweise hier „dense bodies“ darstellen. Pfeil: Streifaser, Pfeilkopf: Fokalkontakt, Maßstabsbalken in B) und C): 10 μ m

Eine Lokalisation der Proteine in lebenden Zellen zu beobachten war selbstverständlich von großem Interesse und wurde u.a. in A7r5-Zellen durchgeführt. Abb. 18 zeigt die Lokalisation von hXirp1-N in A7r5-Zellen stellvertretend für alle hXirp1-rM Konstrukte.

Die Lokalisationen wie sie allgemein in den fixierten Zellpräparaten gefunden wurden, ließen sich auch hier nachvollziehen. Die Aufnahme zeigt die kontinuierliche Lokalisation von hXirp1-N entlang der Aktinstreißfasern mit schwach erkennbaren knötchenartigen, relativ regelmäßig verteilten Verdickungen sowie Lokalisation an den Fokalkontakten. Ein veränderter Phänotyp wurden in den untersuchten Zellen nicht beobachtet.

Um einen Einblick auf einen möglichen Einfluß der hXirp1-rM auf die Dynamik des Aktinzytoskeletts zu erhalten, wurden weitere Transfektionsstudien in B16F1-Melanomzellen durchgeführt. Diese Zellen besitzen auf Laminin platiert erhöhte Motilität und ausgeprägte Lamellipodien. Um eine Darstellung der Dynamik dieser Prozesse zu ermöglichen, wurden die mikroskopischen Untersuchungen an lebenden Zellen vorgenommen. Abb. 19 zeigt einige Bilder aus einer Bildsequenz einer mit hXirp1-S transfizierten B16F1 Zelle

In den motilen B16F1-Zellen war die Lokalisation der überexprimierten Konstrukte hXirp1-L, hXirp1-S und hXirp1-N deutlich auf das kontraktile Aktinfilamentsystem des Zellkörpers begrenzt. Motile, transfizierte Zellen besaßen ausgeprägte Lamellipodien und ein im Zellkörper gelegenes Aktinfilamentsystem, dessen Kontraktion sowie die regulierte Depolymerisation und Polymerisation eine Ursache der gerichteten Bewegung der Zelle darstellen (Small et al., 1998).

Eine Lokalisation von hXirp1-rM im dynamischen, ebenfalls aktinhaltigen Lamellipodium (Saum der Lamelle) und der Lamelle selbst wurde hingegen nicht beobachtet. Im Übergang vom kontraktile Aktinfilamentsystem zum dynamischen lamellipodialen, zeigte sich eine eindeutige Ausdünnung der hXirp1-rM Signale. Eine Lokalisation an Fokalkontakten ist kaum beobachtet worden, oder fiel relativ schwach aus. Zellen mit einem sehr hohen Expressionsniveau an hXirp1-rM wiesen einen kontrahierten und nicht motilen Phänotyp auf.

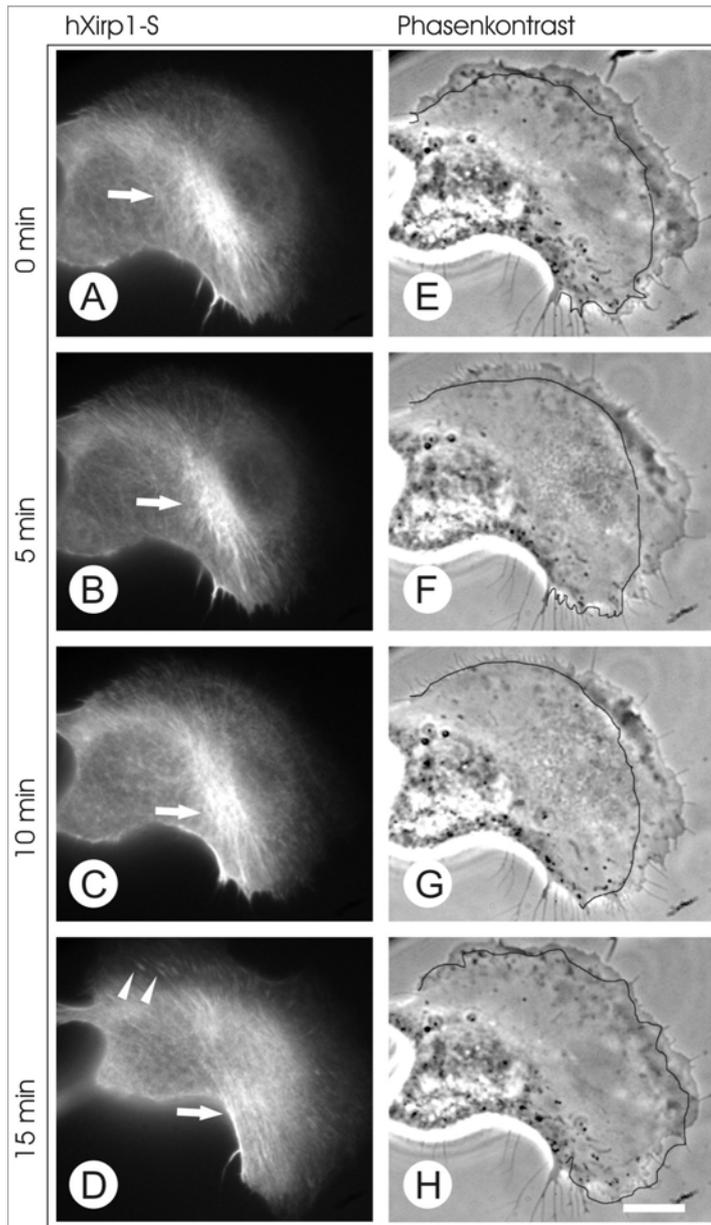


Abb. 19 Transfektion von B16F1-Zellen mit hXirp1-S

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Bildfolge von lebenden B16F1-Zellen nach transienter Transfektion mit hXirp1-S. Darstellung A) bis D) des transfizierten Konstruktes (EGFP) und E) bis H) der korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen. Die Bilder entstammen einer Bildfolge und liegen ca. 5 min auseinander. Die dargestellte Zelle in D) zeigt die im Text beschriebene, kaum beobachtbare, Fokalkontaktlokalisation von hXirp1-S in B16F1-Zellen. Beachte starkes hXirp1-S-Signal am kontraktile Aktinzytoskelett, die Ausdünnung dieses Signals im restlichen Zellkörper und das Fehlen im dynamischen Lammellipodium. Begrenzung des hXirp1-S Signals wird in den Phasenkontrastbildern durch die schwarze Linie gekennzeichnet. In D) erfolgte Retraktion der Lamelle. Analoge Beobachtungen wurden für hXirp1-L und hXirp1-N gemacht. Pfeil: kontraktile Apparat, Pfeilkopf: Fokalkontakt, Maßstabsbalken: 20 μm

Die Ergebnisse der Transfektionsstudien wiesen auf eine starke Affinität aller hier untersuchten hXirp1-rM-Varianten zum Aktinzytoskelett und den hierauf basierenden Fokalkontaktstrukturen hin. Es handelte sich somit bei hXirp1 um ein Aktinzytoskelett-assoziiertes Protein. Die untersuchten Konstrukte zeigten in den transfizierten Zellen A7r5 und PtK2 keine negativen Effekte auf den Phänotyp der Zellen. Transfizierte B16F1-Melanomzellen besaßen bei hoher Expression von hXirp1-rM möglicherweise einen bereits kontrahierten Phänotyp, der eine dynamische Motilität be- bzw. verhinderte.

3.4.2 Transfektionen mit hXirp1 Konstrukten mit prolinreichen Motiven

Verschiedene hXirp1-Konstrukte, die die prolinreichen Sequenzen und Motive umfaßten, wurden in A7r5-Zellen transfiziert. Die hier verwendeten Konstrukte und Konstruktgrenzen sind schematisch in Abb. 45 S. 122 dargestellt. Es wurden zwei Konstrukte hergestellt, die beide die N-terminal gelegenen prolinreichen Motive enthielten. Einem der Konstrukte (hXirp1-NPP Δ DBD) fehlte die nachfolgende putative DNA-Bindungsdomäne (DBD), wohingegen hXirp1-NPP-DBD diese enthielt. Mit beiden Konstrukten sollte der Frage nachgegangen werden, ob die DBD einen Einfluß auf die Lokalisation des exprimierten Peptids besitzt und z.B. eine Kernlokalisierung hervorruft.

Das Konstrukt **hXirp1-NPP Δ DBD** (AS: 1–54) lokalisierte neben einer diffusen Verteilung im Zytoplasma, nur sehr schwach und perlschnurartig am Aktinzytoskelett der A7r5-Zellen (nicht gezeigt). Das hierzu erweiterte Konstrukt **hXirp1-NPP-DBD** (AS: 1–89), das die putative DNA-Bindungsstelle enthielt, zeigte die gleiche Lokalisation am Aktinzytoskelett wie hXirp1-NPP Δ DBD, die jedoch deutlicher ausfiel. **hXirp1-NPP-DBD** lokalisierte hierbei klar an den α -Aktinin-positiven „dense bodies“ der Streßfasern (Abb. 20). Eine Lokalisation an Fokalkontakten wurde nicht beobachtet. In beiden Transfektionsexperimenten (hXirp1-NPP Δ DBD und –DBD) zeigte sich eine Kernfärbung, die allerdings nur nach PFA-Fixierung auftrat und in der MA-Fixierung ausblieb. Die Ergebnisse gaben also letztlich keinen Hinweis auf eine Funktionalität der putative DNA-Bindungsstelle. Interessanterweise zeigte sich ein positiver Effekt der DBD-Erweiterung (hXirp1-NPP-DBD) auf die Streßfaserlokalisierung.

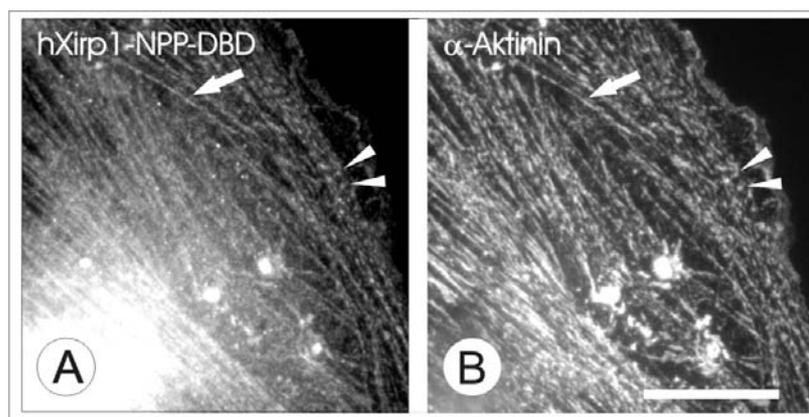


Abb. 20 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-NPP-DBD

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A7r5-Zellen nach transienter Transfektion mit hXirp1-NPP-DBD. Darstellung A) des transfizierten Konstruktes (EGFP) und B) α -Aktinin (Texasrot). Beachte die Lokalisation des exprimierten Peptids an Streßfasern mit starker Präferenz zu „dense bodies“, die durch α -Aktinin dargestellt werden und eine Kolokalisation zu hXirp1-NPP-DBD zeigen. Pfeil: Streßfaser, Pfeilkopf: „dense body“, Maßstabsbalken: 20 μ m

Das Konstrukt **hXirp1-757-1162** (AS: 757–1162), das die Aminosäuresequenz C-terminal der repetitiven Motive bis Aminosäure 1162 abdeckte und eine putative Bindungsstelle für Phosphonukleotide (P-loop, AS: 1026–1036) sowie putative Bindungsstellen für SH3-Domänen enthielt (AS: 1109-1120), zeigte sich diffus im Zytoplasma verteilt und nur schwach am Aktinzytoskelett lokalisiert. Fokalkontakte wurden nicht dargestellt (Abb. 21).

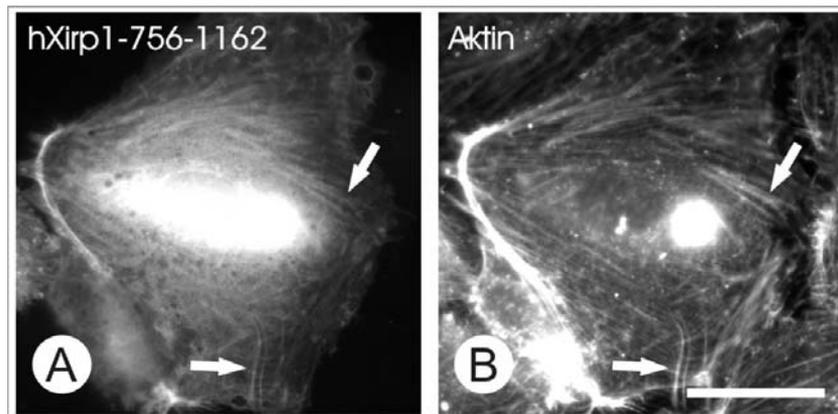


Abb. 21 **Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-757-1162**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A7r5-Zellen nach transierender Transfektion mit hXirp1-757-1162. Darstellung A) des transfizierten Konstruktes (EGFP) und B) des Aktinzytoskeletts über Phalloidin. Beachte diffus zytoplasmatische und schwach am Aktinzytoskelett erkennbare Lokalisation des Konstrukts. Pfeil: Streßfaser, Maßstabsbalken: 50 μ m

Das Polypeptid des Konstruktes **hXirp1-CPP** (AS: 1119–1416) umfaßte die C-terminalen prolinreichen putativen Liganden für EVH1 und SH3-Domänen. In A7r5-Zellen lokalisierte dieses Polypeptid an den Streßfasern, dagegen wurde keine Lokalisation an den Fokalkontakten beobachtet (Abb. 22).

hXirp1-CPP-CC (AS: 1200- 1556), das ein die C-terminal erweitertes Konstrukt von hXirp1-CPP darstellte, enthielt zusätzlich die Heptaden-Sequenz (AS: 1457-1500) des C-Terminus von hXirp1-L. In A7r5- wie auch PtK2-Zellen führte dieses Konstrukt zu einem veränderten Phänotyp der Zellen, der als kontrahiert zu beschreiben ist (Abb. 23). Transfizierte Zellen waren gekennzeichnet durch retrahierte Zellränder mit langen Vinculin- und hXirp1-CPP-CC-positiven Fokalkontakten. Das exprimierte Protein zeigte eine deutliche Affinität zu Streßfasern und Fokalkontakten. Die Zellen enthielten kleinere Aggregate, die auch in der Phalloidinanfärbung positiv und somit aktinhaltig waren. Die Lokalisation von hXirp1-CPP-CC an den Zellrändern der Zellen stellt keinen Lamellipodialsaum, sondern die retrahierte Peripherie der Zelle mit Überresten des Aktinzytoskeletts dar. Da sich diese Darstellung in verschiedenen Transfektionsstudien zeigte, wurde nicht von einem Fixierungsartefakt ausgegangen.

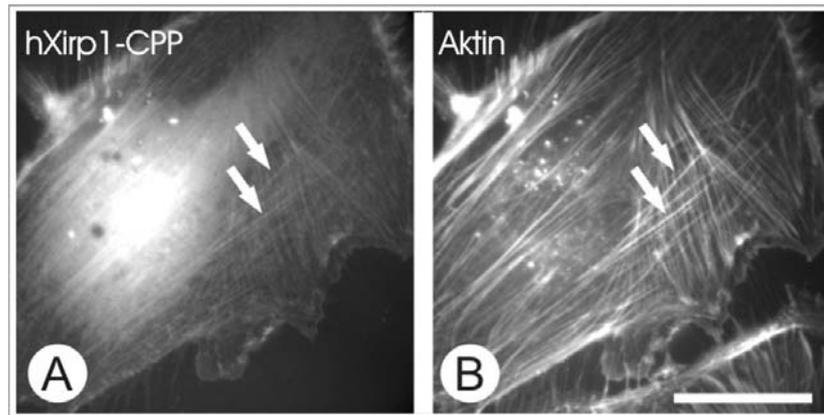


Abb. 22 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-CPP

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A7r5-Zellen nach transien-ter Transfektion mit hXirp1-CPP. Darstellung **A**) des transfizierten Konstruktes (EGFP) und **B**) Aktinzytoskeletts über Phalloidin. Beachte die schwache, jedoch klare Lokalisation von hXirp1-CPP an Streßfasern. Pfeil: Streßfaser, Maßstabsbalken: 50 μm

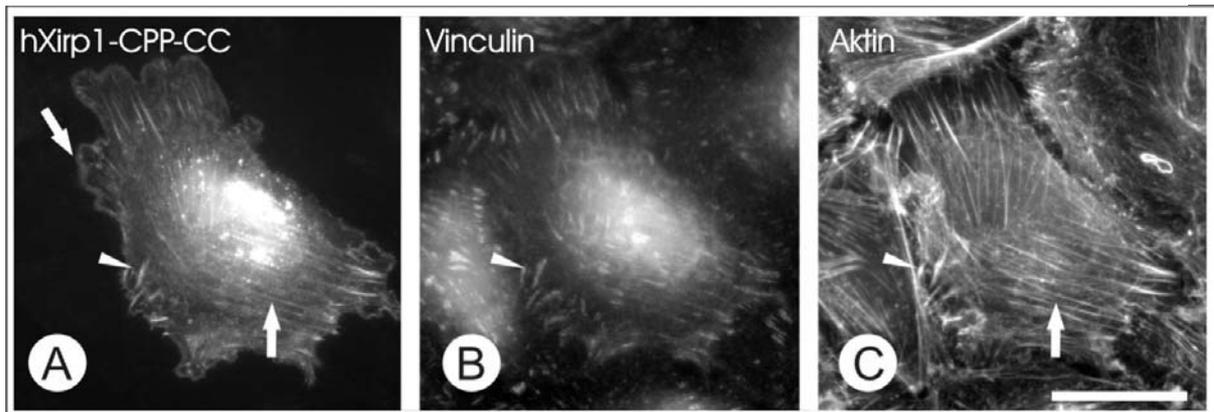


Abb. 23 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-CPP-CC

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A7r5-Zellen nach transien-ter Transfektion mit hXirp1-CPP-CC. Darstellung **A**) des transfizierten Konstruktes (EGFP) **B**) Vinculin (Texasrot) und **C**) des Aktinzytoskeletts über Phalloidin. Man beachte den retrahierten Phänotyp der transfizierten Zelle mit einer Zellperipherie, in der sich Überreste des Aktinzytoskeletts befinden. Das Konstrukt kolokalisierte mit Vinculin an den langen, spitzen Fokalkontakten sowie mit Phalloidin an den Streßfasern und am Retraktionssaum. Pfeil: Streßfaser, Pfeilkopf: Fokalkontakt, Maßstabsbalken: 50 μm

3.4.3 Transfektionen mit hXirp1-Y und -FC

Die mit dem Konstrukt hXirp1-Y beobachtete Bindung am Filamin C ließ sich durch ein Hefe-Doppelhybrid-Experiment weiter eingrenzen (unpublizierte Daten). Dieses Konstrukt wurde mit hXirp1-FC bezeichnet. Beide C-terminalen Konstrukte, **hXirp1-Y** und die hiervon trunkierte Variante **hXirp1-FC** zeigten jedoch eine vergleichbare Verteilung in transfizierten A7r5 und PtK2-Zellen:

hXirp1-Y (AS: 1497–1843) wies eine perlschnurartige bis weit verteilt punktförmige, aggregatartige Lokalisation an den Streßfasern auf. Diese Verteilung entlang der Streßfasern fiel in vielen Zellen erst durch die Anfärbung mit Phalloidin auf. Bei vielen dieser punktförmigen Lokalisationen handelte es sich anhand der Größe um Aggregate, die auch in der Phalloidin-färbung als knotenartige Verdickungen an den Streßfasern erkannt wurden (Abb. 24, C, D). Kleinere „Aggregate“ lokalisierten (nur schwach erkennbar) in den „dense bodies“, wie die Referenzfärbung gegen α -Aktinin belegte (Abb. 24, G und H). Große Aggregate von hXirp1-Y hingegen wiesen keine Kollokationen mit α -Aktinin auf (Abb. 24, I bis M), wodurch eine Wechselwirkung zwischen hXirp1-Y und α -Aktinin ausgeschlossen werden kann.

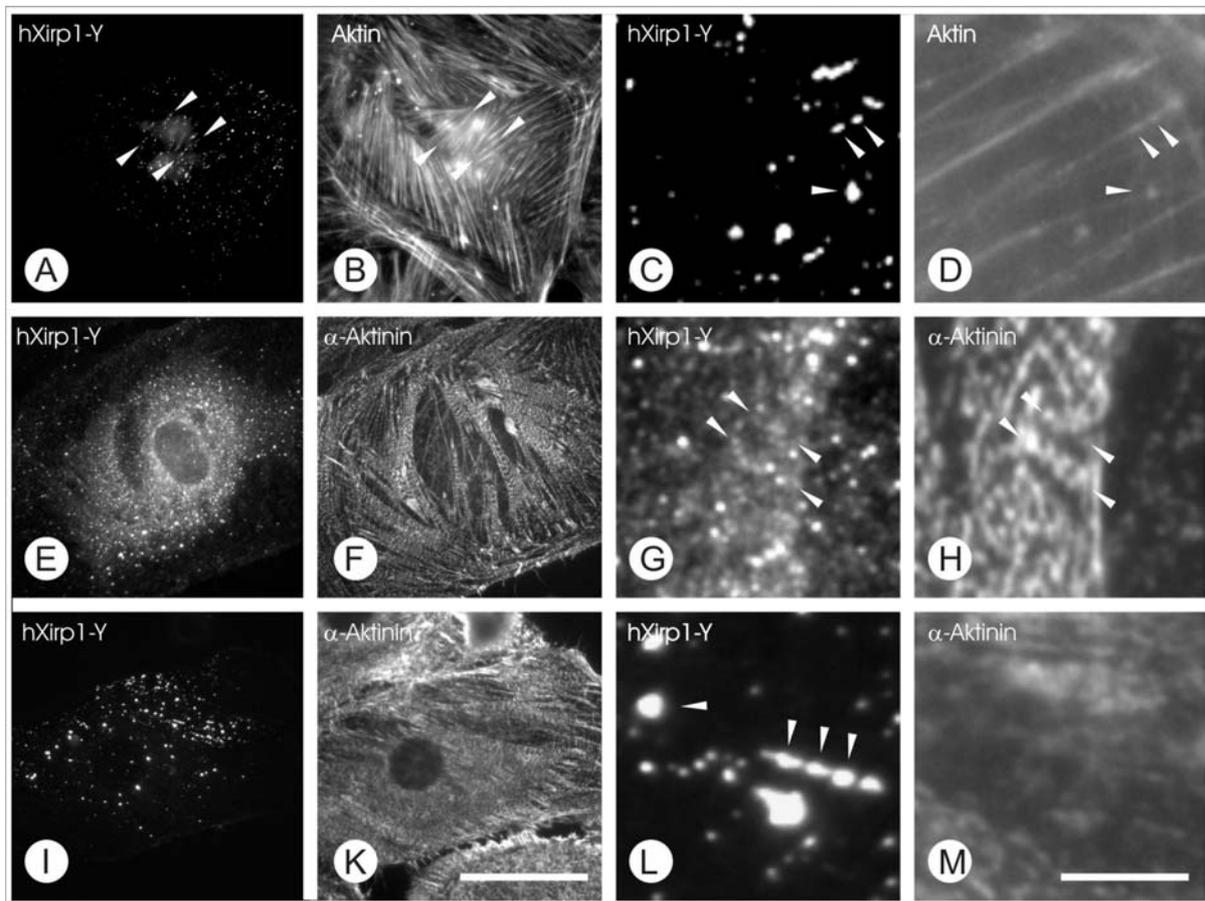


Abb. 24 **Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-Y**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A7r5-Zellen nach transienter Transfektion mit hXirp1-Y. Obere Reihe zeigt die mehr „zufälligen“ Verteilungsmuster von A) hXirp1-Y, die erst durch die Referenzfärbung mit B) Phalloidin als Streßfaser-assoziiert erscheinen. Die Aggregate von C) hXirp1-Y erscheinen D) Phalloidin- und somit Aktin-positiv. Mittlere Reihe zeigt E) relative klare Streßfaser-assoziierte Lokalisation von hXirp1-Y (EGFP) mit F) Referenzfärbung gegen α -Aktinin (Texasrot). In G) (hXirp1-Y) und H) (α -Aktinin) zeigt sich gleiche Lokalisation beider Proteine. Untere Reihe stellt I) und L) große Aggregate an hXirp1-Y dar, die K) und M) keine Aggregation an α -Aktinin folgern. Pfeilkopf: hXirp1-Y und Kollokationen mit Phalloidin bzw. α -Aktinin, Maßstabsbalken: 50 μ m in A, B, E, F, I, K und 5 μ m in C, D, G, H, L, M

In transfizierten B16F1-Zellen zeigte sich für hXirp1-Y die gleiche Art der Lokalisation (hXirp1-FC nicht getestet). Auf Laminin platierte B16F1-Zellen zeigten allerdings keine Motilität und besaßen einen stark kontrahierten Phänotyp. Zellen mit Lamellipodien wurden in diesen Transfektionen nicht beobachtet. Das ektopisch exprimierte hXirp1-Y blockierte also in den Melanomzellen deren Motilität.

In den mit **hXirp1-FC** (AS: 1685 – 1843) transfizierten A7r5-Zellen wies das exprimierte Polypeptid im Vergleich zu hXirp1 eine nur schwache punktförmige Aggregatbildung auf. Die schon für hXirp1-Y beschriebenen „punktförmigen“ bis „perlschnurartigen“ Verteilungsmuster ließen sich auch hier wiederfinden. Geringe Konzentrationen des exprimierten Peptids fanden sich perlschnurartig in den „dense bodies“ der Streßfasern, die durch die Referenzfärbung gegen α -Aktinin dargestellt wurden. (Abb. 25). Zellen mit starker Expression des Peptids wiesen außerdem diffus im Zytoplasma verteiltes hXirp1-FC auf.

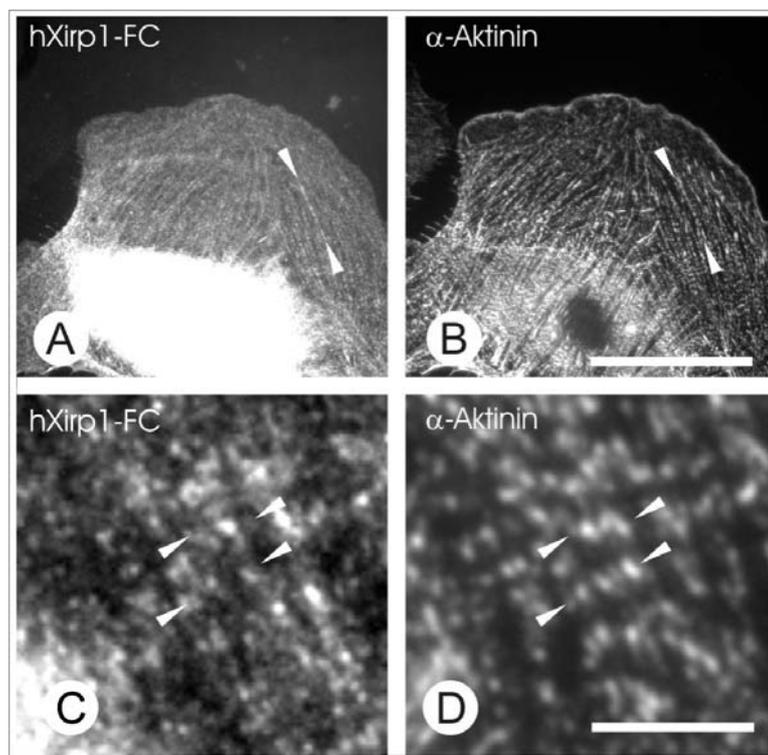


Abb. 25 **Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-FC**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A7r5-Zellen nach transienter Transfektion mit hXirp1-FC. Darstellung A) und C) des hXirp1-FC (EGFP) und B), D) α -Aktinin (Texasrot). hXirp1-FC lokalisierte ähnlich hXirp1-Y mit geringerem Aggregationsvermögen an „dense bodies“. Diffuse zytoplasmatische Verteilung des Grossteils des exprimierten Proteins mit erkennbaren perlschnurartigen Lokalisationen an Streßfasern. Referenzfärbung gegen α -Aktinin B) und D) weist diese Lokalisationen als „dense bodies“ aus, in denen α -Aktinin und hXirp1-FC kolokalisieren. Pfeilkopf: Kolokalisation von hXirp1-FC und α -Aktinin an A) und B) einer Streßfaser und C) und D) innerhalb einer Streßfaserbündel. Maßstabsbalken in A,B) 50 μ m, und C,D) 5 μ m

Zur weiteren Verifizierung der Hefe-Doppelhybrid-System-Daten, die eine Interaktion zwischen Filamin C d19-21 und hXirp1-FC zeigten, wurden diese beiden trunkierten Varianten in PtK2-Zellen doppeltransfiziert. Für die Domänen 19-21 des Filamin C war bereits bekannt, daß sie in PtK2-Zellen eine schwache Lokalisation an den „dense bodies“ aufwies, aber auch zur Bildung von großen Aggregaten neigte (van der Ven 2000 b). In den Doppeltransfektionen wiesen beide Konstrukte eine Kolokalisation innerhalb der „dense-body“ Strukturen der Streßfasern auf. Zusätzlich erfolgte die Rekrutierung des hXirp1-FC in die von dem Filamin Konstrukt hervorgerufenen Aggregate, die auf eine Bindung beider Polypeptide hinwies.

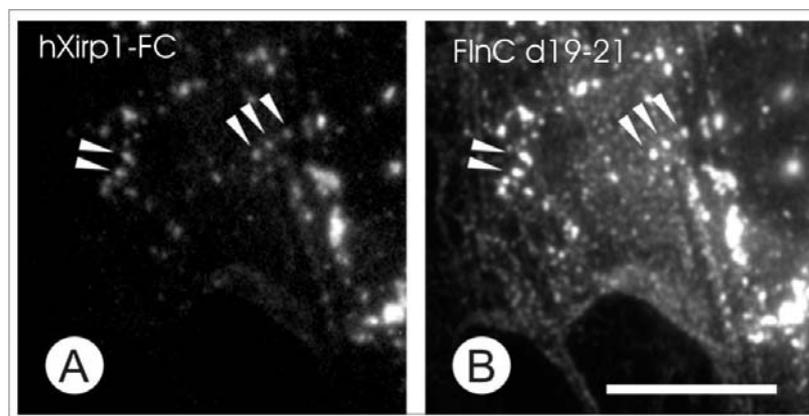


Abb. 26 **Doppeltransfektion von PtK2-Zellen mit hXirp1-FC und FlnC-d19-21**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PtK2-Zellen nach transienter Transfektion mit hXirp1-FC und FlnC-d19-21. Darstellung A) des hXirp1-FC (EGFP) und B) FlnC-d19-21 (T7, Texasrot). hXirp1-FC kolokalisierte mit FlnC-d19-21 in den „dense bodies“. Beide Proteine waren auch in den von FlnC-d19-21 verursachten Aggregaten zu finden. Pfeilkopf: Kolokalisationen in „dense bodies“, Maßstabsbalken: 20 µm

3.4.4 Transfektion von hXirp1 Konstrukten in Humanen-Skelettmuskel-Zellen

Transfektionen in kultivierten HSKM-Zellen sollten darüber Aufschluß geben, wie sich die hXirp1-Vollängenvariante bzw trunkierte Varianten in dem Zellsystem verhalten, in dem hXirp endogen exprimiert wird (s.3.3.2). Die Kultivierung der Zellen beinhaltet proliferierende, mononukleäre Myoblasten die in einem Differenzierungsprozeß zu poylnukleären Myotuben und ausgedehnten Synzytien verschmelzen. Der Differenzierungsprozeß wird durch Kontaktinhibition der Myoblasten induziert oder kann durch serumarmes Medium induziert werden. Die ersten Myotuben sind ca. 24 bis 36 h nach Differenzierungsbeginn erkennbar und enthalten nach ca. 3 bis 4 Tagen (Differenzierungstag, 3T bzw. 4T) Myofibrillen mit beginnender Querstreifung. Der Differenzierungsprozeß erreicht in den HSKM-Zellen seinen Höhepunkt im Differenzierungstag 6. Hier können

spontane Kontraktionen der Muskelzellen beobachtet werden und die Myofibrillen zeigen eine ausgeprägte Querstreifung.

Ein gravierender Nachteil der Skelettmuskelzellen besteht darin, daß sie sich nur mit sehr geringer Effizienz transfizieren lassen bzw. daß transfizierte Zellen oftmals nicht zu Myotuben differenzieren. Weiterhin führt die Verschmelzung der frühen Muskelzellen (zu Myotuben und ausgedehnten Synzytien) möglicherweise zu einer Ausdünnung der Transfektionstärke und somit –effizienz. Differenzierende oder differenzierte Zellen sind des weiteren nicht transfizierbar. Ein Vielzahl an Transfektionen mit den verschiedenen hXirp-Konstrukten wurde durchgeführt und erbrachten wie zu erwarten eine relative geringe Ausbeute.

hXirp1-N, (AS: 1–749) wie auch **hXirp1-L** (AS: 1–1843) wurden in transfizierten Myoblasten (mononukleär, undifferenziert) und in differenzierenden Myotuben (polynukleär) an Fokalkontakten, Streßfasern und/oder Prämyofibrillen beobachtet. In den Prämyofibrillen und Streßfasern lokalisierten beide Varianten kontinuierlich bis perlschnurartig entlang dieser Aktinzytoskelettstrukturen. Kolokalisationen mit sarkomerem α -Aktinin (Abb. 27) in den Strukturender Z-Körperchen wurden beobachtet und es entstand der Eindruck, daß **hXirp1-N** bzw. -L weniger in stark α -Aktinin-positiven Stellen lokalisierte und vice versa. Die Aufnahme in Abb. 27 zeigt einen Ausschnitt einer Myotube am Differenzierungstag 2.

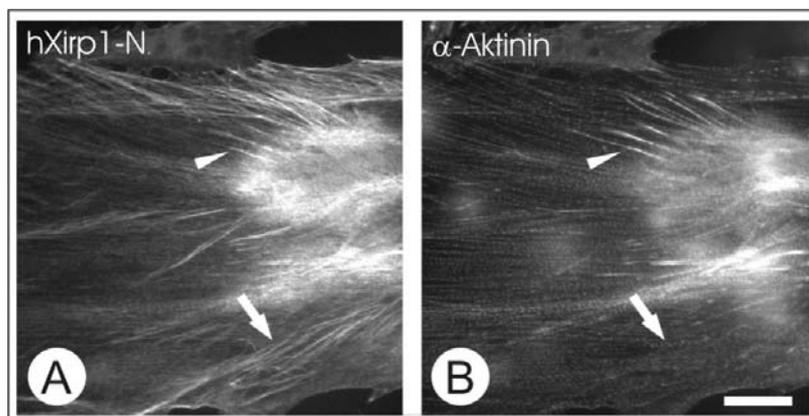


Abb. 27 Zelluläre Lokalisation von hXirp1-N in HSKM, Differenzierungstag 2

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transient transfizierter HSKM-Zellen im Differenzierungsstadium 2 (DS2). Darstellung der Lokalisation des A) hXirp1-N (EGFP) und des B) sarkomeren α -Aktinin, (Texasrot), hXirp1-N lokalisierte an den Prämyofibrillen mit verstärktem Signal in den Übergängen zu den in Fokalkontakten. Beachte Kolokalisation beider Proteine in Prämyofibrillen. Stellenweise weisen Strukturen mit starkem hXirp1-N Signal kaum bis keine Signale für α -Aktinin auf (Pfeil). Pfeilspitzen: Prämyofibrillen in Fokalkontaktnähe, Pfeil: Prämyofibrillen oder Streßfaser ohne (sk)- α -Aktinin, Maßstabsbalken: 20 μ m

Abb. 28 zeigt eine recht schlecht differenzierte Myotube des Differenzierungstages 6 die **hXirp1-L** überexprimierte. Die Zelle wies quergestreifte Myofibrillen (Referenzfärbung gegen Titin, T12, Z-Scheibenepitop) auf, in deren Z-Scheiben kein hXirp1-L lokalisierte. Das

Konstrukt lokalisierte hierbei in Nähe der Fokalkontakten. Der diffuse zytoplasmatische Hintergrund konnte nicht eindeutig in Übereinstimmung mit den Prä- bzw. Myofibrillen gebracht werden. Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch mit dem Konstrukt hXirp1-N gemacht.

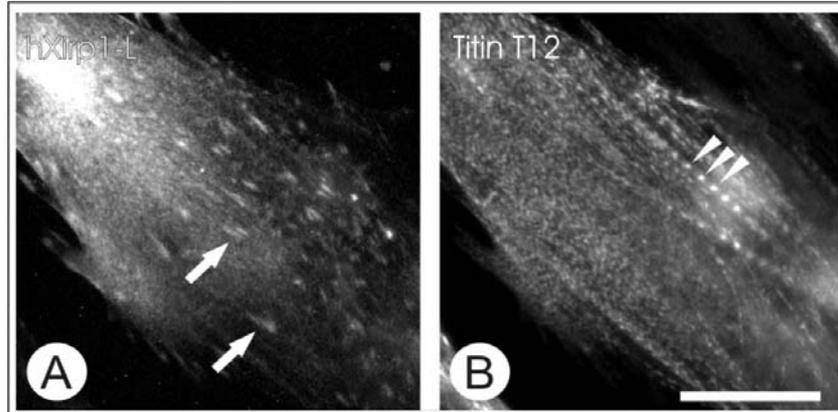


Abb. 28 Zelluläre Lokalisation von hXirp1-L in HSKM, Differenzierungstag 6

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transient transfizierter HSKM-Zellen im Differenzierungsstadium 6 (6T). Darstellung der Lokalisation des A) hXirp1-L (EGFP) und des B) Titinepitops T12 (Texasrot), das die Z-Scheiben markiert. hXirp1-L A) lokalisierte an den Fokalkontakten der transfizierten Zellen, die in diesem Differenzierungsstadium B) quergestreifte Myofibrillen enthielten. Eine Lokalisation von hXirp1-L innerhalb Myofibrillen konnte nicht beobachtet werden. Pfeil: Fokalkontakte, Pfeilspitze: Z-Scheiben, Maßstabsbalken, 20 μm

HXirp1-Y (AS: 1497–1843), das die Bindungsstelle für die muskelspezifische Isoform Filamin C enthielt, zeigte eine punktförmig bis perlschnurartige und strangartige Verteilung an Prämyofibrillen (Abb. 29). Für die Referenzfärbung wurde ein Antikörper gegen ein in Nähe der Z-Scheibe gelegenes Epitop (T12) von Titin gewählt. Die Lokalisationen von Titin T12 und hXirp1-Y überlagerten sich stellenweise. Eine wirkliche Kolo-kalisation wurde nicht beobachtet. Die Referenzfärbung gegen Titin wies stellenweise Kolo-kalisationen auf, die an anderen Stellen fehlten. Aggregatartige Lokalisationen von hXirp1-Y hatten keine Verstärkung des Titin-„Signals“ an diesen Stellen zur Folge. Eine Analyse dieser Strukturen über Konfokalmikroskopie wurde nicht durchgeführt, so daß keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob es sich bei den longitudinalen bis perlschnurartigen Strukturen um membran-nahe Areale handelt, die auf Vorläuferstrukturen der Costamere (PLAS) hinweisen würden. Die bloße Veränderung der Fokusebene im Fluoreszenzmikroskop erbrachte hierbei keinen Aufschluß, da die Zellen sehr dünn waren.

Die Ergebnisse der Transfektionsstudien gaben trotz der niedrigen Ausbeute einen klaren Hinweis darauf, daß hXirp1 in kultivierten Muskelzellen an den Fokalkontakten und Prämyofibrillen lokalisiert war.

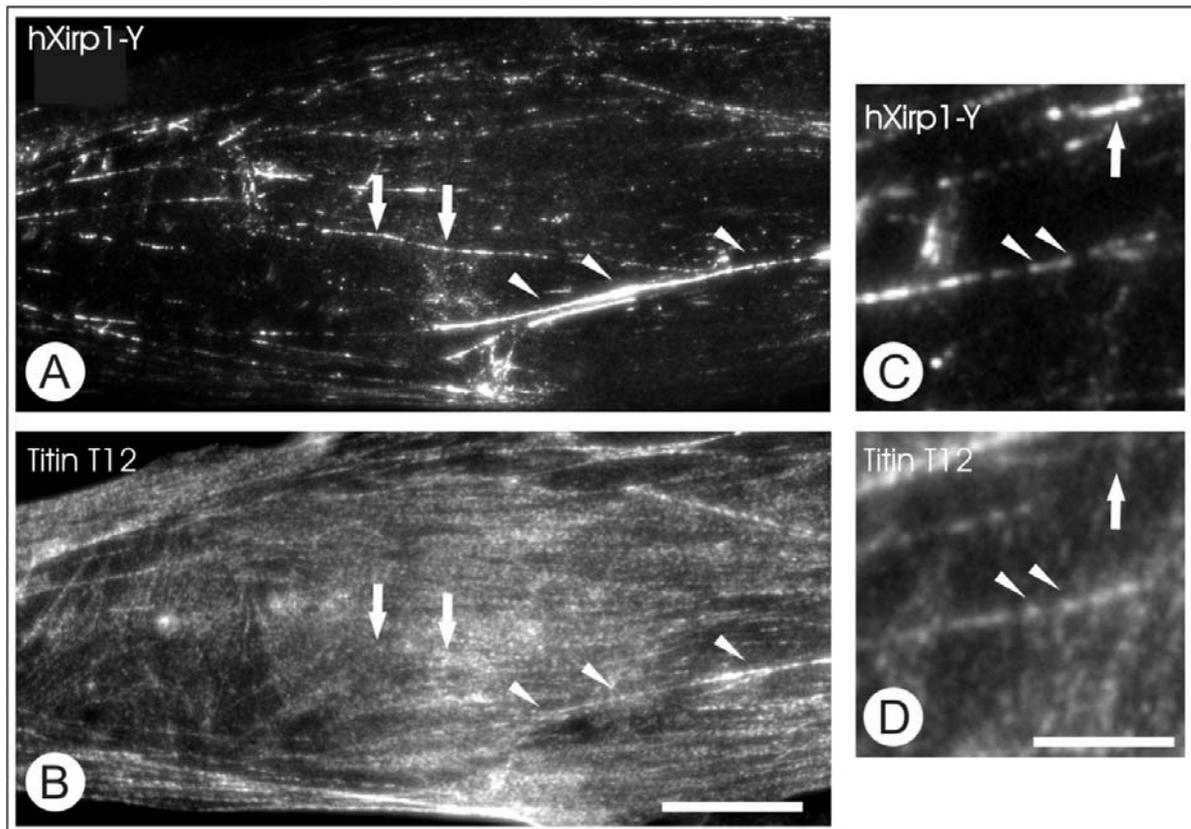


Abb. 29 Zelluläre Lokalisation von hXirp1-Y in HSKM , Differenzierungstag 6

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transient transfizierter HSKM-Zellen am Differenzierungstages 6 (6T). Darstellung der Lokalisation des hXirp1-Y (EGFP) in A), C) und des Titin Epitops T12 (Texasrot) in B), D), das die Z-Scheiben markierte. hXirp1-Y A) wies punktförmige bis strangartige Lokalisationen auf, die die Prämyofibrillen darstellten. Die Kolokalisationen mit T12 erscheinen zufällig. (C,D). Beachte daß hXirp1-Y, im Gegensatz zum B) Titin nicht alle Prämyofibrillen markierte. Pfeil: keine Kolokalisation mit Titin. Pfeilspitze: Kolokalisation mit Titin, Maßstabsbalken, 20 µm, in A) und B) und 5 µm in C) und D).

3.4.5 Transfektion von hXirp2-28rM Konstrukten in A7r5 -Zellen

In mit **hXirp2-28rM** transfizierten A7r5-Zellen lokalisierte das trunkierte hXirp2 an Fokalkontakten, Aktinfilamenten und Streßfasern. Die Abb. 30, A zeigt weiterhin einen Lamellipodialsaum, der Aktin-positiv war und kein hXirp2-28rM enthielt. Diese Beobachtung reiht sich in die Ergebnisse der Transfektionsstudien für hXirp1-rM ein. Mit hXirp2-28rM transfizierte PtK2-Zellen zeigten zwar gleiche Verteilungsmuster für dieses Konstrukt, jedoch konnte zusätzlich eine zytoplasmatisch diffuse Verteilung beobachtet werden. In den A7r5-Zellen war diese diffuse Lokalisation nicht ganz so stark ausgeprägt. Eine Kernlokalisierung des Konstrukt wurde nicht beobachtet.

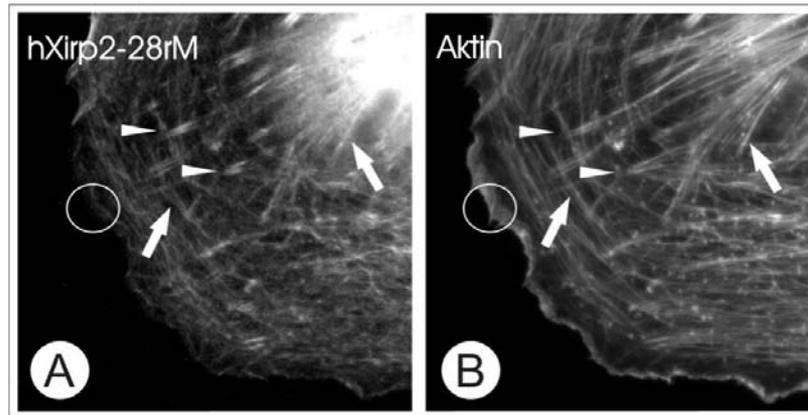


Abb. 30 **Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp2-28rM**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit hXirp2-28rM transient transfizierter A7r5-Zellen. Darstellung der Lokalisation von A) hXirp2-28rM (EGFP). In B) dargestelltes Aktinzytoskelett über Phalloidinanlagerung (CPITC). hXirp2-28rM lokalisiert an Fokalkontakten und Aktinfilamenten bzw. Streßfasern, keine Lokalisation am dynamischen Saum des Lamellipodiums (Einkreisung in A und B). Aktinfilament bzw. Streßfaser, Pfeilkopf: Fokalkontakt, Maßstabsbalken: 50 μm

3.5 Aktinbindung der repetitiven Motive von hXirp1 und hXirp2

Aufgrund der in den Transfektionsexperimenten (3.4) nachgewiesenen starken Assoziation zwischen hXirp1 und dem Aktinzytoskelett in einer Vielzahl verschiedener Säugerzelllinien lag es nahe zu vermuten, daß es sich bei hXirp1 (bzw. hXirp2) um ein F-Aktin bindendes Protein handelt und eine F-Aktinbindung möglicherweise über die repetitiven Motive vermittelt wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein F-Aktin-Kosedimentationsassay mit trunkierten hXirp1-Varianten durchgeführt, die eine unterschiedliche Anzahl an repetitiven Motiven besaßen.

Der Assay dient der Analyse F-Aktin-bindender und -bündelnder Aktivität eines Proteins oder seiner putativen Aktinbindungsdomäne(n). Die Grundlage bildet gereinigtes G-Aktin, das *in vitro* zu F-Aktin polymerisiert wird. Die F-Aktinfilamente werden durch Ultrazentrifugation vom nicht polymerisierten G-Aktin getrennt. Hierbei verbleibt das G-Aktin im Überstand, während die F-Aktinfilamente sedimentieren. Wird zu einem F-Aktinansatz ein zu untersuchendes Protein hinzugegeben, und besitzt dieses eine Affinität zu F-Aktin, wird es mit F-Aktin kosedimentieren. Für den Fall, daß keine Bindung zwischen F-Aktin und diesem Protein vorhanden ist, verbleibt dieses im Überstand. Bei einer Ultrazentrifugation ohne F-Aktin sollte das Protein selbstverständlich nicht sedimentieren. Überstand und Pellet werden entsprechend separiert und mittels SDS-PA-Gelelektrophorese analysiert. Die Methode erlaubt weiterhin, das molare Verhältnis zu ermitteln, in dem die Bindung zwischen dem zu untersuchenden Polypeptid und F-Aktin

absättigt ist. Hierzu wird im Konzentrationsbereich der Absättigung die Molarität des sedimentierten Proteins in Verhältnis zum sedimentierem F-Aktin gesetzt. Der Verlauf der Bindungsdaten für eine spezifische, konzentrationsabhängige, absättigbare Bindung weist in der graphischen Darstellung eine hyperbole Kurve auf. Unspezifische Bindungen würden eine lineare Funktion aufweisen. Es ist außerdem möglich, aus den Bindungsdaten die Dissoziationskonstante K_d zu ermitteln, die angibt mit welcher Affinität die Bindung erfolgt.

Ist ein Protein in der Lage F-Aktinfilamente zu bündeln, so können diese Bündel inklusive des bindenden/bündelnden Proteins durch eine niedertourige Zentrifugation (etwa 10.000 x g) von F-Aktinfilamenten getrennt werden. Weiterhin wird eine Erhöhung der Konzentration an Protein mit einer Zunahme an sedimentierbarem Aktin korrelieren. Dies bedeutet eine Zunahme der sedimentierten Aktinbündel bei gleichzeitiger Abnahme der im Überstand verbleibenden Aktinfilamente.

Das Aktin für den Assay wurde aus einer Acetonpuderpräparation des Brustmuskels von *G. gallus* (Huhn) isoliert und in den Versuchen in einer Konzentration von 5 μM eingesetzt.

Die zu überprüfenden rekombinanten hXirp Polypeptide wurden bakteriell exprimiert und über ihre Hexahistidin-Tags mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wurde über den BCA-Assay ermittelt.

Es wurden vier hXirp1-Polypeptide, auf ihre F-Aktinbindung überprüft. Die hXirp1-Polypeptide enthielten zwei, drei und sechs sowie 18 repetitive Motive. Das Konstrukt hXirp1-3rM (3 Motive) umfaßte die repetitiven Motive von 10 bis 12, deren Motiv 11 (in dieser Arbeit) als degeneriert klassifiziert wird, zunächst aber bei Herstellung als lange Verbindungssequenz betrachtet wurde. Das Konstrukt hXirp1-2rM (2 Motive) beinhaltete die repetitiven Motive 3 und 4, die eine relativ kurze Verbindungssequenz besaßen. Das Konstrukt hXirp1-6rM repräsentierte mit den Motiven 1 - 6 etwa ein Drittel der repetitiven Motive. Ein weiteres Konstrukt hXirp1-18rM umfaßte alle 18 repetitiven Motive von hXirp1. Das hXirp2-28rM Konstrukt, das 28 der 36 repetitiven Motive enthielt, wurde ebenfalls auf F-Aktinbindung getestet. Parallel zu diesem *in vitro* Assay wurden die Konstrukte in Transfektionstudien in A7r5-Glattmuskelzellen auf ihre zelluläre Lokalisation untersucht.

3.5.1 Aufreinigung und Darstellung der verwendeten Motiv-Konstrukte

Das Kontrollexperiment zur Überprüfung der zu untersuchenden Polypeptide zeigt Abb. 31. Die bakteriell exprimierten und aufgereinigten hXirp-Polypeptide wurden nach einer Ultrazentrifugation bei 100.000 x g in Polymerisationspuffer in Überstand und Pellet separiert. Die Abb. veranschaulicht, daß die zu untersuchenden Polypeptide nur zu einem sehr geringen Anteil von sich aus sedimentierten. Verunreinigungen in den Präparationen der Polypeptide, die z.B. bakterielle Proteine oder proteolytische Fragmente der hXirp-Polypeptide darstellten wurden aufgrund der zumeist geringen Mengen in den eingesetzten Molaritäten nicht herausgerechnet.

Die aufgereinigten hXirp-Polypeptide wiesen aufgrund ihrer Laufeigenschaften im SDS-PA-Gel eine scheinbar höhere molekulare Masse auf als berechnet wurde. Diese Verschiebung soll zum einen im Zusammenhang mit den repetitiven Motiven und deren Anzahl stehen (Wang et al., 1999). Die C-terminale Fusionierung der Polypeptide mit dem Hexahistidin-Tag (0.84 kDa) wurde miteingerechnet.

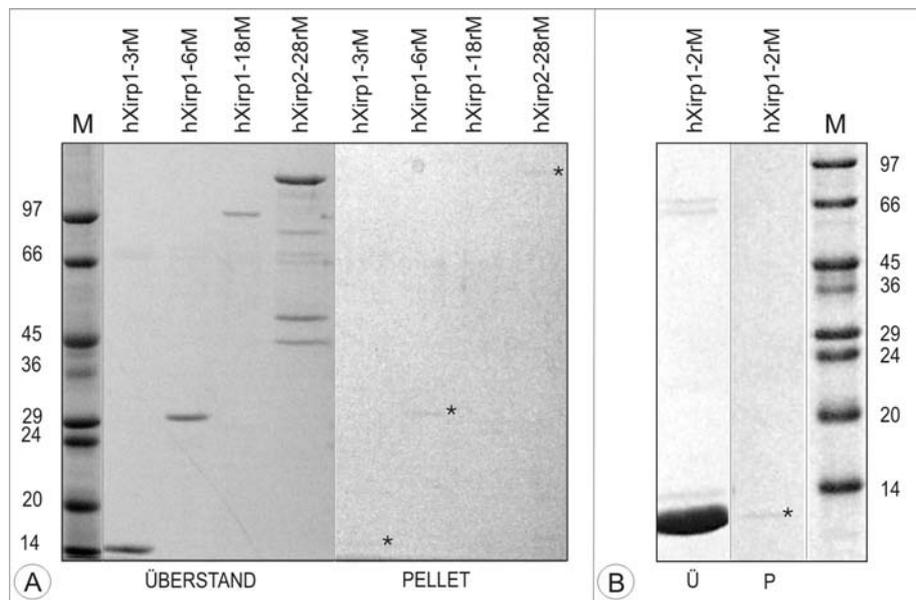


Abb. 31 Darstellung der aufgereinigten hXirp-Polypeptide

Nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und Ultrazentrifugation bei 100.000 x g, wiesen die rekombinanten Polypeptide einen marginalen Anteil an sedimentiertem Protein auf (*). A) 12 % SDS-PAGE, B) 8% SDS-PAGE. Der Hauptanteil der Polypeptide verblieb während der Ultrazentrifugation von 100.000 x g im Überstand (S) und wurde nicht pelletiert (P) A) hXirp1-3rM: 11 kDa, 8 μ M, hXirp1-6rM: 27 kDa, 2,5 μ M, hXirp1-18rM: 77 kDa, 1 μ M, hXirp2-28rM: 253 kDa, 5 μ M; B) hXirp1-2rM: 7 kDa, 5 μ M. Weiterhin waren Banden zu erkennen, die Verunreinigungen bzw. proteolytische Fragmente darstellten. Eingetragene Markerbanden stammten aus den entsprechenden Gelen. Die Massen der Polypeptide bzw. Proteine sind in kDa angegeben.

3.5.2 F-Aktinbindung von 18 repetitiven Motiven von hXirp1

Die Abb. 32 zeigt in A und B die analytischen SDS-PA-Gele der Proben der Überstand- bzw. Pelletfraktionen des Kosedimentationsassay für hXirp1-18rM. Beide Gele zeigen deutlich, daß eine Erhöhung der Gesamtkonzentration ab 2,5 μM für hXirp1-18rM im Versuchsansatz keine weitere Erhöhung an sedimentiertem hXirp1-18rM (Abb. 32, B) bewirkte. Die Erhöhung der Gesamtkonzentration zeigte sich allein Anstieg des im Überstand befindlichen hXirp1-18rM (Abb. 32, A) und deutete auf die Absättigung des F-Aktins mit dem rekombinanten Polypeptid hin.

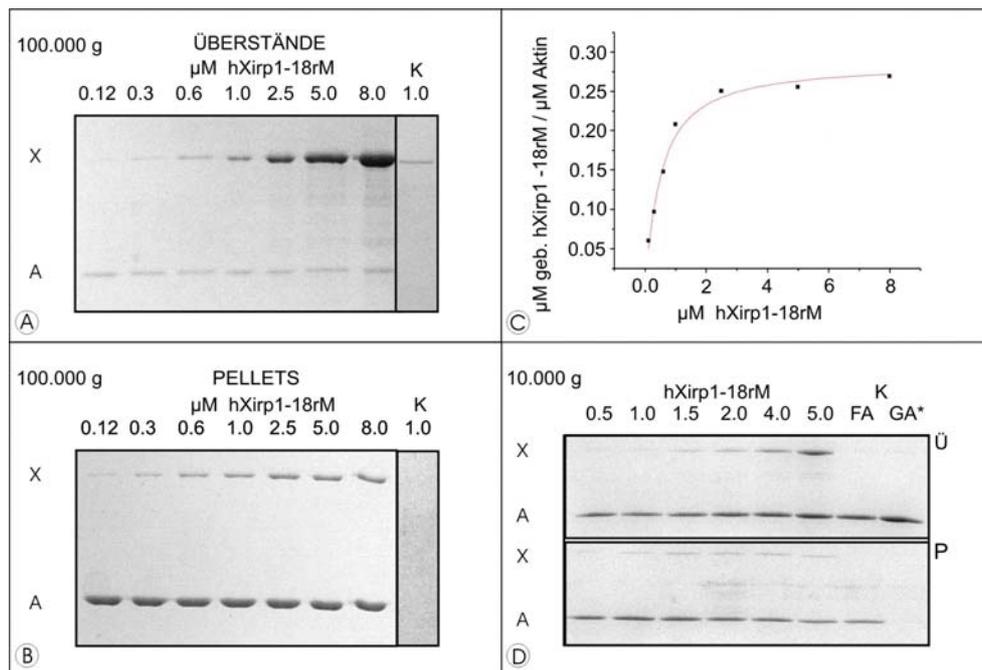


Abb. 32 Aktinkosedimentationsassay mit hXirp1-18rM

In A) und B) sind die analytischen SDS-PA-Gele der Fraktionen für Überstand (A) und Pellet (B) nach Ultrazentrifugation bei 100.000 x g zur Überprüfung der F-Aktinbindung dargestellt. In D) sind die Fraktionen der Überstands und Pellets nach Ultrazentrifugation bei 10.000 x g zur Überprüfung der F-Aktinbündelung dargestellt. Angegeben sind die jeweils eingesetzten Gesamtkonzentrationen von hXirp1-18rM bei konstanter Konzentration von 5 μM an Aktin. Die Gele in A) und B) zeigen, daß hXirp1-18rM F-Aktin sättigend (ab 2,5 μM) bindet. Kontrollen in A) und B) zeigen, daß hXirp1-18rM nicht ohne F-Aktinbindung sedimentierte. Graphische Darstellung der Sedimentationsdaten in C) Abzisse: eingesetzte Konzentration an hXirp1-18rM, Ordinate: Quotient der Pelletdaten aus μM gebundenem hXirp1-18rM pro μM Aktin. Die Gele in D) zeigen, daß hXirp1-18rM nicht in der Lage war, F-Aktin zu bündeln. Kontrolle in D) zeigt, daß ein Anteil an präpariertem und polymerisiertem F-Aktin als F-Aktinbündel sedimentierbar war. Die Kontrolle der G-Aktinpräparation (GA*) wurde bei 100.000 g zentrifugiert und wies kein F-Aktin auf. Erläuterungen im Text. A: Proteinbande des Aktins, X: Proteinbande des hXirp1-18rM, K: Kontrolle, FA: F-Aktin, GA: G-Aktin, Ü: Überstand, P: Pellet

Die Ermittlung der absoluten Molaritäten zwischen Aktin und hXirp1-18rM in der pelletierten Fraktion erfolgte über interne Standards und einer Verhältnisrechnung der densitometrischen Werte zwischen Aktin und hXirp1-18rM. Eine graphische Darstellung der Bindungsdaten (Abb. 32, C) wies eine hyperbole Funktion auf, wie sie für spezifische

Bindungsaffinitäten charakteristisch ist. Die Berechnungen erfolgten unter Berücksichtigung der nichtlinearen Kurvenanpassung nach dem Hill-Modell und ergaben, daß ca. 0,25 bis 0,28 μM hXirp1-18rM 1 μM Aktin sättigend banden. Dies entsprach somit in etwa einem molaren Verhältnis zwischen hXirp1-18rM und Aktin von 1 : 4, womit in etwa 4 Motive ein Aktinmonomer binden würden. Die nichtlineare Kurvenanpassung wies auf keine Kooperativität ($n=1$) hin. Die Bindungseigenschaften von hXirp1-18rM wurden also nicht durch schon am F-Aktin gebundene hXirp1-18rM beeinflusst.

Zu beachten ist, daß auch in den Ansätzen unterhalb der 2,5 μM Gesamtkonzentration (z.B. 0,6 μM), hXirp1-18rM im Überstand nachzuweisen war (Abb. 32, A) und nicht an F-Aktin band, obwohl die Sättigung hier noch nicht erreicht war (Abb. 32, B, C).

Abb. 32, D zeigt die Ergebnisse des Assays zur Überprüfung der Bündelungsaktivität von hXirp1-18rM. Wie in den Ansätzen mit hXirp1-18rM und der Kontrolle des polymerisierten F-Aktins (FA) zu erkennen ist, sedimentierte ein gewisser Anteil an F-Aktin. Trotz allem kann eine Bündelung von F-Aktinfilamenten durch hXirp1-18rM ausgeschlossen werden, da eine Erhöhung der Gesamtkonzentration an hXirp1-18rM keine Erhöhung an sedimentiertem Aktin bedingte. In der G-Aktinpräparation fand sich desweiteren kein F-Aktin.

Transfektionsstudien (Abb. 33) mit diesem Konstrukt zeigten, daß das exprimierte hXirp1-18rM in A7r5 oder PtK2-Zellen an Streßfasern, Aktinfilamenten und Fokalkontakten lokalisierte. Die Abb. 33 gibt hierbei Aufnahmen von lebenden und fixierten Zellen wieder. Auch hier wurden keine Bündelungen an Aktinfilamenten oder Streßfasern beobachtet. Die Varianzen der Lokalisationen, wie sie für die hXirp1-rM unter 3.4.1 beschrieben wurden, ließen sich auch hier finden.

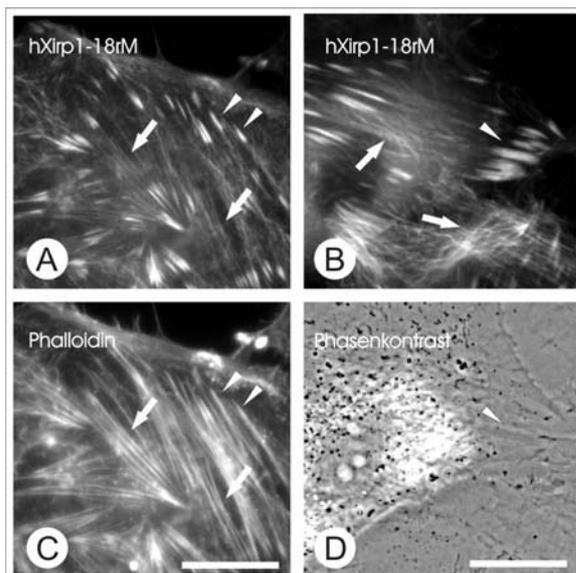


Abb. 33 **Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-18rM**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A7r5-Zellen nach transienter Transfektion mit hXirp1-18rM. Abbildungen A) und C) zeigen Aufnahmen fixierter, B) und D) lebender Zellen. Darstellung des transfizierten Konstruktes (EGFP) in A) und B) und Darstellung des Aktinzytoskeletts C) durch Phalloidinanlagerung (CPITC). In D) Phasenkontrastaufnahme zu B). A, B und C zeigt Assoziationen von hXirp1-18rM am Aktinzytoskelett und Fokalkontakten. Pfeil: Streßfaser, Aktinfilament, Pfeilkopf: Fokalkontakt, Maßstabsbalken: 20 μm

3.5.3 F-Aktinbindung von sechs repetitiven Motiven von hXirp1

Abb. 34 zeigt in A und B die SDS-PA-Gele für die Proben der Überstand- bzw. Pelletfraktionen des Kosedimentationsassay für hXirp1-6rM. Die Gele zeigen, daß ab einer Gesamtkonzentration von 5 μM hXirp1-6rM keine Zunahme an sedimentiertem Polypeptid (Abb. 34, B) mehr erfolgte. Die Erhöhung der Gesamtkonzentration von 5 μM auf 8 μM zeigte sich allein in der Zunahme des im Überstand befindlichen hXirp1-6rM (Abb. 34, A).

Die Ermittlung der absoluten Molaritäten zwischen hXirp1-6rM und Aktin erfolgte über interne Standards und Verhältnisrechnungen der densitometrischen Werte zwischen hXirp1-6rM und Aktin unter Berücksichtigung der nichtlinearen Kurvenanpassung nach dem Hill-Modell. Die Berechnungen ergaben, daß ca. 0,45 μM hXirp1-6rM fähig waren, 1 μM Aktin sättigend zu binden (Abb. 34, C). Dies entsprach somit in etwa einem molaren Verhältnis von 1:2 für hXirp1-6rM zu Aktin bzw. drei Motiven pro Aktinmonomer. Die graphische Darstellung der Ergebnisse wies wiederum eine hyperbole Funktion auf. Eine Kooperativität war auch hier nicht vorhanden.

Weiterhin ist zu beachten, daß auch in den Ansätzen unterhalb 5 μM (z.B. 1,0 μM), hXirp1-6rM im Überstand vorhanden war (Abb. 34, A) und nicht an F-Aktin band, obwohl die Sättigungskonzentration hier noch nicht erreicht worden war (Abb. 34, C, D).

Eine Schwierigkeit bei diesem Ergebnis stellte die Zunahme des Aktins im Überstand bei 8 μM dar. Der Aktinwert im Pellet nahm dementsprechend ab. Bei der Ermittlung der absoluten Molaritäten unter

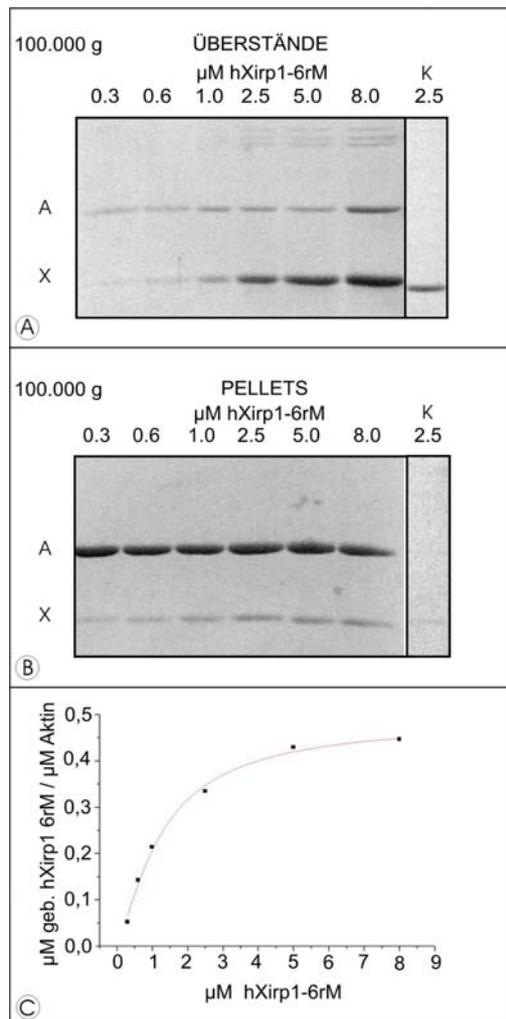


Abb. 34 Aktinkosedimentationsassay mit hXirp1-6rM

In A) und B) sind die analytischen SDS-PA-Gele der Fraktionen für (A) Überstand und (B) Pellet nach Ultrazentrifugation bei 100.000 x g zur Überprüfung der F-Aktinbindung dargestellt. Angegeben sind die jeweils eingesetzten Gesamtkonzentrationen von hXirp1-6rM bei konstanter Konzentration von 5 μM an Aktin. Gele in A) und B) zeigen, daß hXirp1-6rM F-Aktin sättigend band (ab 5 μM). Kontrollen in A) und B) zeigen, daß hXirp1-6rM nicht ohne F-Aktinbindung sedimentierte. Graphische Darstellung der Sedimentationsdaten in C), Abzisse: eingesetzte Konzentration an hXirp1-6rM, Ordinate: Quotient der Pelletdaten aus μM gebundenem hXirp1-6rM pro μM Aktin. Erläuterungen im Text. A: Proteinbande des Aktins, X: Proteinbande des Xirp1-

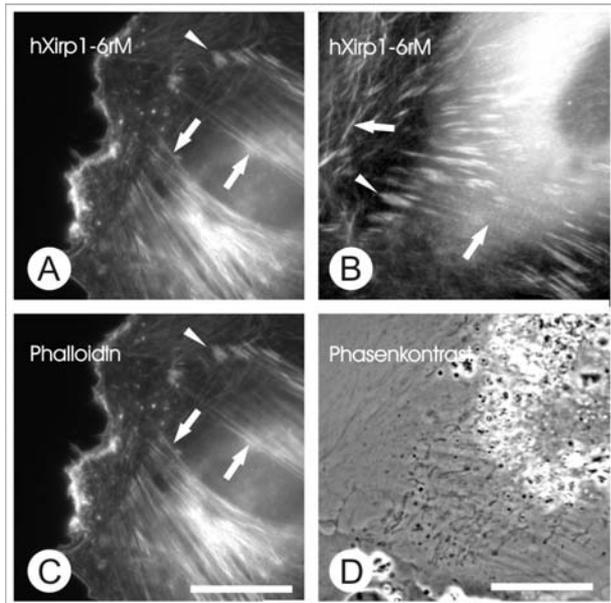


Abb. 35 **Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-6rM**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von A7r5-Zellen nach transienter Transfektion mit hXirp1-6rM. Abbildungen. A) und C) zeigen Aufnahmen fixierter, B) und D) lebender Zellen. Darstellung des transfizierten Konstruktes (EGFP) in A) und B) und Darstellung des Aktinzytoskeletts C) durch Phalloidinanlagerung (CPITC). In D) Phasenkontrastaufnahme zu B). A), B) zeigen Assoziation von hXirp1-6rM am Aktinzytoskelett und Fokalkontakten. Pfeil: Streßfaser, Aktinfilament, Pfeilkopf: Fokalkontakt, Maßstabsbalken: 20 μm .

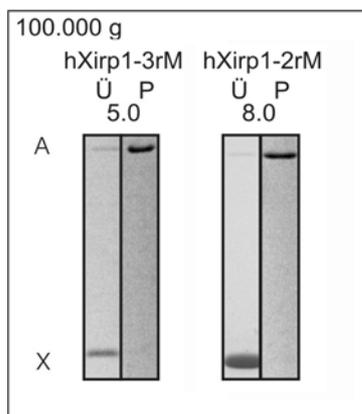
Zuhilfenahme von internen Standards und Verhältnisrechnung zwischen gebundenem hXirp1-6rM und dem im Pellet vorhandenen Aktin rechnete sich dies allerdings wieder heraus. Eine Bindung des Konstruktes an G-Aktin wurde nicht beobachtet.

In den mit hXirp1-6rM durchgeführten Transfektionstudien in A7r5 und PtK2-Zellen lokalisierte das exprimierte Konstrukt an Streßfasern, Aktinfilamenten und den Fokalkontakten. Die Aufnahmen der Abb. 35 zeigen hierbei lebende und fixierte A7r5-Zellen, die mit hXirp1-6rM transfiziert wurden. In PtK2-Zellen wurden analoge Beobachtungen gemacht.

3.5.4 F-Aktinbindung von drei bzw. zwei repetitiven Motiven von hXirp1

Wie Abb. 36 zeigt, wurde mit diesem Assay keine Aktinbindung für hXirp1-3rM bzw. hXirp1-2rM nachgewiesen. Die hXirp1-Polypeptide verblieben im Überstand.

Interessanterweise ließen sich mit diesen Konstrukte in den Transfektionsstudien (Abb. 37 und Abb. 38) folgende Beobachtungen machen: Ein Großteil des exprimierten hXirp1-3rM



und -2rM lag in den A7r5-Zellen zytoplasmatisch diffus und nukleär vor. Allerdings wiesen alle transfizierten A7r5-Zellen schwache, aber erkennbare Lokalisationen der Polypeptide an Fokalkontakten und zu geringerem Anteil an Streßfasern auf.

Abb. 36 **Aktinkosedimentationsassay mit hXirp1-2rM und -3rM**

Die dargestellten Gelausschnitte zeigen, daß eine F-Aktinbindung über hXirp1-3rM und -2rM ausgeschlossen werden kann, da keine Sedimentierung der Polypeptide mit F-Aktin nachzuweisen war. A: Proteinbande des Aktin, X: Proteinbande der hXirp1-Polypeptide, K: Kontrolle, Ü: Überstand, P: Pellet

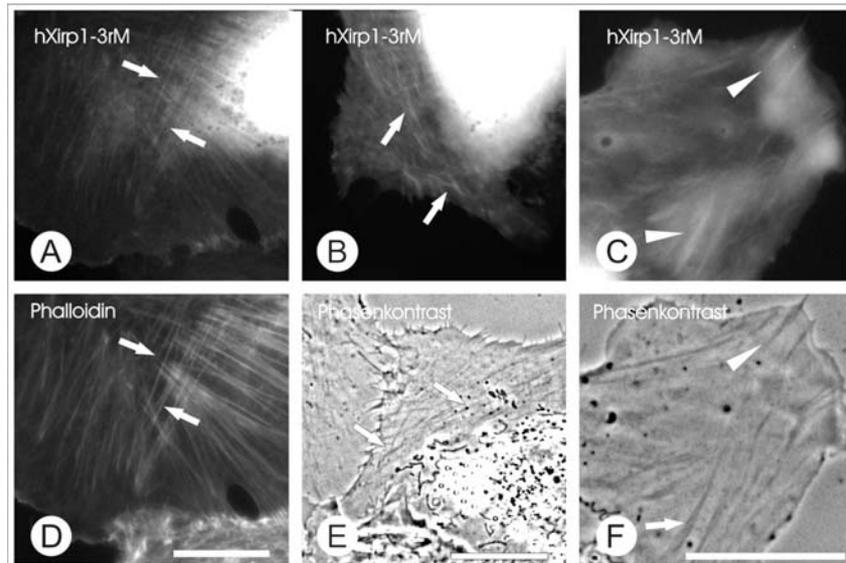


Abb. 37 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-3rM

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von A7r5-Zellen nach transienter Transfektion mit hXirp1-3rM mit A), B) und C) Darstellung des transfizierten Konstruktes (EGFP), und D) Darstellung des Aktinzytoskeletts durch Phalloidinanlagerung (CPITC). In E) und F) Phasenkontrastaufnahmen. A) und D) zeigen Aufnahmen fixierter Zellen. B), C) und E), F) zeigen Aufnahmen lebender Zellen. Zu beachten ist die Lokalisation von hXirp1-3rM an Aktinzytoskelettstrukturen, wie Aktinfilamenten und Fokalkontakten. Die Zelle in A) und B) weist klare Lokalisation von hXirp1-3rM an Aktinfilamenten auf. Lokalisation an Fokalkontaktstrukturen in C) und F). Zu beachten sind nukleäre Lokalisation. Pfeil: Aktinfilament, Strebfaser, Pfeilkopf: Fokalkontakt, Maßstabsbalken: 20 μm .

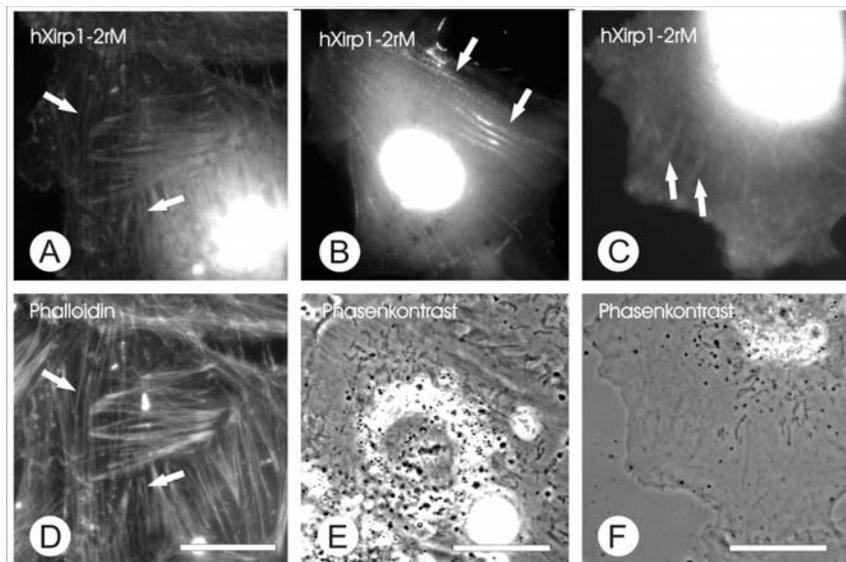


Abb. 38 Transfektion von A7r5-Zellen mit hXirp1-2rM

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von A7r5-Zellen nach transienter Transfektion mit hXirp1-2rM mit A), B) und C) Darstellung des transfizierten Konstruktes (EGFP), und D) Darstellung des Aktinzytoskeletts durch Phalloidinanlagerung (CPITC). In E) und F) Phasenkontrastaufnahmen. A) und D) zeigen Aufnahmen fixierter Zellen. B), C) und E), F) zeigen Aufnahmen lebender Zellen. Zu beachten ist die Lokalisation von hXirp1-2rM an Aktinzytoskelettstrukturen. Die in B) gezeigte Zelle weist eine klare Lokalisation von hXirp1-2rM mit „dense body“-artiger Verteilung entlang der Strebfasern. Zu beachten sind nukleäre Lokalisation. Pfeil: Strebfaser, Aktinfilament, Maßstabsbalken: 20 μm .

Diese Beobachtung wurde in fixierten, wie auch lebenden Zellen gemacht. In transfizierten, lebenden PtK2-Zellen zeigten sich diese Aktin-assoziierten Lokalisationen jedoch nicht und das exprimierte hXirp1-3rM bzw. -2rM lag nur nukleär und zytoplasmatisch diffus vor (nicht gezeigt).

3.5.5 F-Aktinbindung von 28 repetitiven Motiven von hXirp2

Die Abb. 39 zeigt das analytische SDS-PA-Gel der Proben der Überstand- bzw. Pelletfraktionen für den Kosedimentationsassay von hXirp2-28rM. Auch für diese Motive zeigte sich, wie es aus der hohen Homologie mit hXirp1 zu erwarten war, eine F-Aktinbindung. Die Präparation des hXirp2-28rM (Abb. 31 S.81) wies starke, höher molekulare Verunreinigungen im Bereich von 45 bis 97 kDa auf. Da proteolytische Fragmente die repetitiven Motive beinhalten und somit auch kosedimentieren sollten, dies aber nicht der Fall war, handelte es sich hierbei wahrscheinlich um bakterielle Proteine. Die kalkulierten Konzentrationen für hXirp2-28rM berücksichtigten nicht die Verunreinigungen, die dadurch die absolute Konzentration für hXirp2-28rM stark herabsetzten. Die in der Abbildung angegebenen Molaritäten entsprechen somit nur der eingesetzten Gesamtkonzentration an Protein. Die Auswertung der densitometrischen Geldaten wies infolge dessen keine Sättigung des F-Aktins durch hXirp2-28 auf.

Transfektionsstudien mit diesem Konstrukt wurden unter 3.4.5 beschrieben. Das exprimierte Konstrukt lokalisierte an Streßfasern, Aktinfilamenten und Fokalkontakten.

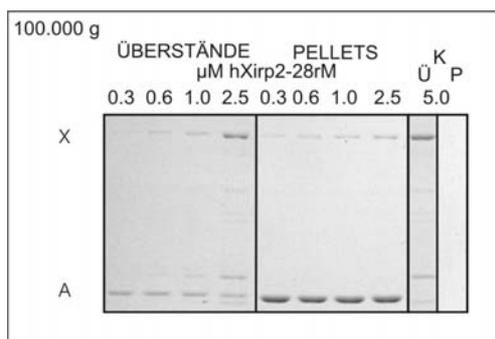


Abb. 39 Aktinkosedimentationsassay mit hXirp2-28rM

Die Abbildung zeigt die analytischen SDS-PA-Gele des Aktin-Kosedimentationsassay für hXirp2-28rM nach Ultrazentrifugation bei 100.000 x g und Separierung des Überstands und Pellets. Die Kopfzeilen bezeichnen die jeweils eingesetzte Gesamtkonzentration von hXirp2-28rM bei konstanter Konzentration von 5 µM an Aktin. Kontrolle K zeigt, daß hXirp2-28rM nicht ohne F-Aktinbindung sedimentierte. hXirp2-28rM kosedimentierte mit F-Aktin. A: Proteinbande des Aktins, X: Proteinbande von hXirp2-28rM, K: Kontrolle, Ü: Überstand, P: Pellet

3.5.6 Stabilisierung von Aktinfilamenten durch hXirp

Die Transfektions- (3.4) sowie die F-Aktin-Kosedimentationsdaten (3.5) zeigten, daß es sich bei hXirp1 bzw. hXirp2 nicht nur um ein Aktinzytoskelett-assoziiertes, sondern um ein an F-Aktin bindendes Protein handelt. Im nachfolgenden Experiment wurde untersucht, ob hXirp1 stabilisierend auf das F-Aktinzytoskelett der A7r5-Zellen wirkt.

Die räumliche wie auch zeitliche Organisation des Aktinzytoskeletts unterliegt einem ständigen Umbauprozess, an dem eine Vielzahl F- und G- Aktin-bindender Proteine involviert ist. Diese Proteine können der Polymerisation, Stabilisierung, Bündelung oder Verzweigung von F-Aktin dienen. Bei einer Depolymerisation wirken Aktin bindende Proteine durch Zerschneidung der Aktinfilamente oder der Verhinderung einer Polymerisation. Eine Regulationsmöglichkeit für die Polymerisation oder Depolymerisation stellt die Verfügbarkeit des G-Aktins dar. Ist in einer Zelle oder in einer bestimmten Region in der Zelle kein G-Aktin für die Polymerisation verfügbar, so überwiegen die depolymerisierenden Prozesse und das Aktinzytoskelett wird abgebaut. Dementsprechend sorgt ein Vorrat an polymerisationsfähigem G-Aktin für ein Überwiegen der Polymerisation (Pollard et al., 2000).

Das aus dem Schwamm *Latruncula magnifica* isolierte Gift Latrunculin A (Lat-A) bindet G-Aktin an ähnlicher Position wie Thymosin β 4 mit einer Stöchiometrie von 1:1, verhindert den Nukleotidaustausch und somit die Aktinpolymerisation *in vivo* wie auch *in vitro* (Yarmola et al., 2000). Wird Latrunculin A auf kultivierte Zellen appliziert, so erfolgt eine rasche Depolymerisation der Aktinzytoskelettelemente. Der Zeitraum des kompletten Abbaus des F-Aktinzytoskeletts ist abhängig von der eingesetzten Molarität des Giftes (Cai et al., 2000). So kann bei hoher Molarität an Lat-A das Aktinzytoskelett innerhalb von fünf Minuten vollständig depolymerisiert und die Zelle abgerundet sein, ohne sich jedoch vom Untergrund zu lösen. Die Geschwindigkeit des Abbauprozesses gibt die hohe Dynamik des Aktinzytoskeletts wieder. Die Effekte von Lat-A sind reversibel, so daß in kultivierten humanen Trabekularzellen ein Wiederaufbau des Aktinzytoskeletts schon 2 bis 24 Stunden nach Absetzen des Toxins gezeigt werden konnte (Cai et al., 2000). Der Prozeß des ständigen Umbaus, der sogenannte Tretmühlenmechanismus, wird durch Lat-A also nur indirekt durch Beschlagnehmung des G-Aktins be- bzw. verhindert. Wirkt ein Protein stabilisierend auf das F-Aktinfilamentsystem, so würde dies eine Verzögerung der Depolymerisation bedeuten. In beiden Fällen werden Zellen, die dieses Protein überexprimieren in der Lage sein, der Lat-A

induzierten Depolymerisation entgegenzuwirken und ein besser erhaltenes Aktinzytoskelett besitzen, als untransfizierte Zellen.

Die Vermittlung der Bindung zwischen hXirp und F-Aktin erfolgt, wie in 3.5 gezeigt, primär über die repetitiven Motive des Proteins. Die Glattmuskelzellen A7r5 wurden mit hXirp1-S transfiziert, um einen möglichst 'nativen Zustand' der F-Aktin-hXirp1 Interaktion darzustellen. Hierbei ist natürlich zu beachten, daß die kurze Isoform hXirp1-S N-terminal zwei putative Prolinmotive sowie C-terminal eine mögliche GTP- oder ATP-Bindungsstelle und ein weiteres Prolinmotiv besitzt. Die transfizierten A7r5-Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion mit 0,5 μ M Lat-A behandelt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und das Aktinzytoskelett bzw. die Fokalkontakte detektiert.

Vor der Lat-A-Applikation (Zeitpunkt 0 min, Abb. 40) zeigten die A7r5-Zellen das für sie typische Aktinzytoskelett mit Streßfasern und gewundenen F-Aktinfilamenten sowie Fokal- und Zell-Zellkontakten (Abb. 40, A, B). Das exprimierte hXirp1-S lokalisierte (wie schon unter 4.5.1 beschrieben) an Fokalkontakten und F-Aktinfilamenten (Abb. 40, C, D, E).

Schon 5 Minuten nach Beginn der Lat-A-Applikation wiesen die nicht transfizierten A7r5-Zellen (Abb. 40, F, G) kleinere bis größere Läsionen im Aktinzytoskelett (bzw. den Streßfasern) auf. Die gewundenen Aktinfilamente wurden in keiner der Zellen mehr beobachtet. Einige Zellen waren schon zu diesem Zeitpunkt komplett vom F-Aktin „befreit“. In den ausgeräumten Zellen befanden sich verbliebene Streßfasern in der Zellperipherie und F-Aktin-Überreste an den Fokalkontakten. Die Verteilung der Fokalkontakte schien zu diesem Zeitpunkt in den meisten Zellen von der Depolymerisation nicht merklich beeinflusst. Es fanden sich allerdings auch Zellen, in denen die Enden der durch Lat-A geschädigten Streßfasern keine Vinculin positiven Fokalkontakte mehr besaßen (Abb. 40, G). Die Größe der vorhandenen Fokalkontakte hatte gegenüber denen der unbehandelten Zellen in ihrer Größe abgenommen. In den transfizierten A7r5-Zellen lokalisierte hXirp1-S an den Streßfasern und den Fokalkontakten. Die Form der Fokalkontakte in den transfizierten Zellen erschien elongiert und vergrößert. A7r5-Zellen, die untransfiziert ein ähnlich gut erhaltenes Aktinzytoskelett aufwiesen, besaßen allerdings ebenfalls vergrößerte Fokalkontakte, wie sie für die transfizierten Zellen beobachtet wurden.

Nach 10 Minuten Lat-A-Behandlung zeigten die untransfizierten Zellen (Abb. 40, L, M) zum Großteil ein stark von der Depolymerisation angegriffenes Aktinzytoskelett mit großflächigen Läsionen und kommaförmigen F-Aktin-Überresten an den Fokalkontakten. Die Verteilung der Fokalkontakte war auch hier nicht merklich verändert. Die Größe der Fokalkontakte war geringer als die der unbehandelten Zellen. Einige untransfizierte Zellen

waren bis auf periphere Streßfasern und den Fokalkontakt-assoziierten F-Aktin komplett ausgeräumt. Die mit hXirp1-S transfizierten Zellen besaßen ein gut erhaltenes Aktinzytoskelett mit höchstens kleineren Läsionen (Abb. 40, N, O, P). Eine verstärkte Anfärbung der Streßfasern (über CPITC-Phalloidin) in einigen der Zellen wies möglicherweise auf eine erhöhte Bündelungen der Streßfasern hin. Die Fokalkontakte dieser Zellen wiesen auch hier eine Vergrößerung und Elongation auf.

Nach 15 min Lat-A Applikation war der Zellverband der nicht transfizierten Zellen beträchtlich gelockert (Abb. 40, Q, R). Die Zell-Zell-Kontakte der Zellen waren aufgegeben und das vorhandene F-Aktin-Zytoskelett bis auf periphere Streßfasern weitestgehend ausgeräumt worden. An den in ihrer Verteilung kaum beeinträchtigten Fokalkontakten fanden sich weiterhin F-Aktinreste. Die Größe der vorhandenen Fokalkontakte war im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen verringert. Die mit hXirp1-S transfizierten A7r5-Zellen zeigten nach 15 min eine zunehmende Heterogenität im Erhalt ihres Aktinzytoskeletts. Es wurden Zellen mit gut erhaltenem bis ausgeräumtem F-Aktinsystem beobachtet. Die ausgeräumten Zellen besaßen zumeist eine schwache Expression des hXirp1-S. Die Mehrheit der transfizierten Zellen zeigten großflächige Läsionen in ihrem Streßfasersystem (Abb. 40, S, T, U).

Im weiteren Verlauf von 20 bis 50 min (nicht gezeigt) nahm die Heterogenität des Erhalts bzw. Abbaus des Aktinzytoskeletts in den transfizierten Zellen zu.

Die Ergebnisse dieses Experimentes belegen, daß in A7r5-Zellen ektopisch exprimiertes hXirp1-S in der Lage ist, die durch Latrunculin A induzierte Depolymerisation des Aktinzytoskeletts deutlich zu verzögern.

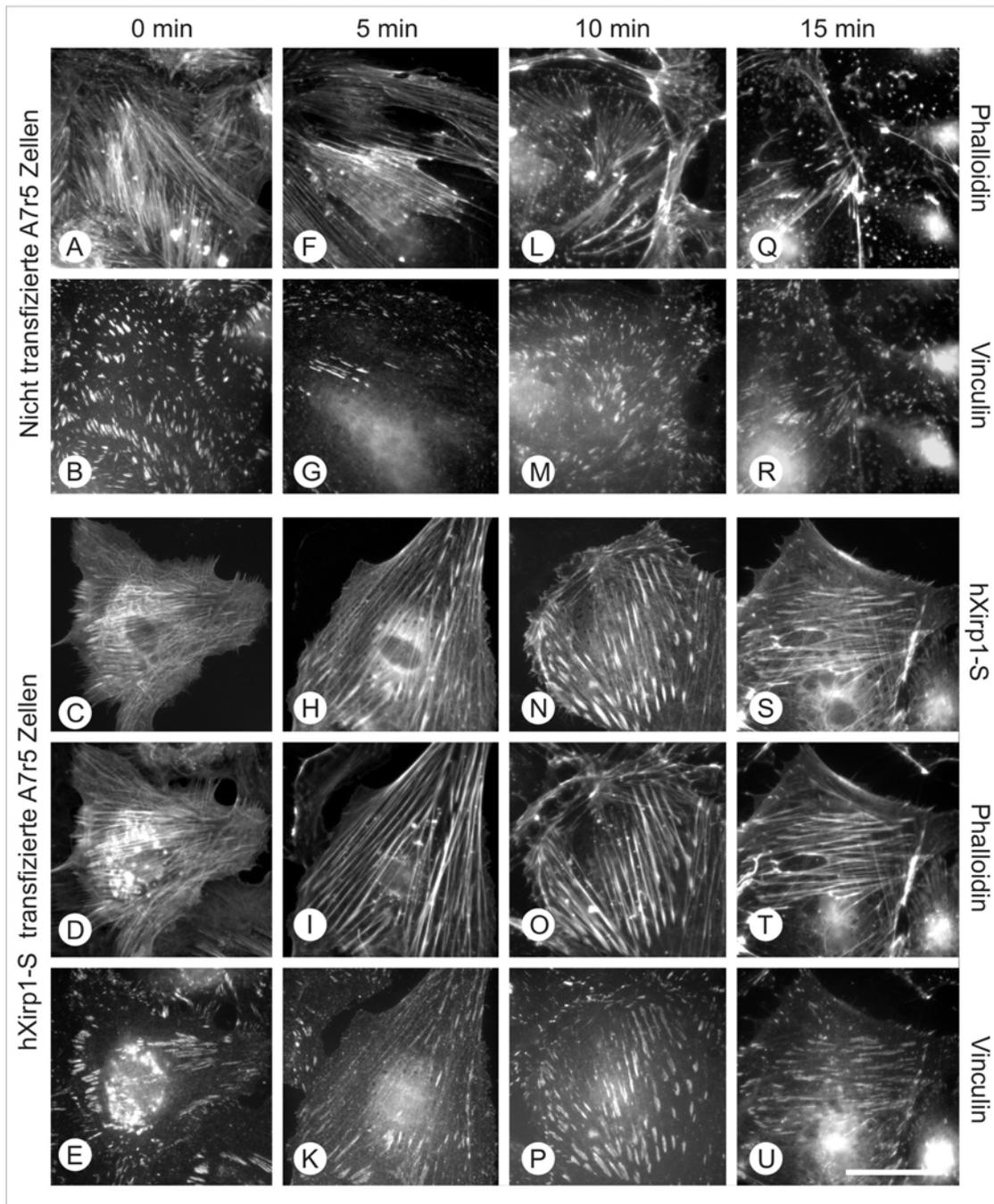


Abb. 40 hXirp1-S stabilisiert in Lat-A behandelten A7r5 das F-Aktinzytoskelett

A-E) Zellen vor der Lat-A Applikation mit A,B) nicht transfizierten A7r5-Zellen. F-K) Zellen fünf min nach Lat-A-Applikation mit F,G) nicht transfizierten A7r5-Zellen, L-P) Zellen 10 min nach Lat-A-Applikation mit L,M) nicht transfizierten A7r5-Zellen, Q-U) Zellen 10 min nach Lat-A-Applikation mit Q,R) nicht transfizierten A7r5-Zellen. Untransfizierte A7r5-Zellen (F,G) wiesen im Gegensatz zu den transfizierten Zellen (H-I) erste Läsionen im Aktinfilamentsystem nach fünf min auf. Läsionen und Abbau des Aktinzytoskeletts in untransfizierten Zellen nahmen mit der Behandlungsdauer drastisch zu. Erst nach 10 bzw. 15 min wiesen auch mit hXirp1-S-transfizierte A7r5-Zellen sichtbare Läsionen im Aktinzytoskelett auf. (N,O und S,T). Nicht transfizierte Zellen zeigen während Lat-A-induzierten F-Aktindepolymerisation einen Abbau des F-Aktinsystems (Phalloidin) mit in der Größe verringerten Fokalkontakten (Vinculin). Im Gegensatz hierzu wiesen die hXirp1-S-exprimierenden A7r5-Zellen ein relativ intaktes Strebfasersystem mit vergrößerten Fokalkontakten auf. Weitere Erläuterungen im Text. Maßstabsbalken: 50 μ M

3.6 Einfluß von Langzeitkulturbedingungen und Myogenisierung der A7r5-Zellen auf Expression von Xirp

Um einen weiteren Einblick in die Funktion bzw. Einfluß von Xirp auf Zytoskelett und Fokalkontakte zu erhalten, wurden die A7r5 Glattmuskelzellen nach der Transfektion unter verschiedenen Langzeit-Kulturbedingungen gehalten. Die Zellen wurden hierzu in Proliferationsmedium oder serumreduziertem „Differenzierungsmedium“ kultiviert. Für einen weiteren Einblick der Funktion von Xirp in der Myogenese wurden die Glattmuskelzellen über eine Transfektion mit MyoD, einem muskelspezifischen Transkriptionsfaktor, myogenisiert. Die Myogenisierungsexperimente erfolgten ausschließlich unter serumreduzierten Bedingungen. Die Zellen wurden hierbei entweder nur mit MyoD oder mit hXirp1-S und MyoD doppeltransfiziert. Für die Darstellung der Fokalkontakte wurde als Markerprotein Vinculin gewählt. Die Myogenisierung wurde über die Expression des Muskelproteins Titin, die Expression des endogenen rXirp in myogenisierten A7r5-Zellen wurde über das Antiserum α X1rep1 nachgewiesen.

3.6.1 Einfluß des Kulturmediums auf A7r5-Zellen

Die A7r5-Zellen wurden mit hXirp1-S transfiziert und nach Transfektion (über Nacht) für die weitere Kultivierung unter proliferierenden bzw. serumreduzierten Bedingungen aufgeteilt. Die Zellen besaßen nach Beendigung der Transfektion eine 80-90 %-ige optische Konfluenz und hXirp1-S lokalisierte an Fokalkontakten und Streßfasern. Nach einer anschließenden viertägigen Kultivierung unter oben genannten Bedingungen wurden die Zellen fixiert und über die Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

3.6.1.1 Einfluß des Kulturmediums auf Fokalkontakte der A7r5-Zellen

Im Vergleich beider Kulturbedingungen wies die Zellkultur nach viertägiger Kultivierung unter proliferativen Bedingungen eine (zu erwartende) höhere optische Konfluenz bei geringerer Zellgröße auf, als es unter serumreduzierten Bedingungen der Fall war. Die Morphologie der Zellen war unter beiden Kulturbedingungen rundlich-polygonal.

Die proliferativ kultivierten Zellen besaßen periphere sowie wenige zentral gelegene zumeist kommaförmige Fokalkontakte. Diese waren im Vergleich zu den Fokalkontakten der in serumreduziertem Medium kultivierten A7r5 in ihren Ausmaßen geringer. Im serumreduzierten Medium besaßen die A7r5-Zellen vermehrt peripher und zentral lokalisierte komma- bis fächerförmige Fokalkontakte. Die Kontakte wiesen außerdem ein stärkeres Immunsignal für Vinculin auf, das in einigen Fokalkontakten eine graduelle Ab- bzw.

Zunahme zeigte. Abb. 41, B und E bzw. H und L zeigen neben den mit hXirp1-S transfizierten Zellen, auch die hier beschriebenen untransfizierten Zellen nach viertägiger Kultivierung unter proliferativen bzw. serumreduzierten Bedingungen.

3.6.1.2 Einfluß des Kulturmediums auf Expression und Lokalisation von hXirp1-S

Die Anzahl der transfizierten A7r5-Zellen war nach insgesamt vier Tagen Kultur unter serumreduzierten Bedingungen vergleichsweise höher als unter proliferativen Bedingungen. Die Mehrzahl dieser Zellen entsprachen in ihren Ausmaßen denen in Abb. 41, G bis M abgebildeten Zellen. Die transfizierten Zellen in den proliferativ gehaltenen A7r5 waren (wie auch die meisten nicht transfizierten Zellen) relativ klein. Abb. 41, A bis F zeigen einige der wenigen größeren Zellen. Das ektopisch exprimierte hXirp1-S wies unter serumreduzierten Bedingungen in den A7r5-Zellen eine besser erkennbare sowie stärkere Lokalisation an Fokalkontakten und Streßfasern auf, als es in den proliferativen Zellen beobachtet wurde.

Die Ausmaße der Fokalkontakte der Zellen variierten unter beiden Kulturbedingungen und zeigten keine generelle zusätzliche Vergrößerung für mit hXirp1-S transfizierten Zellen. (Abb. 41, A bis M).

3.6.2 Einfluß einer Myogenisierung auf A7r5-Zellen und Expression von Xirp

Die A7r5-Zellen wurden mit MyoD allein oder mit hXirp1-S doppeltransfiziert und unter serumreduzierten Bedingungen für weitere vier bis maximal sechs Tage kultiviert. Die Myogenisierung der Zellen wurde über die Detektion des muskelspezifischen Proteins Titin nachgewiesen. Praktisch jede mit hXirp1-S transfizierte Zelle war bei einer Doppeltransfektion mit MyoD auch myogenisiert. Eine Kontrolltransfektion von hXirp1-S ohne MyoD unter gleichen Bedingungen wies keine Expression von Titin auf.

3.6.2.1 Einfluß der Myogenisierung auf A7r5-Zellen und Expression von hXirp1-S

Die Doppeltransfektion der A7r5-Zellen mit MyoD und hXirp1-S führte zu einer drastischen Vermehrung bzw. Vergrößerung sowie veränderten Morphologie der Fokalkontakte (Abb. 41, S. 97, N-P und Abb. 42, S. 98). Auffällig an diesen Zellen waren die peripher oftmals zusammengefaßten oder zentral liegenden fiederförmigen, großen Fokalkontakte. Die Stärke des Vinculin-Immunsignals variierte in diesen Fokalkontakten zwischen stark bzw. weniger stark, und wies oftmals eine graduelle Zunahme auf, die zentripetal gerichtet war. Das hXirp1-S lokalisierte wiederum an den Fokalkontakten und Streßfasern. Die Myogenisierung verursachte zudem eine morphologische Änderung der A7r5-Zellen von rundlich-polygonal zu rhombisch (Abb. 41, N-P auf S. 97 und Abb. 42 auf S. 98).

Nach Beendigung der „über Nacht“-Transfektion, 12 Stunden pT, war eine Expression des endogenen Titins kaum bis schwach an zentral gelegenen Streßfasern nachweisbar (nicht gezeigt). Nach zwei Tagen Zellkultur unter serumreduzierten Bedingungen war Titin eindeutig an den Streßfasern der Zellen detektierbar, die hier nach der Nomenklatur für quergestreifte Muskelzellen als streßfaserartige Strukturen (stress fibre like structures, SFLS) bezeichnet werden sollen. Die von Titin beanspruchten SFLS-Regionen befanden sich primär zentral der Zelle und weiteten sich im Laufe der Kultivierung bis zu sechs Tagen über den gesamten Zellkörper aus (Abb. 42, B, E, H). Während dieser Kultivierungszeit waren in den myogenisierten Zellen sogenannte Z-Körperchen (analog zu den „dense bodies“) entlang der SFLS zu erkennen, die als Vorläuferstadien der Z-Scheiben gelten (Sanger et al., 2002). Die Abb. 42 H zeigt einige frühe Myofibrillen, die durch eine naszierende Querstreifung gekennzeichnet sind.

Das ektopisch exprimierte hXirp1-S (Abb. 42, A, D, G) wies wiederum die bisher beschriebenen Lokalisationen an Fokalkontakten und Streßfasern bzw. SFLS auf. An einigen Fokalkontakten konnte eine zentripetal zunehmende Graduierung der Signalstärke für das hXirp1-S-GFP-Konstrukt beobachtet werden (vgl. Abb. 41, N, O, P und Abb. 42, A, D, G).

Ein weiterer interessanter Aspekt der Signale für hXirp1-S und Titin war, daß sich die Lokalisationen für die stärksten Immunsignale für hXirp1-S und Titin einander nahezu ausschlossen. So war zum einen an den hXirp1-S positiven Fokalkontakten kein, bzw. kaum Titin präsent. In den SFLS-Regionen in denen hXirp1-S klar lokalisierte, wurde für Titin ein weniger starkes Immunsignal beobachtet. Vice versa zeigten SFLS-Regionen mit einem starken Titin-Immunsignal eine verringerte Signalstärke für hXirp1-S, die besonders deutlich in den entstehenden Myofibrillen zutage trat (Abb. 42, G-I).

3.6.2.2 Expression von endogenem rXirp in myogenisierten A7r5-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, daß myogenisierte Glattmuskelzellen endogenes Titin exprimierten, sollte der Frage nachgegangen werden, ob dies auch für endogenes rXirp gilt. Für die Detektion des endogenen Xirp wurde das Antiserum α X1rep1 benutzt. Die Zellen wurden nach erfolgter Transfektion für maximal sechs weitere Tage unter serumreduzierten Bedingungen kultiviert. Die Myogenisierung der Glattmuskelzellen wurde wiederum über die Expression von Titin validiert, die jedoch nicht als Referenz zum Antiserum α X1rep1 verwendet werden konnte, da beide Seren bzw. Antikörper zu den IgG Subklassen (Maus) gehören. Als Referenzfärbung wurde daher ein polyklonales (Kaninchen) Serum gegen jegliches α -Aktinin gewählt.

Eine Expression des endogenen rXirp war schon nach Beendigung der „über Nacht“-Transfektion, 12 Stunden pT, in den myogenisierten A7r5-Zellen nachweisbar. Das endogene rXirp befand sich hierbei an den noch normal klein aussehenden Fokalkontakten sowie an den Streßfasern. Diese für rXirp positiven Lokalisationen waren peripher bis perinukleär vorhanden. Abb. 43, A-C zeigt eine Zelle mit relativ hohem Expressionsstatus. Die Expression des rXirp nahm mit der Kultivierungszeit zu und wies die schon beschriebenen Lokalisationen für das ektopisch exprimierte hXirp1-S-GFP-Konstrukt auf. Wie schon für die Doppeltransfektionen beschrieben, wiesen auch diese myogenisierten A7r5-Zellen eine Veränderung der Morphologie von rundlich polygonal zu rhombisch auf (Abb. 43, A, D und G).

Die Fokalkontakte der myogenisierten Zellen waren in Ausmaß und Zahl erhöht und wiesen wiederum eine überwiegend fächerförmige bis fiederförmige Morphologie auf, wie sie schon in den MyoD-hXirp1-S doppeltransfizierten A7r5-Zellen beschrieben wurden. Die Fokalkontakte dieser myogenisierten Zellen befanden sich peripher und zentral und besaßen vergleichbare Dimensionen, wie sie in den doppeltransfizierten A7r5-Zellen zu finden waren (Abb. 43, D-I).

Die Referenzfärbung gegen α -Aktinin wies eine Zunahme des Immunsignals in den rXirp positiven A7r5-Zellen auf (Abb. 43, B, E, H). Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei dieser Zunahme des Immunsignals um eine Expressionserhöhung des sarkomeren und/oder nicht-sarkomeren α -Aktinins handelt bzw. ob dieser Eindruck aus einer verstärkten Aktinfilamentbündelung stammt, wie sie in einigen (jedoch nicht allen) myogenisierten Zellen beobachtet wurde (nicht gezeigt). Ein Expressionsnachweis für das sarkomere α -Aktinin, einem frühen Differenzierungsmarker in quergestreiften Muskelzellen konnte nicht erbracht werden.

Seite: 97**Abb. 41 Transfektionen mit hXirp1-S in A7r5-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen**

A-F) und G-M) zeigen hXirp1-S Transfektionen, N-P zeigen über MyoD-hXirp1-S Doppeltransfektionen myogenisierte A7r5-Zellen. Die Zellen in A-F wurden nach Transfektion für vier Tage in normalem Proliferationsmedium kultiviert. Die Zellen in G-P) wurden in serumreduziertem Medium kultiviert. Zu beachten sind die Vergrößerung der Fokalkontakte unter serumreduzierten Bedingungen sowie in myogenisierten Zellen. Dieser Effekt wurde durch ektopische Expression von hXirp1-S nicht verstärkt. Vergleiche hierzu Abb. 4.8-2. Weitere Erläuterungen im Text. Pfeilkopf: Fokalkontakt. Pfeil: Streßfaser. Maßstab: 50 µm

Seite: 98**Abb. 42 Transfektionen mit hXirp1-S in myogenisierten A7r5-Zellen**

Alle Zellen wurden nach erfolgter MyoD-hXirp1-S-Doppeltransfektion unter serumreduzierten Bedingungen A-C) zwei, D-F) vier und G-H) sechs Tagen kultiviert. Die Abbildungen A, D, G) zeigen hXirp1-S-GFP, B, E, H) endogene Titinexpression über Antikörper T12 (Texasrot) und C, F, I) die Überlagerungen der jeweiligen Kanäle. Beachte die für myogenisierte A7r5-Zellen typischen fächer- bis fiederförmigen Fokalkontakte (vgl. hierzu Abb 4.8-1 N-P) und rhombische Morphologie (vgl auch Abb. 4.8-1 A-M). Ektopisch exprimiertes hXirp1-S wies typische Lokalisationen an Streßfasern bzw. SFLS und Fokalkontakten auf, mit gradueller Abstufung des Signals in den Fokalkontakten. B,E,H) Endogene Titin- Expression und Lokalisation nahm mit Kultivierungsdauer zu. In H) zu erkennende naszierende Myofibrillen (Sternchen) zeigen kaum hXirp1-S, aber starke Titinlokalisierung. Weitere Erläuterungen im Text. Pfeilkopf: Fokalkontakte. Pfeil: Streßfaser bzw. SFLS. Sternchen: Myofibrille. Maßstab: 20 µm

Seite: 99**Abb. 43 Expression von endogenem rXirp in myogenisierten A7r5-Zellen**

A-I) zeigen über MyoD-Transfektion myogenisierte A7r5-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten: A-C) 12 Stunden nach Transfektionsstart, D-F) zwei Tagen und G-I) vier Tagen Kultivierung in serumreduziertem Medium. A,D,G weisen Expression von endogenem rXirp mit Antiserum α X1rep1 (TXR) nach. B, E, H zeigen Referenzfärbung gegen α -Aktinin (hier keine Unterscheidung zwischen zytoplasmatisch und sarkomer!) mit FITC-Konjugat. C ,F, I) zeigen Überlagerung der Kanäle. Erläuterungen im Text. Pfeilkopf: Fokalkontakte. Pfeil: Streßfaser bzw. SFLS. Sternchen: Myofibrille. Maßstab: 20 µm

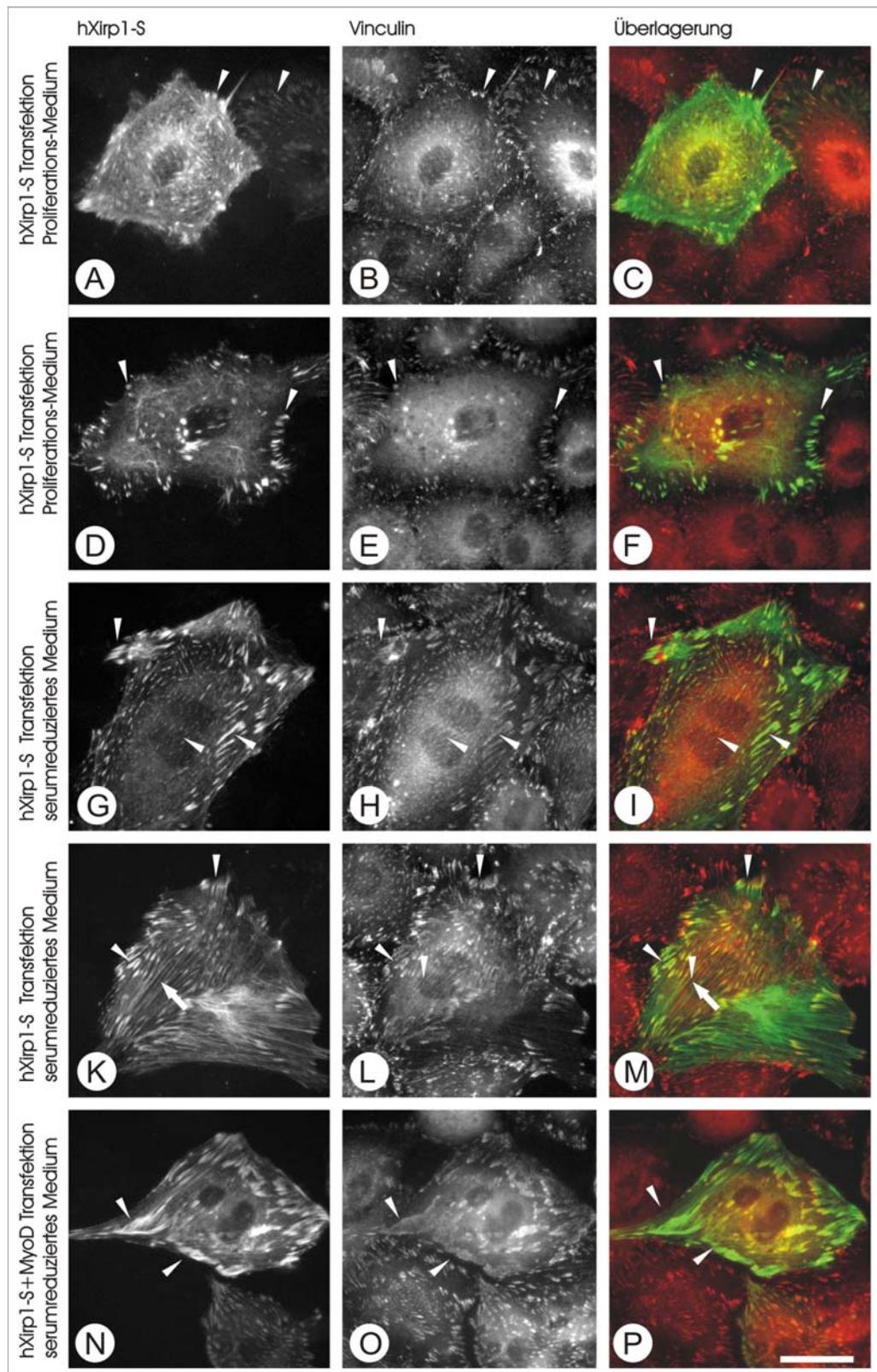


Abb. 41 Transfektionen mit hXirp1-S in A7r5-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen

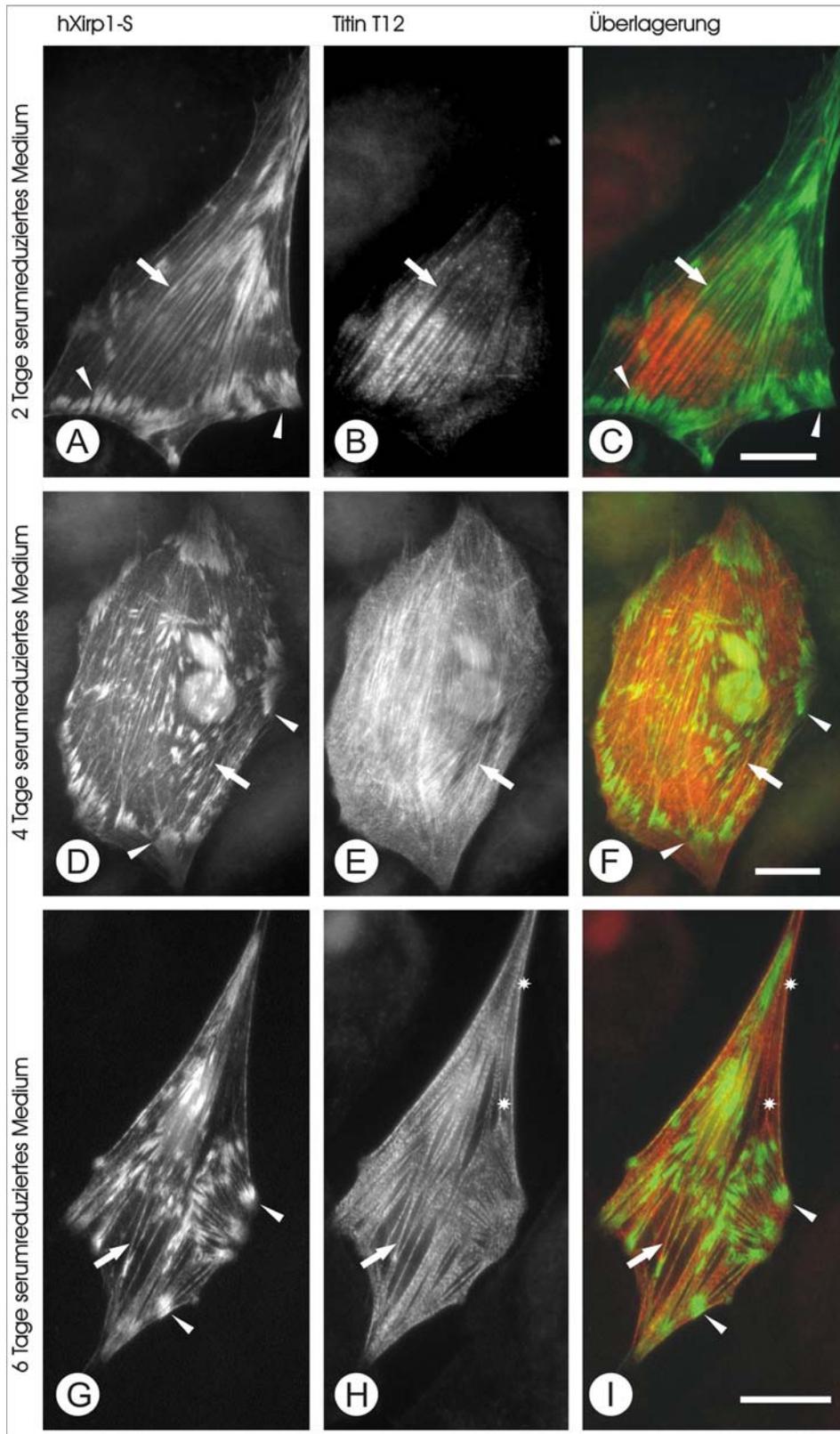


Abb. 42 Transfektionen mit hXirp1-S in myogenisierten A7r5-Zellen

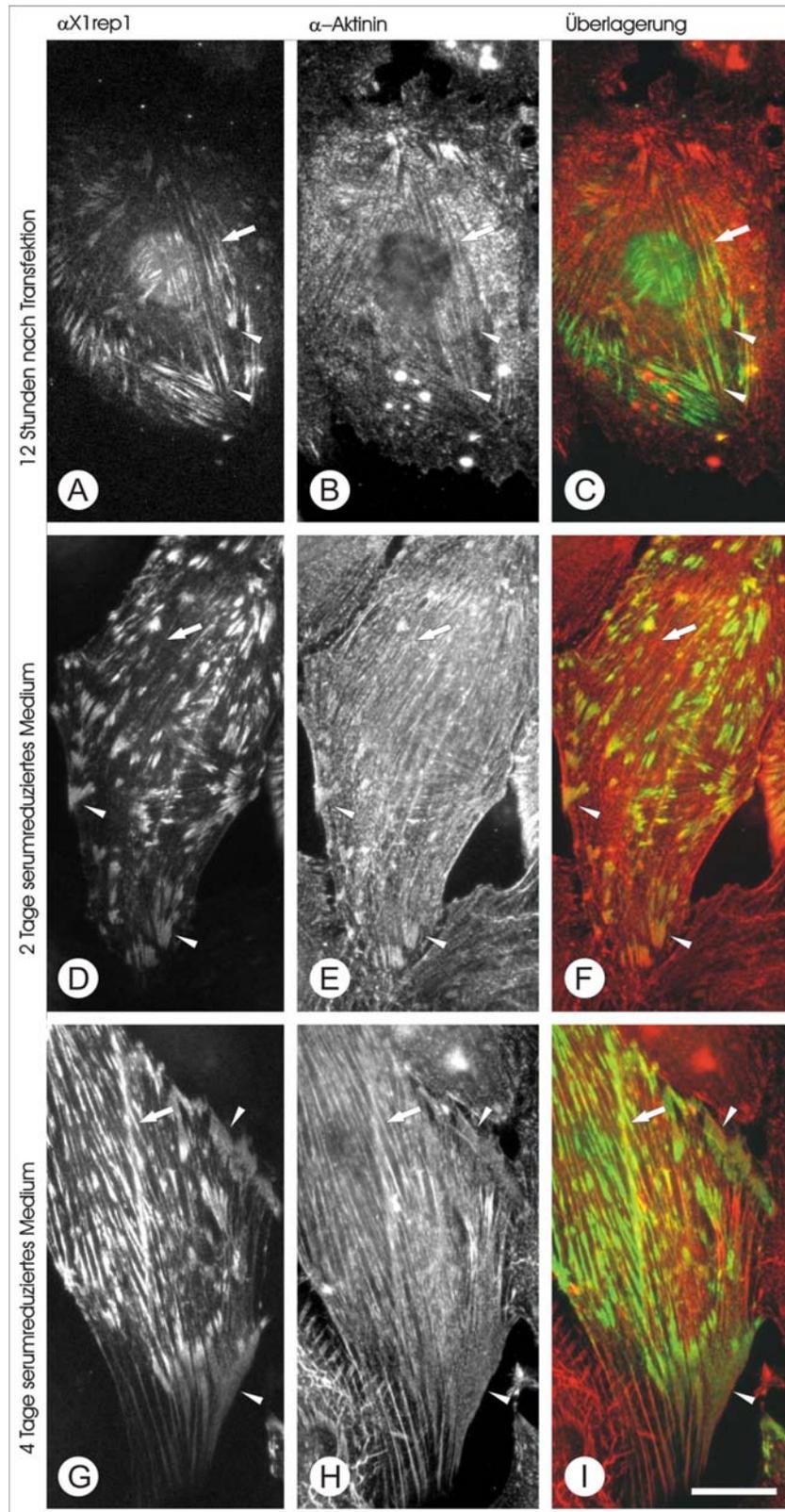


Abb. 43 Expression von endogenem rXirp in myogenisierten A7r5-Zellen

4 Diskussion

4.1 Xirp ein Multidomänenprotein mit charakteristischen repetitiven Motiven

Xin wurde erstmals von Wang et al. 1999 in Huhn (cXin: AF051944) und Maus (mXin: AF051945) als Protein beschrieben, das durch repetitive Motive charakterisiert wird, die keinerlei Homologien zu bekannten Proteinen aufwies. Die Motive, deren Funktion bis dahin unbekannt war, bestanden hierbei aus 16 Aminosäuren. Weiterhin beschrieben die Autoren, daß die Aminosäuresequenz von cXin und mXin eine Vielzahl prolinreicher Sequenzen enthielt (Wang et al., 1999).

In unserem Labor wurde ein zu mXin homologes humanes Xin-Protein kloniert. Durch Recherche innerhalb der biologischen Datenbanken, konnte ein weiteres bei weitem größeres humanes Paralog hierzu gefunden und teilweise kloniert werden. Aufgrund der Homologien und Unterschiede (in Größe, Motivanzahl und Domänen) zu cXin (und mXin) wurde das homologe humane Xin-Protein mit „human Xin related Protein 1“ und das größere Paralog mit „human Xin related Protein 2“ hXirp2 benannt.

4.1.1 Vergleich der Sequenzen innerhalb der Xirp-Familie

Die aus den Datenbanken stammenden Sequenzinformationen zu den cDNA Klonen für hXirp1 und hXirp2 wiesen eine Besonderheit auf. Ein ungewöhnlich großes Exon kodierte die Nukleotidsequenz für das gesamte hXirp1 bzw. für einen Großteil des hXirp2. Ein großes Exon von 5664 Nukleotiden kodiert auf Chromosom 3p22.2 (bzw. 3p21.33) das gesamte hXirp1-L. Ein Großteil von hXirp2 wird von einem großen Exon von 9407 Nukleotiden auf Chromosom 2q24.3 kodiert. Homologien innerhalb des Ablaufs der repetitiven Motive bzw. der Verbindungssequenzen auf Ebene der DNA und Aminosäuresequenz, die auf einen gemeinsamen genomischen Ursprung hinweisen würden, waren nicht vorhanden.

Die zu den humanen Xirp homologen mXin und mXirp2 (AK040786) liegen auf den Chromosomen 9 und 2, wo auch sie von einem riesigen Exon kodiert werden. Die orthologen Varianten mXin und hXirp1 sowie mXirp2 und hXirp2 sind in ihrer Primärsequenz zu 57 % bzw. 70 % identisch.

Das von Wang et al. klonierte cXin ist zu den bisher bekannten humanen und murinen Xin bzw. Xirp-Varianten zu 24 % identisch. Eine genaue Zuordnung von cXin zu der kleinen Variante Xirp1 oder Xirp2 ist schwierig. Sequenzvergleiche bezüglich der Abfolge der repetitiven Motive und Verbindungssequenzen, sowie C-terminale Abschnitte verweisen

allerdings in Richtung Xirp1. Ein zu hXirp2 und mXirp2 homologes cXirp2 wurde bisher in keiner Datenbank gefunden. Desweiteren ist die genomische Lokalisation des cXin aufgrund fehlender Datenbankeinträge unbekannt.

Die für hXirp1 verifizierten Spleißvarianten hXirp1-S und -L sind aufgrund analoger Spleiß-Loci in der mRNA Sequenz möglicherweise auch für hXirp2 vorhanden. Ein Beweis steht jedoch noch aus.

Ein aus dem humanen Zungengewebe stammender cDNA-Klon (AK096421) stellt außerdem eine mögliche weitere hXirp1-Spleiß-Variante dar. Dieser Klon, der einen Teil der 5'-UTR sowie den C-Terminus des hXirp1-L umfaßte, würde mit dem Methionin 1318 beginnen, welches vor der C-terminalen putativen SH3-Bindungsdomäne liegt. Dieser Spleißvariante würden somit die repetitiven Motive fehlen und enthielte zwei putative SH3-Bindungsdomänen sowie die Filamin-C Bindungsstelle.

Zwei weitere zu hXirp1 homologe ESTs (ai703241, bx116988) umfaßten die 5' UTR bis zum dritten repetitiven Motiv, wobei die putative DNA-Bindungsdomäne mit flankierenden Sequenzen herausgespleißt worden war. Interessanterweise stammten diese Klone aus einem Mix von cDNA-Banken aus Hoden und Lunge, was drauf hinweisen könnte, daß Spleißvarianten von Xirp1 auch ubiquitär exprimiert werden könnten.

Bei jeglicher Betrachtung von Spleiß-Isoformen stellt sich selbstverständlich die Frage nach Gemeinsamkeiten sowie Unterschieden bezüglich der Primärsequenz, Expression und somit der Funktion eines Proteins. Im Falle des Xirp fällt diese Frage nicht zuletzt auf das Vorhandensein und die Anzahl der repetitiven Motive sowie anderer funktionaler Regionen.

Es ist anzunehmen, daß zukünftige Untersuchungen und Recherchen zu weiteren interessanten Spleiß-Isoformen führen werden, und diese neue Xirp-Proteinfamilie weitere Untergliederungen erfahren wird.

4.1.2 Die repetitiven Motive der Xirp Familie

Die für die Xirp-Familie charakteristischen, aus wenigstens 16 Aminosäuren bestehenden, repetitiven Motive besaßen keine Homologien mit bisher bekannten Motiven. Proteine mit repetitiven Motiven interagieren oftmals mit Strukturen, die aus repetitiven Strukturen aufgebaut sind (Kajava, 2001). Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß es sich bei den repetitiven Motiven von Xirp um neuartige F-Aktin bindende Module (3.5) handelt.

Eine genaue Beschreibung der Sekundärstruktur des gesamten Sequenzmotivs in Xirp ist bis auf weiteres nicht möglich. Die Mehrzahl an Vorhersageprogrammen wies dem Bereich

der Tandemmotive eine überwiegend α -helikale Sekundärstruktur zu. CD-spektroskopische Untersuchungen an bakteriell exprimiertem und aufgereinigtem hXirp1-18rM (18 repetitive Motive) zeigten allerdings, daß das Polypeptid in wässriger Lösung in einer elongierten, aber nicht zufälligen Konformation vorliegt, in dem α -helikale Tendenzen schwach ($< 10\%$) erkennbar sind (Pacholsky et al., 2003, eingereicht). Ob diese helikalen Anteile unter α -Helix-stabilisierenden Bedingungen (1 % SDS oder Deoxycholat) verstärkt werden können (Motta et al, 1991), bleibt zu überprüfen. Pfuhl und Kollegen wiesen für einzelne repetitive Motive des Nebulins, einem riesigen F-Aktin-bindenden Protein, eine transiente α -helikale Konformation in wässriger Lösung nach, die über die oben genannten Bedingungen verstärkt wird und über die Interaktion mit F-Aktin stabilisiert werden soll (Pfuhl et al., 1994).

Der in jedem individuellen Motiv von Xirp auf Position 8 - 10 gelegene hydrophobe Kern (Tryptophan W, Leuzin L, Phenylalanin L) kann hier möglicherweise zur Unterstützung einer α -helikalen Sekundärstruktur genutzt werden (Kajava, 2001). Da Aminosäuren wie Glyzin und Prolin α -helikale Sekundärstrukturen verhindern (Kajava, 2001), scheint die Umrahmung des Motivs über Glyzin (Position 1) und Prolin (Position 14) einen Hinweis auf eine mögliche Separierung zwischen Kernmotiv (1-14) und den Verbindungssequenzen darzustellen. Auch in den Verbindungssequenzen war trotz der unregelmässigen Verteilung der Aminosäuren Glyzin und Prolin eine α -helikale Tendenz vorhanden. Bereiche ohne diese Tendenz in Motiv- und Verbindungssequenzen wurden als Zufallsknäuel ausgewiesen. Da auch in den Verbindungssequenzen konservierte Aminosäuren vorhanden waren, war das repetitive Motiv auf 23 bzw. 25 Aminosäuren für hXirp1 bzw. hXirp2 erweiterbar. Die Erweiterung betraf hierbei N-terminal 5 und C-terminal zwei bzw. vier Aminosäuren. Die N-terminale Erweiterung wurde von zwei konservierten Glutamatresten eingeleitet. C-terminal befanden sich (zumindest für hXirp2) wiederum zwei geladene Aminosäurereste.

Die Aminosäuresequenzen der Motive wiesen allerdings keine weiteren Clusterungen von geladenen Aminosäuren auf, wie sie beispielsweise in verschiedenen anderen Proteinen, deren Aktinbindung über konservierte repetitive Motive vermittelt wird, beobachtet worden ist. Für einige aktinbindende und muskelspezifische Proteine ist bekannt, daß die Aktinbindung durch überwiegend negativ oder positiv geladene Module vermittelt wird.

Das muskelspezifische Dystrophin und mit ihm verwandte, ubiquitär exprimierte Utrophin binden F-Aktin über repetitive spektrinartige-Motive, die sich zu einer Triple-helikalen „coiled coil“-Struktur zusammenlagern (Moores und Kendrick-Jones, 1999). Die einzelnen Spektrin-Motive besitzen einen aus aromatischen Aminosäuren bestehenden, konservierten hydrophoben Kern sowie die Aminosäuren Glyzin und Prolin in den Verbindungssequenzen

zwischen den Helices. Im Dystrophin sorgen Cluster von Motiven mit einer positiven Nettoladung für eine Bindung an das F-Aktin (Amann et al., 1998). Im verwandten Utrophin sind es hingegen überwiegend Cluster an Motiven mit einer negativen Nettoladung (Rybakova et al., 2002).

Im Nebulin finden sich repetitive Motive aus ca. 35 Aminosäuren, die einen ungewöhnlich hohen Gehalt an positiv geladenen Aminosäuren (Lysin, K, Arginin, R) enthalten. Die 35-Aminosäuremotive, deren Sekundärstruktur α -helikal ist, binden F-Aktin (Pfuhl et al., 1994). Weitere Proteine wie Nebulette (Moncman und Wang, 1995) und N-RAP (Luo et al., 1999) enthalten ebenfalls diese Art der repetitiven Motive. Die Motive des Nebulins weisen außerdem eine supramolekulare Strukturierung auf, in der sieben Motive zu einem Modul zusammengefaßt sind (Labeit et al. 1991).

Eine supramolekulare Strukturierung von Motiven wie in Nebulin wurde für die hXirp-Motive nicht gefunden.

Aufgrund noch fehlender schlüssiger Daten muß eine Aussage über den genauen Charakter der über die repetitiven Motive vermittelten Aktinbindung ausbleiben. Die für die Mehrzahl der Motive sowie für die gesamte Motivsequenz berechneten Pi-Werte um pH 5 würden bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 eine negative Nettoladung bedeuten. Diese könnte möglicherweise an den Wechselwirkungen zum F-Aktin beteiligt sein. Da einzelne Motive in hXirp1 wie auch hXirp2 einen basischen isoelektrischen Punkt aufweisen, ist eine genauere Analyse der Motive bezüglich der Aktinbindungsfähigkeit angebracht.

4.1.3 Die prolinreichen Motive der Xirp-Familie

Die in allen Mitgliedern der Xirp-Familie konservierten prolinreichen Motive implizieren deren Funktionalität. Die Motive umfaßten, wie in 3.1.4 gezeigt, potentielle Bindungssequenzen für Ena-VASP-Homologie 1 (EVH1)-Domänen, Src-Homologie 3 (SH3)-Domänen sowie WW-Domänen. Die detaillierte Konsensussequenzen sind in Tab. 5, S. 46 abgebildet.

Prolinreiche Motive die Homologien zu bekannten Motiven für Interaktionen mit EVH1-Domänen besaßen, waren in den N-Termini von hXirp sowie im mittleren Abschnitt präsent. Das hXirp2 enthielt hierbei im mittleren Abschnitt (AS: 2063–2204) eine Ansammlung von fünf möglichen EVH1 Bindungssequenzen. Proteine, die eine EVH1 Domäne enthalten, besitzen Schlüsselfunktionen in der Aktinassemblierung und Aktinfilamentdynamik sowie in der Signaltransduktion. Hier sind als Beispiel Mena und VASP zu nennen (Gertler et al., 1996; Prehoda et al., 1999). Sequenzmotive zur Bindung von EVH1-Domänen sind

typischerweise in Proteinen präsent, die am Auf- und Umbau des Aktinzytoskeletts beteiligt sind (Renfranz und Beckerle, 2002; Niebuhr et al. 1997). Vorläufige Untersuchungen zeigten, daß die prolinreichen N-terminalen Sequenzmotive von hXirp1 mit Mena und VASP interagieren (unpublizierte Daten). Die Interaktion von hXirp mit den Proteinen Mena oder VASP, die an den Plusenden der Aktinfilamente bindend (Bear et al. 2000), eine Rekrutierung von Profilin bewirken (Krause et al. 2002), weist auf eine Beteiligung von Xirp am Aktinzytoskelettaufbau hin.

Weitere redundante Protein-Protein-Interaktionsmodule stellen die SH3 Domänen und SH3-Bindungsmotive dar. SH3-Domänen sind in einer Vielzahl von Proteinen präsent, die im Zytoskelett, der Signaltransduktion oder an Enzym-Substrat-Koordinierungen beteiligt sind (Weng et al., 1995). In beiden Xirp Varianten fanden sich eine Vielzahl an möglichen SH3-Bindungsmotiven, über deren Bedeutung noch keine Aussagen gemacht werden können.

Ein weiteres Interaktionsmodul stellt die WW-Domäne dar. Sie spielen wie die SH3-Domänen in einer Vielzahl zellulärer Prozesse als Interaktionsmodul eine Rolle. Untersuchungen zur Relevanz der in hXirp1 und hXirp2 gefundenen Motive sind bisher nicht durchgeführt worden.

4.1.4 Die Heptaden Motive in Xirp

Proteininteraktionen über ein „coiled coil“ Arrangement stellen eine effektive Möglichkeit dar, Homo- oder Heterodimere bzw. Oligomere zu bilden. Als Beispiel sei hier das F- Aktin bindende Tropomyosin genannt, das unter physiologischen Konditionen über seine gesamte Moleküllänge als Homo- oder Heterodimer vorliegt (Hitchcock-DeGregori et al., 2002).

Die bisher bekannten Mitglieder der Xirp Familie, cXin, mXin, mXirp2, hXirp1 und hXirp2 enthielten die für hXirp1 bzw. hXirp2 beschriebenen Sequenzen für mögliche „coiled coil“-Interaktionen. Das Muster für Sequenzen mit Heptaden in cXin war ähnlich dem in hXirp1 und mXirp1. Die besagten Sequenzen in hXirp1 und hXirp2 wiesen allerdings nur kurze Segmente von maximal 3 bis 7 Heptaden (21-35 Aminosäuren) auf. Vorhersagen der Sekundärstrukturen wiesen diese Sequenzabschnitte als α -helikal aus.

In den schon erwähnten Proteinen Dystrophin und Utrophin befinden sich C-terminal zwei Domänen mit potentiellen „coiled coil“ Regionen deren Funktionalität zur Homodimerisierung nicht bewiesen ist, da ein biochemischer Nachweis für eine Dimerisierung von Dystrophin bzw. Utrophin bisher ausblieb (Winder et al., 1995). Diese „coiled-coil“-Regionen, deren Heptadenmotive 4 bis 5 (Helix 1) bzw. 6 (Helix 2)

Tandemmotive darstellen, sind allerdings in der Bindung weiterer Proteine (hier Dystrobrevin und Syntrophin) beteiligt (Sadoulet-Puccio et al., 1997).

Über die Funktion der Heptaden in hXirp kann bisher keine Aussage getroffen werden, jedoch sollten diese Abschnitte als mögliche Interaktionsmodule für Protein-Protein-Wechselwirkungen in Betracht gezogen werden. In diesem Zusammenhang sei auf die Transfektionsergebnisse mit dem Konstrukt hXirp1-CPP-CC hingewiesen, die in A7r5- wie auch PtK2-Zellen einen kontrahierten Phänotyp in den transfizierten Zellen bewirkten.

Da diese Phänotyp nicht mit dem gesamten hXirp1-L Konstrukt erreicht wurde, läßt zum einen einen Regulationsmechanismus vermuten, der in Transfektionen mit hXirp1-CPP-CC ausfällt. Zum anderen stellt sich selbstverständlich die interessante Frage nach dem Interaktionspartner.

4.1.5 Das P-Loop Motiv in Xirp

Der P-Loop zur Bindung von Phosphonukleotiden (ATP, GTP) ist in einer Vielzahl von Proteinen zu finden, die als Translationsfaktoren, Enzyme, Transporterproteine, Motorproteine und Signaltransduktionsmoleküle bekannt sind. Desweiteren stellt dieses Motiv ein relativ häufig auftretendes Muster dar, so daß viele Proteine, wie z.B. Chymotrypsin und Ferritin Leichte Kette ein solches Motiv ohne Funktion enthalten.

Neben hXirp1 und hXirp2 fanden sich auch in mXin und mXirp2 ein P-Loop Muster, wobei im mXin ein Austausch des Threonins gegen ein Prolin stattfand. In cXin ließ sich kein solches Muster finden, da hier eine Insertion vorlag. Die Tab. 10 gibt die Sequenzmotive wieder. In wiefern dieses Motiv in Xirp funktionell ist, bleibt zu überprüfen.

<i>Protein</i>	<i>Konsensussequenz (AG)-XXXX-GK-(ST)</i>
hXirp1	G-MAVL-GK-S
hXirp2	A-KIIT-GK-T
mXin	G-KAAS-GR-P
mXirp2	A-KILT-GK-S
cXin	G-IAqakvtaernevvGEQ

Tab. 10 Übersicht der putativen Phosphonukleotidbindungsstelle

Zum P-Loop-Motiv homologe Sequenzen sind in hXirp1, hXirp2 und mXirp2 präsent. In mXin ist ein Austausch des C-terminal gelegenen Threonins (T) gegen Prolin (P) zu finden. Das cXin besitzt in äquivalenter Sequenz eine Insertion (klein gedruckte Aminosäuren), die eine Zuordnung zum P-Loop unmöglich macht.

4.1.6 Interaktion von Xirp mit Filaminen

Die Filamin C-Bindungsregion wurde in hXirp1 auf den C-terminalen Abschnitt der Aminosäuren 1685 bis 1843 eingegrenzt und über ein Hefe-Doppelhybrid-Assay verifiziert (unpublizierte Daten). Über eine Filaminbindung der Varianten mXin und cXin liegen bisher keine Daten vor, jedoch zeigen Vergleiche der relevanten Sequenzabschnitte mit mXin und

cXin eine hohe Homologie innerhalb einer 44 Aminosäuren langen Sequenz auf. In hXirp2 und mXirp2 sind nur einige wenige dieser Aminosäuren konserviert. Tab. 11 zeigt die Sequenzen in einer Länge von 50 Aminosäuren. Aufgrund der Homologie dieser Region zwischen cXin, mXin und hXirp1 ist zu vermuten, daß diese Region das eigentliche Interaktionsmodul mit Filamin C darstellte. Eine Überprüfung dieser Hypothese könnte über proteinbiochemische Methoden wie Pull-down-Assay und Western-Blot-Overlay nachgegangen werden. Vorläufige Untersuchungen über das Hefe-Doppelhybrid-System zeigten, daß auch die C-terminalen Domänen d19-21 des Filamin B nicht aber des Filamin A eine Bindung mit hXirp1-Y bzw. hXirp1-FC eingehen können (unpublizierte Daten). Inwiefern in hXirp2 und mXirp2 diese Sequenz eine Filaminbindung vermittelt, ist bisher nicht untersucht.

Aufgrund der Interaktionen von Filamin C mit dem Sarcoglykan-Transmembrankomplex (Thompson et al., 2000) ist eine Kopplung von hXirp1-L mit dem Sarcoglykankomplex anzunehmen.

<i>Protein</i>	<i>potentielle Filaminbindungsregion</i>
cXin (2456-2506)	RRQKSIILELKTGPDGSKLYGATRTVTEQYEEMDQFGNKIITSSSTTVTKQS
mXin (1578-1628)	GQPKNVLEFQTGSTTSKSYGAMRTVTEQYEEMDQFGNTVLTSSSTTITQHA
hXirp1 (1744-1894)	GWQKSVLELQTPGSSQHYGAMRTVTEQYEEVDQFGNTVLMSSSTTVTEQA
mXirp2 (3125-3175)	FTGFSSYRHPKVPAMQPRVHSEARSLNEHFSSVDAFDSQIVGSKVATSSSR
hXirp2 (3169-3219)	CKHPRELREKIPVKQPRICSETRSLSEHFSGMDAFESQIVE SKMKTSSSH

Tab. 11 Sequenzvergleich der potentiellen Filaminbindungsregionen

Die Abbildung zeigt homologe (schwarz unterlegt) und ähnliche (grau unterlegt) Aminosäuren bei einem Schwellenwert von 50 %, die die potentielle Filaminbindungsregionen der Xirp Familie darstellt.

4.2 Xirp bindet und stabilisiert F-Aktin

Die mit den hXirp1 und hXirp2 GFP-Konstrukten durchgeführten Transfektionsstudien in A7r5-Glattnuskelzellen, PtK2-Epithelzellen und B16F1-Melanomzellen wiesen stets auf eine Aktinzytoskelettassoziation der Konstrukte hin. Diese Aktinassoziation stand im engen Zusammenhang mit den repetitiven Motiven von Xirp. Die exprimierten Proteine und Polypeptide lokalisierten hierbei primär an den Fokalkontakten und Streßfasern. Zur Beantwortung der Frage, ob die Aktinzytoskelettassoziation direkt oder indirekt erreicht wurde, ist ein F-Aktin-Kosedimentationsassay durchgeführt worden. Dieser zeigte, daß es sich bei den repetitiven Motiven von Xirp um F-Aktin bindende Module handelt. Eine Kooperativität, die auf eine Beeinflussung der Aktinbindungsfähigkeit der Motive durch schon an F-Aktin gebundene Motive hinweist, wurde nicht beobachtet.

Das Polypeptid hXirp1-18rM, das die 18 repetitiven Motive von hXirp1 darstellte, wies eine spezifisch abzusättigende Bindung an F-Aktin in einem molaren Verhältnis von etwa 1 : 4 auf. Dieses Verhältnis verweist somit auf etwas mehr als vier repetitive Motive pro Aktinmonomer. Die aus den Bindungsdaten ermittelte Dissoziationskonstante K_d von 0,45 μM reiht sich in die Bindungsdaten der bisher bekannten aktinbindenden Proteine ein (Pollard, 1999). Das Polypeptid zeigte keine Tendenz zur Bündelung von F-Aktin. Das Konstrukt hXirp1-6rM (Motive 1-6) sättigte F-Aktin spezifisch in einem molaren Verhältnis von etwa 1 : 2 ab, was drei repetitiven Motiven pro Aktinmonomer entspräche. In Kontrolltransfektionen in A7r5 und PtK2-Zellen lokalisierten beide Konstrukte an den Streßfasern und Fokalkontakten.

Im Kontrast hierzu wiesen die Polypeptide hXirp1-3rM bzw. -2rM, die drei bzw. zwei der repetitiven Motive umfaßten keine F-Aktinbindung *in vitro* auf.

Die Frage nach der minimalen Anzahl an Motiven, die für eine F-Aktinbindung benötigt werden, sollte mit weiteren trunkierten Polypeptiden, die vier bzw. fünf Motive umfassen, beantwortet werden können. Desweiteren besteht, aufgrund des Konservierungsgrades einzelner Motive, die Frage, ob jegliche Motivkombination der 18 Motive funktionell ist.

Zur Funktionalität von hXirp1-3rM und hXirp1-2rM können desweiteren keine sicheren Aussagen getroffen werden. Die Kontrolltransfektionen in A7r5-Glattmuskelzellen wiesen eine, wenn auch schwache, Lokalisation dieser GFP-Konstrukte an Streßfasern (und „dense bodies“) sowie Fokalkontakten auf. Diese Lokalisationen waren in fixierten, wie auch lebenden Zellen vorhanden und somit nicht auf eine allgemeine Klebrigkeit des GFP an Aktinzytoskelettelementen zurückzuführen. In PtK2-Epithelzellen, die mit diesen Konstrukten transfiziert wurden, zeigten die exprimierten Polypeptide nur eine zytoplasmatisch diffuse Verteilung. In beiden Zelltypen fiel zudem eine nukleäre Lokalisation der GFP-Konstrukte auf, die als Hinweis für die verringerte Funktionalität der exprimierten Motive gewertet wurde. Ob es sich bei den Unterschieden des *in-vitro*- und *in-vivo*-Bindungsverhaltens dieser Peptide um eine Maskierung von Bindungsstellen handelt, die auf a) verminderte Funktionalität durch die bakterielle Expressierung der Polypeptide b) fehlende N- und C-terminale Verbindungssequenzen der Motive (4.1.2 und 4.6.4), oder c) das Puffersystem im Aktinbindungsassay zurückzuführen sind, oder noch andere Interaktionspartner eine F-Aktinbindung *in-vivo* vermitteln oder behindern, bleibt hierbei spekulativ und Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die Beobachtung, daß erst mehrere Tandemotive als funktionale Aktinbindungsdomäne fungieren, ist auch für andere aktinbindende Proteine wie Calponin und UNC-87, einem

Muskelprotein von *C. elegans*, beschrieben worden (Gimona und Mital, 1998, Kranewitter et al., 2001, Stradal et al., 1998).

Die in den Transfektionsstudien generell vorgefundenen Varianzen bezüglich der Signalstärke und Lokalisationen der exprimierten hXirp1-rM Polypeptide wiesen auf weitere synergistisch und antagonistisch wirkende Faktoren hin, die von Zelltyp und Zellstatus abhängig zu sein scheinen. So wiesen die in den A7r5 und PtK2-Zellen exprimierten GFP-Konstrukte von hXirp-rM (hXirp1: -S, -L, -N, -18rM, -6rM; hXirp2-28rM) zwar eine starke Präferenz zu den Fokalkontakten und Streßfasern auf, jedoch waren in einigen der Zellen nur die Fokalkontakte oder nur die Streßfasern markiert. Der Grad der Expressionsstärke schien hierbei von Bedeutung zu sein.

In ähnlichen Zusammenhang lassen sich auch folgende Beobachtungen stellen: In motilen, mit ausgeprägten Lamellipodien versehenen, B16F1 (Melanom)-Zellen der Maus wiesen die Konstrukte hXirp1-S, -L und N kaum (bis keine) Fokalkontaktlokalisation auf. Stattdessen lokalisierten in diesen Zellen die Konstrukte primär am kontraktile Aktinzytoskelett. Eine Lokalisation im dynamischen und überwiegend verzweigten Aktinzytoskelett der Lamellipodien war hier sowie in den A7r5-Zellen nicht beobachtet worden. In den stationären B16F1-Zellen wurden durch die hXirp1-Konstrukte wiederum nur die Streßfasern markiert (nicht gezeigt). Eine analoge Beobachtung wurde auch in 3T3-Fibroblasten erzielt (nicht gezeigt).

Aufgrund der Vielzahl der an F-Aktin bindenden Proteinen werden weitere biochemische Untersuchungen erforderlich sein, um mögliche Kompetitoren an Fokalkontakten und Streßfasern zu ermitteln. Möglicherweise wird hierbei Tropomyosin eine Rolle spielen. Die Beobachtung des Ausschlusses einer Beteiligung am aktinreichen, dynamischen und verzweigten Lamellipodialsaum wurde auch für Tropomyosin in kultivierten Karzinomzellen beschrieben (DesMarais et al., 2002). Tropomyosin ist nicht an den, im Lamellipodialsaum neu gebildeten Aktinfilamenten detektierbar, die hier über Cofilin/ADF beschnitten und über Arp2/3 verzweigt werden. Eine direkte antagonistische Wechselwirkung zwischen diesen beiden Proteinen und Tropomyosin konnte gezeigt werden (Ono und Ono, 2002, Blanchoin et al., 2001). Weiterhin inhibiert Tropomyosin im Zellinneren über die laterale Bindung an F-Aktin die Funktionen von Cofilin/ADF und Arp2/3 und sorgte somit für eine Stabilisierung der Aktinfilamente (DesMarais et al., 2002, Blanchoin et al., 2001, Ono und Ono, 2002).

Auch die primär über die hXirp-Motive vermittelte Bindung an das Aktinzytoskelett erwies sich als stabilisierend für die Streßfasern. In untransfizierten A7r5-Zellen bewirkte eine Konzentration von 0,5 μ M Latrunculin A im Medium eine Depolymerisation des

Aktinzytoskeletts innerhalb von 5 bis 10 Minuten. Das Toxin bindet die Aktinmonomere und verhindert dadurch konzentrationsabhängig eine Polymerisation (Yarmola et al., 2000). Mit hXirp1-S transfizierte A7r5-Zellen blieben in einem Zeitraum von bis zu 15 Minuten effektiv von diesem depolymerisierenden Einfluß verschont und besaßen ausgeprägte Streßfasern und Fokalkontakte. Es ist allerdings anzumerken, daß es sich in diesem Fall um eine Transfektion mit hXirp1-S handelte und eventuell weitere Bindungspartner rekrutiert wurden, die einen möglichen positiven Einfluß auf die Stabilisierung besaßen. Zu nennen sind hierbei wiederum Mena und VASP die eine aktive Rolle in der Aktinpolymerisation besitzen, allerdings primär an den Fokalkontakten präsent sind (Gertler et al., 1998, Bachmann et al., 1999).

Die oben für Xirp dargelegten Resultate, daß a) Xirp ein F-Aktin bindendes, aber nicht bündelndes Protein darstellt, b) die Aktinbindung über die repetitiven Motive vermittelt wird, c) eine F-Aktinbindung in vivo stabilisierend wirkt, e) Xirp, ähnlich Tropomyosin aus dem Lamellipodialsaum ausgeschlossen wird lassen vermuten, daß Xirp elongiert und lateral entlang der F-Aktinfilamente bindet.

4.3 Lokalisationen von Xirp in Muskelgewebe und Kulturzellen

In quergestreiftem Muskelgewebe und Muskelzellen sowie in Transfektionsstudien in Muskel- und Nichtmuskelzellen lokalisierte Xirp stets in Kompartimenten der Zellen, die Verankerungspunkte zwischen Aktinfilamenten und Membran darstellen. Die Verankerungspunkte zwischen Aktinfilamentsystem und Plasmamembran umfassen im quergestreiften Muskel die myotendinose Übergangzone, im Herzmuskel den Glanzstreifen und in den mit Xirp transfizierten Kulturzellen die Fokalkontakte. Innerhalb des Aktinfilamentsystems des quergestreiften Muskels lokalisierte Xirp in den Z-Scheiben. In den Nichtmuskelzellen wies das ektopisch exprimierte Xirp eine Lokalisation an den Streßfasern auf.

4.3.1 Lokalisationen von Xirp in Muskelzellen

Xirp ist Bestandteil der Adhärenzverbindungen im quergestreiften Muskel

In den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Skelett- und Herzmuskulatur wurde Xirp verstärkt in den myotendinosen Übergangszonen und den Glanzstreifen detektiert. In der myotendinosen Übergangzone, wies das Immunsignal für Xirp longitudinale fibrilläre Strukturen auf, die von (sk)- α -Aktinin-, wie auch Xirp- positiven Z-Scheiben unterbrochen

wurden. Ob es sich bei den fibrillären Strukturen um den Verlauf der Aktinfilamente oder aber die Membraninvaginationen und -extensionen handelt ist unklar. Diese für Xirp beobachteten Strukturen ähnelten denen für Vinculin und Integrin $\beta 1D$, die in genannten Strukturen auch verstärkt auftreten (Bao et al., 1993). In den Glanzstreifen kolokalisierten die Immunsignale für Xirp und (sk)- α -Aktinin. Das α -Aktinin, so beobachtete Tidball, ist in der myotendinosen Übergangszone nicht verstärkt vorhanden (Tidball, 1987). Dies ist möglicherweise auf den Umstand zurückzuführen, daß die Myofibrillen hier in einer als „dense band“, also einer elektronendichten Bande nahe der Plasmamembran enden (Trotter et al., 1981), die keine reguläre Z-Scheibe darstellt (Yamaguchi, 1990). Im Gegensatz hierzu erfolgt die Verankerung der Myofibrillen im Herzen an den Glanzstreifen über eine Art terminaler Z-Scheibe (Lu et al., 1992). In beiden Geweben wurden mit den hier verwendeten polyklonalen Antiseren keine sarkolemmale Lokalisation von Xirp beobachtet, die auf eine Beteiligung an costameren Strukturen hinweisen würde. Die Lokalisationen an den Adhärenzverbindungen stehen somit im Einklang mit denen von Sinn et al. beschriebenen (Sinn et al., 2001).

Bei der myotendinosen Übergangszone und dem Glanzstreifen handelt es sich um spezielle Orte im Muskel, in denen die Aktinfilamente über Adapterproteine an Transmembranproteine gekoppelt werden, um die kontraktile Kräfte effektiv auf eine extrazelluläre Matrix (Sehne) oder benachbarte Zelle (Kardiomyozyten) übertragen zu können (Trotter, 2002).

Inwiefern eine direkte oder indirekte Verbindung zu Transmembranproteinen besteht, ist bisher nicht genau untersucht. Sinn und Kollegen waren in der Lage, durch Immunpräzipitation zu zeigen, daß das mXin im Cadherin-Catenin-Komplex präsent ist (Sinn et al. 2001). Für das schon erwähnte N-RAP wird u.a. eine Interaktion mit diesem Komplex vermutet (Zhang et al., 2001). Bindungspartner von N-RAP wie Vinculin und Talin sollen des weiteren Verbindungen zu den Integrinen aufbauen (Luo et al., 1999).

Filamin C, ein Interaktionspartner des hXirp1-L, wäre in der Lage Verbindungen zu weiteren Adapter- oder Membranproteinen aufzubauen, da auch dieses muskelspezifische Protein eine verstärkte Lokalisation in den Muskelsehnenverbindungen wie auch in den Glanzstreifen besitzt (van der Ven et al., 2000a). Filamin C wäre über seine Interaktion mit dem Sarkoglykankomplex (Thompson et al., 2000) in der Lage, hXirp1-L an diesen Transmembrankomplex zu koppeln. Der Sarkoglykankomplex ist, wie eine Reihe anderer wichtiger Transmembranproteine und -komplexe, u.a. innerhalb der myotendinosen Übergangszone verstärkt lokalisiert (Crosbie et al., 1999).

Mena und VASP, weitere Interaktionspartner von hXirp (unpublizierte Daten), bei denen es sich auch um aktinbindende und –bündelnde Proteine handelt (Bachmann et al., 1999) sind in den Glanzstreifen des Herzen lokalisiert (Gambaryan et al., 2001). Informationen über eine Lokalisation in den Muskelsehnenverbindungen liegen bisher nicht vor. Auch diese beiden Proteine sind in der Aktinfilamentorganisation wie auch Signaltransduktion involviert (Gertler et al., 1996, Walter et al., 1993). Xirp1 könnte also Mena bzw. VASP an Aktinfilamente rekrutieren.

Unter Berücksichtigung der für Xirp nachgewiesenen Aktinbindung und Stabilisierung von Aktinfilamenten sowie den Lokalisationen innerhalb der mechanisch belastbaren Adhärenzverbindungen im quergestreiften Muskel, liegt es nahe zu vermuten, daß Xirp der Stabilisierung und Verankerung der myofibrillären Aktinfilamente an diesen Lokalisationen dient.

Die mechanosensorische Komponente der genannten Adhärenzverbindungen zeigt sich gegenüber experimentell oder pathologisch veränderten mechanischen Belastungen u.a. in einer Intensivierung oder einem Abbau der Membraninvaginationen bzw. –verzahnungen des Sarkolemms (Tidball und Quan, 1992, Ehler et al. 2001, Perriard et al., 2003). Diese strukturellen Veränderungen korrelieren zudem mit den Expressionen wichtiger Adapterproteine wie Vinculin, Talin und den Cateninen (Tidball et al., 1999, Ehler et al., 2001). Die hier verstärkt lokalisierten Integrine ($\alpha7\beta1D$) stellen generell Komponenten der Signaltransduktion dar (Burrige und Chrzanowka, 1996). In Herzmuskelgewebe von Mäusen, in denen ein für die Integrität der Z-Scheibe und Glanzstreifen wichtiges Protein, das Muskel-LIM-Protein MLP, gezielt ausgeschaltet wurde, wiesen die Glanzstreifen eine Intensivierung der Membranverzahnungen auf. Weiterhin war eine Erhöhung der Expressionen von Cadherin, Catenin, Vinculin sowie N-RAP zu beobachten (Ehler et al., 2001). Inwiefern hierbei die Expression der diversen Isoformen von Xirp beeinflusst wurden ist eine interessante Frage.

Xirp ist in den Z-Scheiben der Myofibrillen präsent

Der immunologische Nachweis von Xirp innerhalb der Z-Scheiben der Myofibrillen, der schwächer als die Lokalisation in den Adhärenzverbindungen war, deutete auch hier auf einen Verankerungspunkt von Aktinfilamenten hin. Die Z-Scheibe stellt die Verbindung von zwei aufeinanderfolgenden Sarkomeren dar, in der über eine Vielzahl an direkt oder indirekt aktinbindenden Proteinen die Plus-Enden der Aktinfilamente verankert werden. Aufgrund dieser Verbindungsfunktion stellt die Z-Scheibe ein Hauptelement in der Weiterleitung der

Kontraktionskräfte, der Sarkomerassemblierung und Organisation der Myofibrille dar (Clark et al., 2002). Der molekulare Aufbau der Z-Scheibe, bei dem es sich um ein elaboriertes Proteinnetzwerk handelt, enthält neben mechanischen Strukturelementen auch Komponenten die in der Signaltransduktion involviert sind und auf Zug- oder Dehnungskräften reagieren. (Clark et al., 2002, Epstein und Davis, 2003).

Filamin C (van der Ven, 2000a) stellt hierbei einen bisher verifizierten, in den Z-Scheiben integrierten Partner von hXirp1-L dar (unpublizierte Daten).

4.3.2 Lokalisationen von ektopisch exprimiertem Xirp in Kulturzellen

Transfektionsstudien in den Glattmuskelzellen A7r5 mit den Konstrukten hXirp1-S, -L, -N, 18rM und 6rM (hXirp-rM) wiesen keine erkennbaren Unterschiede in ihren Lokalisationen auf und markierten primär Fokalkontakte und Streßfasern. Diese Lokalisationen wurden auch über repetitiven Motive per se vermittelt, wodurch weitere Agonisten und Antagonisten angenommen werden können.

Lokalisation von Xirp an Fokalkontakten

Die prominente Fokalkontaktassoziation der genannten ektopisch exprimierten hXirp1-GFP-Konstrukte wies eine Kolo-kalisation mit dem Fokalkontaktprotein Vinculin auf, wobei dieses Protein verstärkt mehr distal im Fokalplaque vertreten war. Die möglichen Interaktionspartner von hXirp Mena und VASP sind auch auch an den Fokalkontakten zu finden (Gertler et al., 1996, Reinhard et al., 1995). Gertler und Kollegen beschrieben hierbei die Lokalisation von Mena als am „Ende der Streßfasern konzentriert“ (Gertler et al., 1996).

Die Organisation der Enden der Streßfasern an den Fokalkontakten ist im übrigen beinahe analog einer Muskelsehnenverbindung. Die Streßfasern enden terminal in fingerartige Projektionen (Katoh et al., 1998), die offensichtlich für eine Verteilung der Zugkräfte sorgen. Es wäre nicht überraschend, wenn auch hier das Strukturmuster der Membraninvagination zu finden wäre.

Eine Lokalisation von hXirp-rM an den, von den Fokalkontakten unterscheidbaren, mehr zentral in der Zelle gelegenen, fibrillären Adhärenzverbindungen ist bis auf weiteres auszuschließen. Diese beobachtete, differenzierte Lokalisation weist zum einen auf die Unterscheidung beider Adhärenzverbindungen und zum anderen auf eine mögliche Funktion für hXirp hin. Beide Adhärenzverbindungen zeichnen sich z.B. durch eine unterschiedliche Komposition an intrazellulären Adapterproteinen, Integrin-Heterodimeren und extrazellulären

Matrixproteinen aus. Die fibrillären Adhärenzverbindungen sind in Aufbau und Integrität weniger abhängig von einer applizierten Zugkraft und, im Gegensatz zu den Fokalkontakten, leicht translozierbar und somit auch innerhalb der Zellen anzutreffen. Im Gegensatz hierzu weisen die eher stationären Fokalkontakte in Aufbau und Integrität eine enge Verbindung zur Kontraktilität der Zelle auf (Zamir et al., 1999, Zamir et al., 2000, Rivelino et al., 2001).

Da die fibrillären Adhäsionen über das Vinculin, das in diesen Strukturen weniger stark vertreten sein soll (Zamir et al., 1999), detektiert wurden, und hierbei keine Verstärkung des Signals für hXirp1-L hierbei auftrat, ist dies auch als mögliches Indiz zu werten, daß keine Interaktion zwischen Vinculin und hXirp1-L vorhanden ist.

Die Lokalisation von hXirp wies somit wiederum auf mechanisch belastbare Adhärenzverbindungen.

In nahezu allen Transfektionsstudien fanden sich keine Hinweise, daß eine Überexpression von hXirp (rM)-Konstrukten einen Einfluß auf die Fokalkontaktmorphologie bzw. -größe besaß. Das Polypeptid hXirp1-CPP-CC, das die C-terminal gelegene prolinreiche Sequenz sowie die Heptadensequenz umfaßte, führte zu einem retrahierten Phänotyp und verlängerten, spitzen Fokalkontakten. Das Polypeptid lokalisierte an den Fokalkontakten und Streßfasern.

Die ektopisch exprimierte Proteine bzw. Polypeptide hXirp1-S, -L sowie -rM waren an Lokalisationen zu finden, in denen Aktinfilamente terminal verankert werden und eine Verbindung zur Extrazellulärmatrix besteht. Des weiteren stellen Fokalkontakte Orte dar, auf denen relativ starke Zugkräfte lasten, denen widerstanden wird und die auf eine extrazelluläre Matrix weitergeleitet werden. Es ist anzunehmen, daß Xirp über die Bindung und Stabilisierung der F-Aktin in der Lage ist, an diesen mechanisch beanspruchten Zonen für eine Integrität der Aktinfilamente zu sorgen. Aufgrund der Multidomänenstruktur von hXirp darf davon ausgegangen werden, daß noch weitere Helferproteine rekrutiert werden.

Lokalisation von Xirp in Streßfasern

Analog zu den immunologisch detektierten Lokalisationen von Xirp in den Z-Scheiben der Myofibrillen von Muskelgewebe, lokalisierten in den A7r5-Zellen ektopisch exprimierte hXirp1-rM Konstrukte sowie Polypeptide mit prolinreichen Sequenzmotiven und Filamin-C-Bindungs-Domänen an Streßfasern und wiesen neben einer durchgängigen Markierung auch eine perlschnurartige Verteilung auf. Durch die Kollokalisierung mit α -Aktinin waren diese speziellen Lokalisationen als „dense bodies“ identifiziert (Small und Gimona, 1998).

Trunkierte Konstrukte wie hXirp1-NPP und -NPPDBD, welche die beiden N-terminal gelegenen prolinreichen Domänen darstellen und deren Interaktion mit Mena verifiziert

werden konnte (unpublizierte Daten), lokalisierten klar in den „dense bodies“ der Streßfasern. Im Gegensatz zur Lokalisation von Mena bzw. VASP an den Fokalkontakten (Reinhard et al., 1995, Gertler et al., 1996) ist deren Lokalisation in den „dense bodies“ entlang der Streßfasern nicht sicher beschrieben. So beobachteten Reinhard et al. eine „punktartige Struktur entlang der Streßfasern“ (Reinhard et al., 1995), die in anderen Publikationen nicht mehr beschrieben wird. Da für die Konstrukte hXirp1-NPP und -NPPDBD keine Fokalkontaktassoziation beobachtet wurde, sind weitere Interaktionspartner für diese prolinreichen Sequenzen annehmbar.

Die deutlichere Lokalisation des, um die putative DNA-Bindungssequenz (DBD) erweiterten, Konstruktes hXirp1-NPPDBD an den „dense bodies“ ist möglicherweise auf die basischen Aminosäuren innerhalb der DBD zurückzuführen. Cluster von basischen Aminosäuren stellen mögliche Interaktionsmodule für F-Aktin dar (Amann et al., 1998). Vorstellbar ist generell auch, da es sich bei beiden Konstrukten um relativ kurze Polypeptide von 54 (hXirp1- NPP) bzw. 89 (hXirp1- NPPDBD) Aminosäuren handelte, daß diese kurzen Sequenzen nicht entsprechend falteten und/oder durch das C-terminal fusionierte GFP beeinflusst wurden.

Die ektopisch exprimierten Polypeptide hXirp1-Y sowie hXirp1-FC, welche die C-terminalen, Filamin C –bindenden Sequenzen des hXirp1-L enthielten, lokalisierten in A7r5-Zellen entlang der Streßfasern an den „dense bodies“. Die Lokalisation wird hier möglicherweise über eine Interaktion mit den ubiquitär exprimierten Filaminen A und B bewirkt (van der Flier et al., 2002). Vorläufige Ergebnisse weisen auf eine Interaktion mit dem Filamin B hin (unpublizierte Daten). Weiterhin wiesen diese Kontrukte aggregatartige Lokalisationen entlang der Streßfasern auf.

4.4 Xirp – Implikationen in Myogenese und Myofibrillogenese

Die Untersuchungen der zeitlichen und räumlichen Expression von Xirp in kultivierten, humanen Skelettmuskelzellen (HSkM) sowie myogenisierten Glattmuskelzellen der Ratte, A7r5, wiesen Xirp als frühes Markerprotein der Myogenese aus. Die Expression von Xirp setzte hierbei mit dem Differenzierungsprozeß in HSkM oder einer über MyoD Transfektion vorangetriebenen Myogenisierung der A7r5-Zellen ein. MyoD stellt einen frühen Transkriptionsfaktor der Myogenese der quergestreiften Muskulatur dar (Smith et al., 1994). Wang und Kollegen wiesen nach, daß die für die Herzdifferenzierung spezifischen Transfriptionsfaktoren MEF-2C und Nkx2.5 die Promotorregion des cXin aktivierten. In

diesem Zusammenhang sei auch auf die sehr frühe Expression des cXin im präkardialen Mesoderm und den Myotomen der Somiten hingewiesen (Wang et al. 1999).

Unklar ist bisher, ob differenzierte Expressionen der Spleiß- bzw. paralogen Isoformen von Xirp1 bzw. Xirp2 vorliegen. Die über einen Westernblot nachgewiesene Expression beider Spleiß-Isoformen des humanen Xirp1 in HSkM begann mit dem Eintritt in die Differenzierung und verstärkte sich im Laufe des Prozesses, um voraussichtlich ein gleichbleibendes Niveau zu erreichen. Möglicherweise kommt es zu einer Abnahme der Expression der großen Spleiß-Isoform hXirp1-L. Die Expression des hXirp2 wurde hierbei nicht untersucht.

Da die mit dem Antiserum α X1rep durchgeführten immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an differenzierenden und differenzierten HSkM-Zellen, vorraussichtlich beide hXirp1-Isoformen zeigten, bleibt die Frage nach einer differenzierten Lokalisation der Isoformen vorerst ungeklärt. Xirp lokalisierte in frühen, differenzierenden Myoblasten an Fokalkontakten und SFLS. Diese Expression lag unmittelbar vor der Expression des (sk)- α -Aktinin. In den Myotuben verlor sich offensichtlich die Fokalkontaktassoziation und Xirp lokalisierte mit den Prämyofibrillen. Hier konnte eine Kolo-kalisation mit dem (sk)- α -Aktinin beobachten werden, die mit Fortschreiten der Myofibrillogenese und verstärkter Lokalisation an (sk)- α -Aktinin abnahm. Generell war eine mit fortschreitender Differenzierung und Myofibrillogenese abnehmende Lokalisation des Xirp in den Prämyofibrillen beobachtbar. In naszierenden und quergestreiften Myofibrillen war Xirp kaum oder gar nicht detektierbar. Dies ist ein Ergebnis, das vorerst im Widerspruch zur Lokalisation im adulten Muskelgewebe steht, da hier eine Lokalisation von Xirp in den Z-Scheiben detektiert wurde. Vermutlich weist dies auf die, im Vergleich zu den Membran-Verankerungspunkten der Myofibrillen, generell schwächere Präsenz von hXirp in den Z-Scheiben hin.

In durch MyoD myogenisierten Glattmuskelzellen war die Expression des endogenen rXirp schon 12 Stunden (weniger nicht untersucht) nach Beginn einer Transfektion mit MyoD detektierbar. Das rXirp1 (der Ratte), dessen Expression mit der Zeit der Kultivierung zunahm, lokalisierte primär an den Fokalkontakten mit einer schwächeren Markierung der SFLS. Überexprimiertes hXirp1-S wies in myogenisierten A7r5 die gleichen Lokalisationen auf und zeigte eine Verringerung der Lokalisation an naszierenden, Titin-positiven, Myofibrillen. Die durch den Prozeß der Myogenese vergrößerten, fiederförmigen Fokalkontakte wurde durch eine Überexpression mit hXirp1-S nicht beeinflußt.

Die in den humanen Skelettmuskelzellen durchgeführten Transfektionsstudien zeigten Xirp1-L und hXirp1-N ausschließlich an den Fokalkontakten und Enden der Prämyofibrillen

bzw. Myofibrillen – ein Ergebnis das in Einklang mit den Beobachtungen in den myogenisierten A7r5-Zellen steht.

In mit hXirp1-S, -L und -N transfizierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte wurden allerdings keine Fokalkontaktassoziationen beobachtet. Die Konstrukte lokalisierten (ähnlich wie in den HSkM-Zellen) an den prämyofibrillären longitudinalen Enden der Myofibrillen, an denen sarkomere Proteine wie Titin und Myomesin nicht präsent waren und eine Querstreifung fehlte. Ein schwächerer Anteil der oben genannten hXirp1 Konstrukte wies eine Lokalisation innerhalb dieser Myofibrillen in den Z-Scheiben auf (E. Ehler, unpublizierte Daten). Womöglich spiegelt die Fokalkontaktassoziation der Konstrukte in den HSkM und myogenisierten A7r5 ein frühes Differenzierungsstadium wieder, deren Ursachen auf Kultivierung, die Transfektion per se zurückzuführen sind. Desweiteren sei daraufhingewiesen, daß bei einer Expression in Kardiomyozyten schon quergetreifte und kontraktile Myofibrillen präsent sind, wohingegen sich diese in HSkM-Zellen erst entwickeln müssen.

Da in HSkM-Zellen wie auch myogenisierten A7r5-Zellen, die Verringerung der Lokalisationsstärke von Xirp an Vorläufern der Myofibrillen im Zusammenhang mit der Differenzierung und einer verstärkten Lokalisation von sarkomeren Proteinen, wie Titin und (sk)- α -Aktinin, standen, ist anzunehmen, daß Xirp ein Vorläuferprotein in der Myofibrillogenese darstellt. Die Lokalisationen an Fokalkontakten, SFLS oder Prämyofibrillen implizieren eine Funktion des Proteins in diesem Prozeß. Inwiefern hierbei die verschiedenen Isoformen des Xirp involviert sind oder eine Überexpression von Xirp ein Fortschreiten der Myofibrillogenese behindert, sollte in einem geeigneten Zellsystem, wie den embryonalen Kardiomyozyten, überprüft werden.

Ein derartiger, negativer Effekt wurde beispielsweise in Transfektionen mit N-RAP in embryonalen Kardiomyozyten des Huhns beschrieben, bei der eine Inhibierung der Myofibrillogenese, in Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Transfektion, beobachtet werden konnte (Carroll et al., 2001). In kultivierten, embryonalen Kardiomyozyten der Ratte kolokalisierten N-RAP zusammen mit hXirp1 an Prämyofibrillen und longitudinalen Enden der Myofibrillen (E. Ehler, unpublizierte Daten). N-RAP, so beschreiben Carroll und Horowitz, befindet sich in „spreading cultures“ von embryonalen Hühner-Kardiomyozyten an der Peripherie der Zellen; zusammen mit frühen Markern der Myofibrillogenese (Carroll und Horowitz, 2001). Ob dieser Umstand analog der in-vivo Situation der Myofibrillogenese im Embryo ist, wurde bisher nicht geklärt. Die Myofibrillogenese, die in der Peripherie der Zellen induziert wird (Dabiri et al., 1997, Sanger et al., 2002, Du et al., 2003), steht in engem

Zusammenhang mit der Expression von Transmembranproteinen. N-Cadherin spielt in der Differenzierung der Skelettmuskels- (George-Weinstein et al., 1997) und Herzens (Linask et al., 1997) eine wichtige Rolle. Das mXin, so wiesen Sinn et al. mittels Immunpräzipitation nach, ist offensichtlich in diesem Cadherin-Catenin-Komplex involviert (Sinn et al., 2002). Analog zu mXin werden für N-RAP Verbindungen zum Cadherin-Catenin Komplex postuliert (Zhang et al., 2001) und Interaktionen mit Talin und Vinculin sollen desweiteren für eine Verankerung an die Integrine sorgen (Lou et al., 1999).

Weiterhin ist mXin in embryonalen Herzen der Maus peripher in den Kardiomyozyten lokalisiert, wo seine Lokalisation auf Cadherin vermittelte Zell-Zell-Kontakte hinweist (Wang et al., 1999, Sinn et al., 2001).

Aufgrund der Multidomänenstruktur von Xirp sollten weitere Bindungspartner angenommen werden. Für hXirp1-L stellt das muskelspezifische Filamin C einen Bindungspartner dar (unpublizierte Daten). Filamin C, dessen Expression mit der Differenzierung in HSkM-Myoblasten einsetzt und während der Myofibrillogenese mit dem (sk)- α -Aktinin in Prämyofibrillen und Myofibrillen kolokalisiert, weist auf eine Funktion für das Protein in diesem Prozeß hin (van der Ven et al., 2000a). Weiterhin beschrieben Thompson und Kollegen eine Interaktion des Filamin C mit dem Sarkoglykankomplex, einem Transmembranproteinkomplex der zusammen mit dem Dystroglykankomplex für eine Verankerung des Aktinzytoskeletts mit der extrazellulären Matrix sorgen soll (Thompson et al., 2000).

Mena und VASP, weitere Bindungspartner von hXirp1 sind im adulten Herzmuskel (der Ratte) innerhalb der Glanzstreifen lokalisiert und weisen eine Verringerung ihrer Expression in diesem Gewebe vom neonatalen zum adulten Tier auf (Gambaryan et al. 2001). Untersuchungen zur Lokalisation von Mena/VASP während der Myofibrillogenese dürften deshalb aufschlußreich sein, da beide Proteine neben der Aktinfilamentorganisation (Bear et al., 2002, Gertler et al., 1996) auch in der Signaltransduktion eine Rolle spielen (Walter et al., 1993); ein Prozeß, der für die Myofibrillogenese nicht unbedeutend sein dürfte.

Die Myofibrillogenese stellt ein wichtiges Ereignis während der Morphogenese des Muskels dar und bedarf selbstverständlich einer räumlich und zeitlichen Organisation. Für cXin zeigten Wang et al., daß eine Inhibierung der Expression in Hühnerembryonen die Morphogenese vom geraden Herzschlauch zum gekammerten Herzen verhindert. Das cXin stellt also ein überaus wichtiges Protein in der Herzmorphogenese dar (Wang et al. 1999). Während des „Looping“-Prozesses, der zu einer Beugung des geraden Herzschlauches zu einem C und weiter zu einer Annäherung der Enden des Herzschlauches führt (Männer,

2000), wird cXin verstärkt im Myokard der inneren Krümmung exprimiert (Wang et al., 1999). Die Faktoren der Kardiogenese schließen die extrazelluläre Matrix, den Blutfluß sowie die Kardiomyozyten selbst ein, so daß hier möglicherweise auch der höhere Differenzierungsstatus Kardiomyozyten in der inneren Krümmung und somit eine Kontraktionsfähigkeit involviert ist (Männer, 2000).

Xirp stellt einen frühen Marker der Myogenese von Skelett- und Herzmuskel dar. Die frühe Expression und die peripheren Lokalisationen während der Differenzierungsprozesse in Kardiomyozyten des embryonalen Herzens und kultivierten Muskelzellen weisen auf eine Funktion der Xirp-Familie in diesen Prozessen hin, die sich auch auf die Morphogenese des Herzens auswirkt.

Die Myofibrillogenese stellt einen dramatischen Umbauprozess des Aktinzytoskeletts in differenzierenden Myoblasten dar, in der Adaptorproteine für eine zeitliche und räumliche Organisation dieses Ereignisses sorgen. Die Familie der Xirp-Proteine stellt hierbei potentielle Kandidaten dar, die durch ihre frühe Expression, sowie Multidomänencharakter in Frage kommen. Die präferentielle Bindung von hXirp1 an F-Aktin sorgt möglicherweise für eine Rekrutierung weiterer wichtiger Proteine wie Filamin, Mena und VASP. Mit Verbindungen zu Transmembranproteinen wie Cadherinen (Sinn et al. 2002), Integrinen (via Filaminen, van der Flier et al., 2002) oder Sarkoglykanen (via Filamin C, Thompson et al. 2000) ließe sich hXirp1-L als vielseitiges Verbindungsmodul zwischen F-Aktin und Membran und letztlich der extrazellulären Matrix in Betracht ziehen.

4.5 Fazit und Ausblick für Xirp

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei humane Varianten des von Wang et al, 1999 erstmals beschriebenen Proteins Xin (Huhn und Maus) über Sequenzanalyse, Transfektionsstudien, Immunfluoreszenzmikroskopie und biochemischer Analyse näher charakterisiert.

Am Beispiel des humanen Xin related proteins -hXirp1 und 2 wurde stellvertretend für die Familie der Xirp Proteine gezeigt, daß es sich bei den, diese Familie charakterisierenden, repetitiven Motive um neuartige F-Aktin bindende Sequenzmotive handelt. Da sich die Bindung stabilisierend auf das F-Aktin auswirkt, ist anzunehmen, daß die Motive, bestehend aus jeweils (mindestens) 16 Aminosäuren, lateral entlang des F-Aktins binden. Die biochemische Analyse der F-Aktinbindung weist auf 3-4 Motive pro Aktinmonomer hin.

Das Protein ist im quergestreiften Muskelgewebe verstärkt in der Muskel-Sehnen-Verbindung des Skelettmuskels und im Glanzstreifen des Herzmuskels präsent. Zu geringerem Anteil findet sich hXirp1 innerhalb der Myofibrillen in den Z-Scheiben.

Ektopische Expressionen in Kulturzellen zeigen hXirp1 an den Fokalkontakten und Streßfasern. Die biochemische F-Aktin-Bindungsdaten und die Präsenz von hXirp1 in Lokalisationen, die der Verankerung von Aktinfilamenten und der Kraftübertragung auf eine extrazelluläre Matrix dienen, lassen den Rückschluß zu, daß Xirp selbst in der Verankerung und Stabilisierung der Aktinfilamente in den betreffenden Lokalisationen beteiligt ist.

Xirp stellt außerdem ein potentiell vielseitiges Adapterprotein für weitere Proteine dar, da innerhalb der Primärsequenz eine Vielzahl potentieller Protein-Protein-Interaktionsmodule präsent sind. Weitere Interaktionspartner sorgen vermutlich für eine Verbindung zu Transmembranproteinen und somit zur extrazellulären Matrix. Hierbei sind vorerst Filamin (B und C) (unpublizierte Daten) sowie Proteine des Cadherin-Catenin-Komplexes (Sinn et al., 2002) zu nennen. Interaktionspartner wie Mena und VASP (unpublizierte Daten) könnten der Rekrutierung von Proteinen dienen, die im Umbau bzw. Reparatur (Polymerisation) von Aktinfilamenten beteiligt sind und somit zu einer Stabilisierung der beanspruchten Aktinfilamente beitragen.

Die frühe Expression und unterschiedliche Lokalisation von Xirp (bzw. Xin) während verschiedener Stadien der Myogenese in kultivierten Muskelzellen (diese Arbeit) und in Kardiomyozyten von Huhn und Maus (Wang et al., 1999, Sinn et al., 2002) implizieren eine Funktion der Xirp-Familie in der Myogenese und nicht zuletzt der Morphogenese (Sinn et al. 2002). Das Protein lokalisiert an den Prämyofibrillen in der Peripherie in kultivierten Humanen-Skelettmuskel-Zellen.

Die Lokalisation in den Glanzstreifen des Herzens wirft eine interessante Frage auf, die sich auf die kommende Herstellung von transgenen Mäusen richtet, in denen das/die Gen(e) für mXin oder mXirp2 gezielt ausgeschaltet wurde. Es wird angenommen, daß eine Schwächung von Zytoskelettstrukturen, die in der Verankerung der Myofibrillen, und somit der Kraftübertragung beteiligt sind zu einer Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führt (Chien, 1999, Periard et al., 2003). Diese Form der Kardiomyopathie ist u.a durch dünne Ventrikelwände und verstärkte Verzahnungen der Glanzstreifen gekennzeichnet (Periard et al., 2003).

Inwiefern in den oben genannten Prozessen und Lokalisationen die einzelnen Isoformen Xirp1 (Xin) und Xirp2 bzw. deren mögliche Spleiß-Isoformen eine Rolle spielen, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Experimentelle Daten unseres Labors sowie Einträge in biologischen Datenbanken weisen darauf hin, daß es sich bei der Familie der Xirp-Proteine um eine vielseitige, aus verschiedensten alternativen Spleiß-Isoformen bestehende, Familie handelt. Kombinationen der funktionellen Domänen führen so zu Xirp-Isoformen, deren Funktionen innerhalb des komplexen Aktinzytoskeletts noch zu untersuchen sind. So ist das für diese Familie charakteristische Element - die repetitiven Motive – in einigen putativen Isoformen womöglich komplett herausgespleißt.

5 Anhang

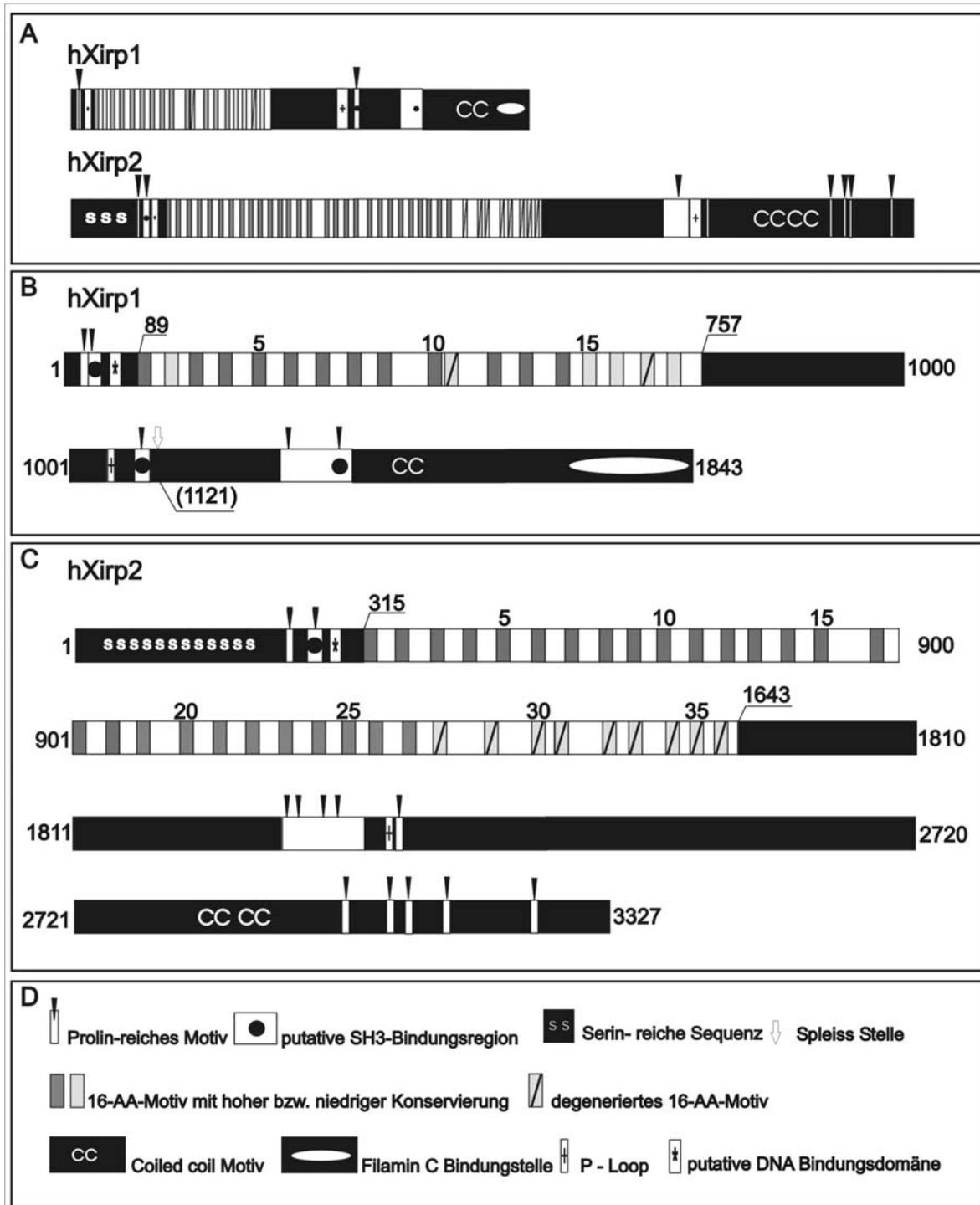


Abb. 44 Schematische Darstellung von humanem hXirp1 und hXirp2

Gesamtansicht von hXirp1 und hXirp2, B) Detailansicht zu hXirp1 und C) hXirp2 mit bisher erkannten putativen und verifizierten Motiven und Domänen, die in B) und C) angegebenen Zahlen stellen jeweils die Aminosäureposition dar. D) Legende der in A, B und C verwendeten Symbole

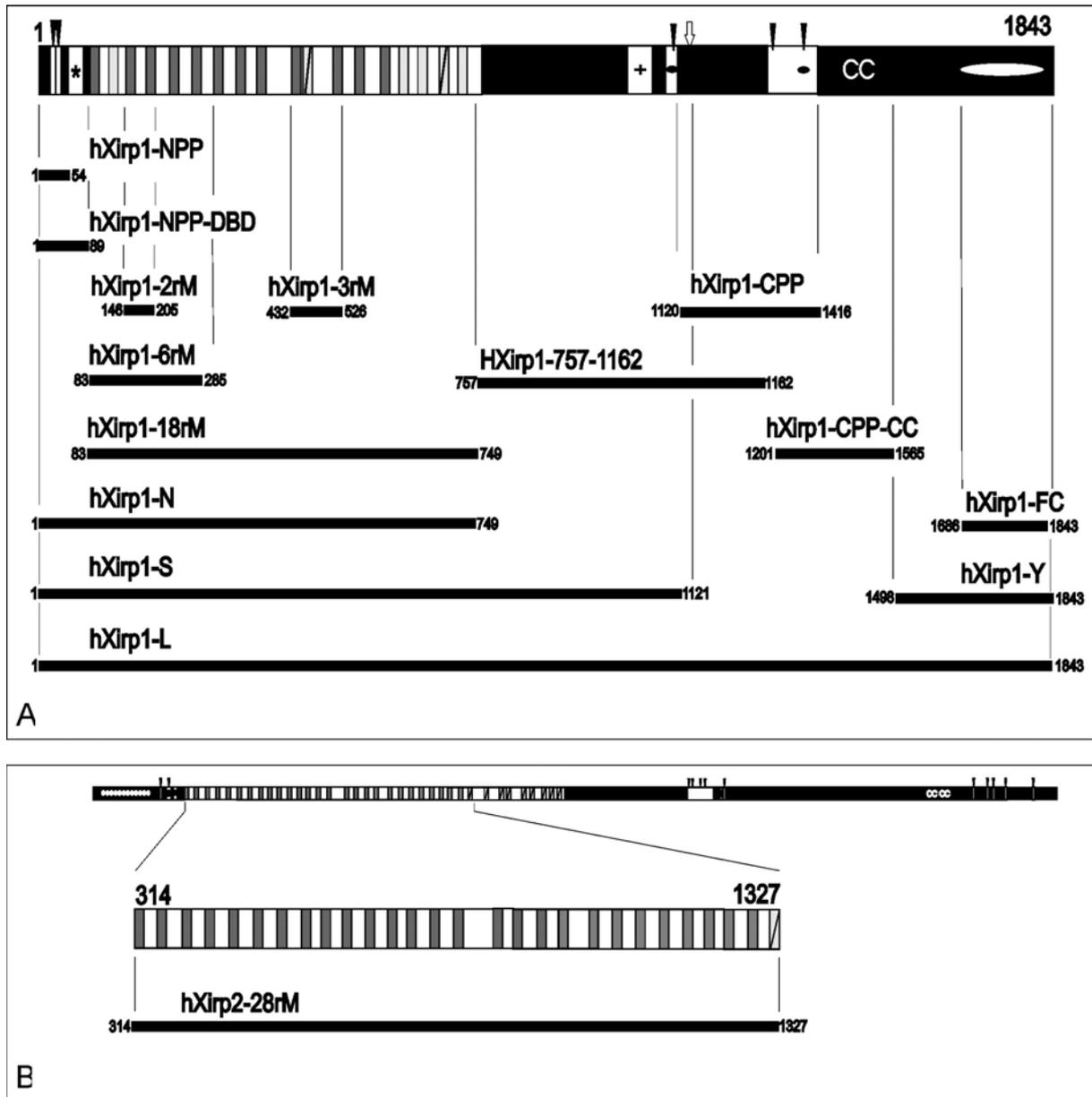


Abb. 45 Schematische Übersicht der hergestellten hXirp-Konstrukte

Die hergestellten Konstrukte für hXirp1 sind unter A) und für hXirp2 unter B) dargestellt. Die Konstruktgrenzen und Bezeichnungen beziehen sich auf die schematische Darstellung des Proteins. Die schematischen Übersichten von hXirp1 bzw. 2 stimmen mit Abb.4.1-1 überein. Die Bezeichnungen der Konstrukte sind über dem Balken angegeben. Die Zahlen links und rechts der Balken beziehen sich auf die jeweilige N- bzw. C-terminale Position des Konstruktes innerhalb der Gesamtsequenz. Die Balken entsprechen der Größe des jeweiligen Konstruktes, deren abgekürzte Namen auf die Besonderheiten hinweisen: so steht PP für prolinreich, DBD für DNA-bindende Domäne (putativ), N für N-terminal, C für C-terminal, CC für Coiled coil, F für Filaminbindung und Y für den aus dem Hefedoppelhybridexperiment gezogenen Klon. Die rM stehen für die repetitiven Motive und S bzw. L für die kurze bzw. lange hXirp1 Variante.

Aminosäuresequenz für hXirp1						
1	MADTQTQVAP	TPTMRMATAE	DI <u>PLPPP</u> AL	EDI <u>PLPPP</u> KE	SFSKFHQQRQ	ASELRRLYRH
61	IHPELRKNLA	EAVAEDLAEV	LGSEEPTEGD	VQCMRWIFEN	WRLDAIGEHE	RPAAKEPVLC
121	GDVQATSRKF	EEGSFANSTD	QEPTRPQPGG	GDVRAARWLF	ETKPLDELTG	QAKELEATVR
181	EPAASGDVQG	TRMLFETRPL	DRLGSRPSLQ	EQSPLELRSE	IQELKGDVKK	TVKLFQTEPL
241	CAIQDAEGAI	HEVKAACREE	IQSNARSAR	WLFETRPLDA	INQDPSQVRV	IRGISLEEGA
301	RPDVSATRWI	FETQPLDAIR	EILVDEKDFQ	PSPDLIPPGP	DVQQQHLFE	TRALD TLKGD
361	EEAGAEAPPK	EEVVPGDVRS	TLWLFETKPL	DAFRDKVQVG	HLQRVDPQDG	EGHLSSDSSS
421	ALPFSQSAPQ	RDELKGDVKT	FKNLFETLPL	DSIGQGEVLA	HGSPSREEGT	DSAGQAQGIG
481	SPVYAMQDSK	GRLHALTSVS	REQIVGGDVQ	GYRWMFETQP	LDQLGRSPST	IDVVRGITRQ
541	EVVAGDVGTA	RWLFETQPLE	MIHQREQQER	QKEEGKSQGD	PQPEAPPKGD	VQTIRWLFET
601	CPMSELAEKQ	GSEVTDPTAK	AEAQSCWTF	KPQPVD RPVG	SREQHLQVSQ	VPAGERQTRD
661	HVFETEPLQA	SGRPCGRRPV	RYCSRVEIPS	GQVSRQKEVF	QALEAGKKEE	QEPRVIAGSI
721	PAGSVHKFTW	LFENCPMGSL	AAESIQQGNL	LEEQPMSPSG	NRMQESQETA	AEGTLRTLHA
781	TPGILHHGGI	LMEARGPGEL	CLAKYVLSGT	GQGH PY IRKE	ELVSGEL PRI	ICQVLR RPDV
841	DQQGLLVQED	PTGQLQLKPL	RL PTPG SSGN	IEDMD PEL QQ	LLACGLGTSV	ARTGLVMQET
901	EQGLVALTAY	SLQ PRL TSKA	SERSSVQLLA	SCIDKGDLSG	LHSLRWE PPA	DSPVP ASEG
961	AQSL HP TESI	IHV PP LD PSM	GMGHLRASGA	TPCPP QAIGK	AV PL AGEAAA	PAQLQ NTEKQ
1021	EDSHSGQ KGM	AVLGK SEGAT	TT PPGP APD	LLAAMQSLRM	ATAEAQSLHQ	QVLNKH KQGP
1081	TP TATSN PIQ	DGLRKAGATQ	SNIR PGG SD	PRIPAARKV	SREEQAL PRG	LP GGVWTIQD
1141	GIYTA HP V VRT	FD PP GGVQLS	QRE PQ SRHRE	TALSVQ APR	LQGG PG QSTG	PG REE PP GGCT
1201	QMAWG PP GKA	MAEVC PG GLQ	AAETTLKT AP	LGRHILASGP	QAAGAS PHP	NAFV PPPP TL
1261	PA AVT GP DF P	AGAHRAEDSI	QQASE PL K DP	LLSHSS PAG	QRT PG GSQTK	TP KL D PTMPP
1321	KKKPQLPPK	AHLTQSH PPQ	RL PKPLPLS	SFSSEVGQRE	HQRGERTAI	PQ PAKV PTTV
1381	DQGH I PLARC	PS GH SQ PSLQ	HGLSTT APR	TKNQATGSNA	QSSE PP KLNA	LNHD PT SPQW
1441	GP PSGE QP	EGSHQ GAPS	PDS LQ RN QKE	LQGLLNQVQA	LEKEAASSVD	VQALRRLFEA
1501	VP QLGGA APQ	AP AAHQ KPEA	SVEQAFGELT	RVSTEVAQLK	EQTLARLLDI	EEAVHKALSS
1561	MSSLQ PE ASA	RGHFQ PP KD	HSAHKISVTV	SSSAR PS SGS	QEVGGQ TAVK	NQAKVECHTE
1621	AQSQVKIRNH	TEARGHTAST	AP STRQ ETS	REYLC PP RVL	PSS RDS PSS	TFISIQSATR
1681	K PLET PS FKG	NP DVSVKSTQ	LAQDIGQALL	HQKGVQDKTG	KKDITQCSVQ	PE P PP SASP
1741	L PRGWQKSVL	ELQ TG PGSSQ	HYGAMRTVTE	QYEEVDQFGN	TVLMSSTV T	EQAE PP R NP PG
1801	SHLGLHAS PL	LRQFLHS PAG	FSSDLTEAET	VQVSCSYS QP	AAQ	

Abb. 46 Aminosäuresequenz für hXirp1

In Fettdruck sind repetitive 16-AS- Motive und Proline eingetragen. Mögliche prolinreiche Motive aus Tab. 4.1.4 sind eingekästelt. Die putative DNA-Bindungsstelle ist kursiv gesetzt und unterstrichen. Die putative ATP bzw. GTP Bindungsstelle ist in kursiv und Fettdruck dargestellt. C-terminal der Aminosäure Lysin **K** auf Position 1119 unterscheiden sich die verschiedenen Spleißvarianten für hXirp1. Die kurze Variante hXirp1-S endet nach diesem Lysin in zwei Leuzinen.

Vorläufige Aminosäuresequenz für hXirp2

1 MARYQAAVSR GDCRSFSANM MEESEMCAVP GGLAKVKKQF EDEITSSRNT FAQYQYQHQN
 61 QEAIHSSQVG TSRSSQEMAR NEQEGSKVQK IDVHGTEMVS HLEKHTEEVN QASQFHQYVQ
 121 EVIDTPEDEE IPKVSTKLLK EQFEKSAQEK ILYSDKEMTT PAKQIKSEEE TFKPSSVST
 181 SSTSCVSTSQ RKETSTTRY S DHSVTSSTLA QINATSSGMT EEF**PPPPD**V LQTSVDVTAF
 241 SQS**PELPSPP** RRLE**V**PKDVY SKQRNLYELN *RLYKHPELRK* NLEKDYISEV SEIVSSQMSN
 301 GSSVS**ADVQQ** ARYVFENTND **SSQ**KDLNSER EYLEWDEILK **GEVQSIRWIF** ENQPLDSINN
 361 GSPDEGDISR GIADQEIIAG **GDVKYTTWME** ETQPIDTLGA YSSDTVENAE KIPELARGDV
 421 **CTARWMFETR** PLDSMNKMHQ SQEESAVTIS KDITGGDVKT **VRYMFETQHL** DQLGQLHSVD
 481 EVHLLQLRSE LKEIKGNVKR **SIKCFETQPL** YVIRDSGQOM LEIKTVHRED VEKGDV**RTAR**
 541 **WMFETQPLD**T INKDITEIKV VRGISMEENV KGGVSKAKWL **FETQPLEKIK** ESEEVIEKE
 601 KIIGTDVSRK **CWMFETQPLD** ILKEVPDADS LQREEIIGGD **VQTTKHLFET** LPIEALKDSP
 661 DIGLKLQKITA SEEEKGDVRH **QKWIFETQPL** EDIRKDKKEY TRTVKLEEVN **KGDVKNYTHI**
 721 **FESNNLIKFD** ASHKIEVEGV TRGAVELNKS **LFETTPLYAI** QDPLGKYHQV KTVQQEELVR
 781 **GDVRSRCLWF** ETRPIDQFDE SIHKFQIRG ISAQEIQTGN **VKSAKWLFET** QPLDSIKYFS
 841 DVEETESKTE QTRDIVKGDV **KTCKWLFETL** PMESLYEKVS LMTSSEEIHK **GDVKTCTWLF**
 901 **ETQPLDTIKD** DSETAVKLQT VKQEEIQGGD **VRTACFLFET** ENLDSIQGEE VKEIKPVEMD
 961 IQAGDVSSMR **YKFENQSLDS** ISSSSEEVLK KIKTLKTEDEI **QKGNVLCRW** LFENQPIDKI
 1021 KESQEGDECV KTVTDIQGGD **VRKGCFFIFET** FSLDEIKEES DYISTKKTIT EEVIQGDVKS
 1081 **YRMLFETRPL** YAIQDREGSY HEVTTVKKEE VIHGDVRGTR **WLFETKPLDS** INKSETVYVI
 1141 KSVTQEDIQK **GDVSSVRYRE** ETQPLDQISE ESHNIMPSID HIQGGNVKTS **RQFFSENEFD**
 1201 KNNYIRTVSV NEIQKGNVKT **STWLFETHM** DELRGEGLY ENIKTVTQED **VQKGDVQAV**
 1261 **WLFENRTFDS** IMEAHGKITK MTKEEIPPSD **VKTTTWLFET** TPLHEFNETR VEKIEIIGKS
 1321 IKETLEDLYS QKVIQAPGII IEADEIGDVR **MAKYKLMNQA** SPEIQKEEII RADLRNIMVN
 1381 LLSKRDCRTER EILISEEEKG NVNLTKTQLL NRSTEFHAEK EEIVKGDV**QQ** AIKNLFSEER
 1441 **SVKKGILIQE** DEKGDINMTI YCLLHENDGD TIREEVIGG **DVKRTIHNLL** SSTSNNKISE
 1501 RAKIDASERG **NVQFFTCIE** AGALDYLKQL HTESNETLTA KKQEGEKEII **GGDVEGTEKLL**
 1561 **LKKRQSLVER** TVSETDIIPG **DVHNTVKVEM** TEPQSTFGKI PKEEIIK**GDL** TSTLNSLSQA
 1621 **VNQKTVTKTE** EIIKGNMLAT LKSLKESHR WKESKQ**PAI** PGDIEKAIEC LEKATNTKTE
 1681 ILKKELLKDD LETSLRSLKE AQRSFKEVHK EGVIKKAKA VMAGSSGEQK TDIHQVAVQR
 1741 NKNSLLQ**KP** GPFEPAAKWQ GGADTL**SQM** GKSGHNLVE ERTEVN**LPA** PKGTVKIVID
 1801 RQNNDALEK SLRRLNSHH KSNVLESQDK TGVWTD**TGE** QHLRDEYMSR QLTSTVSVKN
 1861 NLTTKESDRA VRELKDDVF NSIQSAGTV GKQTYELRN DHQKMEGFHI KSPKTKNIK
 1921 ILTDTQSS**KP** SPTQHPV**SMP** VGGTYDLSDG FQKQTL**LQE** TKYSNKDIKK KNINLQ**PMWQ**
 1981 LL**PVEQD**TSN VTEMKVSEKS HNTFKATNKK RETDVHLK**SQ** DFLMKTNTST GLKMAMERSL
 2041 **NP**INFNPENN VKESE**CPLPP** **PSPPPPPP**SN ASSEIEF**PLP** **PPPP**LMMFPE KNGFL**PSLST**
 2101 EKIKAEFESF **PGLPLPPPP**V DEKSERESS MFL**PPPPPT** **PSQK**PAHLLS SSAPEKHS**GD**
 2161 FMQQYSQKEA SNSQNS**QAKI** **ITGKTGVL****PP** **PTLKP**K**KL****PK** HIKDNKND**FS** PKVELATSLS
 2221 DMECKITTSK DQKKVMVMTS SEHTETQNV ISKSLDERKQ LSIDSANCL**S** HTVPGTSAPR
 2281 KKQIAPLIK**S** HSFPESSGQ**Q** **NP**KPYMRKFK **TPL**MIAEEKY RQOKEEIEKQ KQESSY**NIV**
 2341 KTQSQNHIT EVEKEM**PLQ**K TNEEVSLSGI DSECTV**VQPS** PGSQSNARIL GVCSDN**QLST**
 2401 TSPETVA**AKR** LHHVLAASED KDKMKKEVLQ SSRDIMQSKS ACEIKQSHQ**E** CSTQQTQ**QK**
 2461 YLEQLHL**PQS** KPISPNFKVK TIKL**PTL**DHT LNETDHSY**ES** HKQQSEIDVQ TFTTKQY**LKT**
 2521 KKTEASTECS HKQSLAERHY QL**PK**KEKRV**T** VQL**PT**ESI**Q** NQEDK**LKMVP** RKQREFSGSD
 2581 RGK**LP**GSE**EK** NQ**GP**SMIGRK EERLITERKH EHLKNKS**APK** VVKQKVIDAH LDSQTQ**NFQQ**
 2641 TQIQTAESKA EHK**KL**Q**PYN** SLQEEKCLEV KGIQEKQV**S** NTKDSKQ**EIT** QNK**SFF**SVK
 2701 ESQRDDG**KGA** LNIVEFLRKR EELQ**QIL**SRV KQFEAEP**NKS** GLKTFQ**TLLN** T**IP**GWLISE
 2761 KREYAVHIAM ENNLEK**VKEE** ITHIKTQ**AED** MLVSYENI**IQ** TAMMSK**TGK** **PG**N**KPT**SLDE
 2821 TSSKVS**NVHV** SNNK**SEQKE** NKIAKE**TVQ** HQVA**AH**HEAT VRSHV**KTHQE** IKLDD**SNIP****PE**
 2881 **PSL**K**TRPP****SE** TFI**TI**ESTAR RTEN**PT**KNEL SQS**PK**KDSYV E**PP**RR**PM**MSQ KSEIHRANTS
 2941 **PSPP**RSR**SEQ** LVRLKDT**TAK** LSKGAI**PCPA** AT**PVP**I**VEKR** SEIIM**SPATL** RRQIKI**ETRG**
 3001 RDS**PP**TIT**IP** VNINHAASGS FRGSVDAQ**E** IRKVEKRATY VHKDGL**NSTD** HMV**PD**TESYD
 3061 AVEIIRKVAV **PP**RLSEHT**QR** YEAANRT**VQM** AENFVN**D**PEN EINRW**FREFE** HGPVSEAK**SN**
 3121 RRVYAKGETN HNIQ**QES**RTF CKEEFGLT**SL** GNTSFTD**FSC** KH**PRE**LREKI **PVKQ**PRICSE
 3181 TRSLSEHF**SG** MDAFESQ**IVE** SKMKTSS**SHS** SEAGKSG**CDF** KHA**PP**TYEDV IAGHILD**ISD**
 3241 **SP**KEVRK**NFQ** KTWQESGR**VF** KGLGYATADA SATEMRT**TFQ** EESAFI**SEAA** **AP**RQGNMY**TL**
 3301 SKD**SL**NSG**VP** SGRQAE**FS**

Abb. 47 Vorläufige Aminosäuresequenz für hXirp2

In Fettdruck sind repetitive 16-AS- Motive und Proline des C-Terminus eingetragen. Prolinreiche Motive aus Tab. 4.1.4 sind eingekästelt. Die putative DNA-Bindungstelle ist kursiv gesetzt und unterstrichen. Die putative ATP bzw. GTP Bindungstelle ist in kursiv und fetgedruckt dargestellt.

Sequenzalignment der repetitiven Motive von hXirp1		isoelektrische Punkte der Motive	
		16 AA	25 AA
Konsensussequenz des 16 AS Motivs <u>GDVQXXRWLFETXPLD</u>			
hXirp1 rM-1	EEPTG DVQCMRWLFENWRLD AIGE	4.70	4.05
hXirp1 rM-2	EPVLC GDVQATSRKFEEGSFA NSTD	4.70	4.23
hXirp1 rM-3	PQPGG GDVRAARWLFETKPLD ELTG	6.25	4.89
hXirp1 rM-4	EPAAS GDVQGTRWLFETRPLD RLGS	4.70	4.89
hXirp1 rM-5	IQELK GDVKKTVKLFQTEPLC AIQD	8.22	6.25
hXirp1 rM-6	EEIQS NAVRSARWLFETRPLD AINQ	10.00	4.89
hXirp1 rM-7	EEGAR PDVSATRWLFETQPLD AIRE	4.14	4.42
hXirp1 rM-8	LIPPG PDVQQQOHLFETRALD TLKG	4.70	5.69
hXirp1 rM-9	EEVVP GDVRSRWLFETKPLD AFRD	4.70	4.42
hXirp1 rM-10	RDELK GDVKTFKNLFETLPLD SIGQ>	4.70	5.03
hXirp1 rM-11	>>>> GEVLAHGSPSREEGTD SAGQ	4.42	4.42
hXirp1 rM-12	EQIVG GDVQGYRWLFETQPLD QLGR	4.14	4.42
hXirp1 rM-13	QEVVA GDVGTARWLFETQPLE MIHQ	4.14	4.42
hXirp1 rM-14	EAPPK GDVQTRWLFETCPMS ELAE	4.74	4.23
hXirp1 rM-15	DPTAK AEAQSCTWLFKQPPVD RPVG	4.74	6.25
hXirp1 rM-16	SOVPA GERQDRHVFETEPLO ASGR	4.89	5.78
hXirp1 rM-17	VEIPS GQVSRQKEVFQALEAG KKEE	6.25	5.03
hXirp1 rM-18	GSIPA GSVHKFTWLFENCPMG SLAA	7.19	7.19
Konsensussequenz des erweiterten Motivs <u>EEXXX GDVQXXRWLFETQPLD XL/I</u> <u>--ψψX G-ψQXX+ψψψ-TQPψ- Xψ</u>			

Abb. 48 Die repetitiven Motive von hXirp1

Dargestellt sind die repetitiven Motive von hXirp1 als 16 Aminosäuremotiv mit den N- und C-terminalen Erweiterungen, die zum 25 Aminosäuremotiv (AS) führen würden. Da die Erweiterungen C-terminal (i. Ggs., zu hXirp2) zu keiner 25 AS-Konsensussequenz führen, ist diese nur als 23 AS Motiv angegeben. Die Konsensussequenz ist im Einbuchstabenkode für Aminosäuren sowie in Symbolen angegeben, die auf die Eigenschaften der Aminosäuren hinweisen (s. Abkürzungsverzeichnis). Die entsprechenden isoelektrischen Punkte beziehen sich jedoch auf das 16 bzw. 25 Aminosäuremotiv. Die Pfeilspitzen >>> zwischen Motiv 10 und 11 weisen darauf hin, daß hier die kurze Verbindungssequenz SIGQ dem Motiv 11 vorausgeht.

Sequenzalignment der repetitiven Motive von hXirp2		isoelektrische Punkte der Motive	
Konsensussequenz des 16 AS Motivs <u>GDVXXXRWLFETQPLD</u>		16 AS	25 AS
hXirp2 rM-1	GNALS ADVQQARYVFFENTNDS SQKD	4.14	4.42
hXirp2 rM-2	DEILK GEVQSIRWIFENQPLD SINN	4.14	4.23
hXirp2 rM-3	EIIAG GDVKYTTWWMFETQPLD TLGA	4.14	4.00
hXirp2 rM-4	PELAR GDVCTARWWMFETQPLD SMNK	4.70	<u>6.25</u>
hXirp2 rM-5	KDITG GDVKTVRYMFFETQPLD QLGO	5.69	<u>5.78</u>
hXirp2 rM-6	LKEIK GNVKRSIKCFETQPLY VTRD	<u>9.06</u>	<u>9.48</u>
hXirp2 rM-7	EDVEK GDVRTARWWMFETQPLD TINK	4.70	4.70
hXirp2 rM-8	EENVK GGVSKAKWLFETQPLE KIKE	<u>6.25</u>	<u>6.62</u>
hXirp2 rM-9	EKIIG TDVSRKCWWMFETQPLD ILKE	4.70	5.03
hXirp2 rM-10	EEIIG GDVQTTKHLFFETLPIE ALKD	4.70	4.42
hXirp2 rM-11	SEEEK GDVRHQKWFIFETQPLE DIRK	5.69	5.15
hXirp2 rM-12	EEVDR GDVKNYTHIFESNNLI KFDA	5.69	4.70
hXirp2 rM-13	EGVTR GAVELNKSIFETTPLY AIQD	4.47	4.42
hXirp2 rM-14	EEIVR GDVRSRWLFETQPLD QFDE	<u>6.25</u>	4.54
hXirp2 rM-15	QEIQT GNVKSAKWLFETQPLD STKY	<u>6.25</u>	<u>6.25</u>
hXirp2 rM-16	RDIVK GDVKTCKWLFETQPMI SLYE	4.70	5.03
hXirp2 rM-17	EEIHK GDVKTCTWLFETQPLD TIKD	4.14	4.70
hXirp2 rM-18	EEIQG GDVRTACFLFETENLD SIQG	4.00	3.77
hXirp2 rM-19	EDIQK GNVLNCRWLFENQPLD KIKE	4.70	5.03
hXirp2 rM-20	TDIQG GDVRKGCFFIFETFSLD EIKE	4.47	4.42
hXirp2 rM-21	EEVIQ GDVKSRYMLFETQPLY AIQD	4.70	4.23
hXirp2 rM-22	EEVIH GDVRGTRWLFETQPLD SINK	<u>6.25</u>	5.88
hXirp2 rM-23	EDIQK GDVSSVRYRFETQPLD QISE	<u>6.25</u>	4.42
hXirp2 rM-24	DHIQG GNVKTSRQFFESSENF KNNY	4.70	5.78
hXirp2 rM-25	NEIQK GNVKTSTWLFETHTMD ELRG	4.70	5.78
hXirp2 rM-26	EDVQK GDVKQAVWLFENRTFD SIMI	5.69	4.42
hXirp2 rM-27	EEIPP SDVKTITWLFETIPLH EFNE	4.70	4.12
Konsensussequenz des erweiterten Motivs <u>EEIXX GDVXXXRWLFETQPLD XI+-</u> <u>--ψψX G-ψ+XX+ψψψ-TQψ- X-+-</u>			
hXirp2 rM-28	EADIE GDVRMAKYKLMNQASP EIQK	5.69	5.03
hXirp2 rM-29	SEEEK GNVNLTKTQLLNKRS TE FFAE	<u>9.72</u>	4.98
hXirp2 rM-30	EEIVK GDVQQAIAKNLFSEERS VKKG	<u>8.88</u>	<u>6.62</u>
hXirp2 rM-31	QEDEK GDINMTIYCLLHENDG DTIE	4.70	3.95
hXirp2 rM-32	EEVIG GDVKRTIHNLLSSTSN NKIS	<u>9.06</u>	<u>7.19</u>
hXirp2 rM-33	DASER GNVQFFTTCEIFAGALD YLKQ	3.53	4.42
hXirp2 rM-34	KEIIG GDVEGTKLLKRRQSL VERT	<u>9.72</u>	<u>9.53</u>
hXirp2 rM-35	TDIIP GDVHNTVKVFMTEPQS TFGK	5.69	5.69
hXirp2 rM-36	DDIHK GDLTSTLNSLSQAVNQ KTVT	3.81	4.70

Abb. 49 Die repetitiven Motive von hXirp2

Dargestellt sind die repetitiven Motive von hXirp2 als 16 Aminosäuremotiv mit den N- und C-terminalen Erweiterungen, die zum 25 Aminosäuremotiv (AS) führen würden. Identische AS die zu 70 % in allen Motiven präsent sind, sind schwarz unterlegt, ähnliche grau. Die Konsensussequenz ist im Einbuchstabenkode für Aminosäuren sowie in Symbolen angegeben, die auf die Eigenschaften der Aminosäuren hinweisen (s. Abkürzungsverzeichnis). Für die Darstellung der Konsensussequenz wurden nur die hochkonservierten Motive 1-27 genutzt. Die entsprechenden isoelektrischen Punkte beziehen sich auf das 16 bzw. 25 Aminosäuremotiv. Isoelektrische Punkte, die aus dem Durchschnitt von ca. pH 4 bis 5 herausfallen sind unterstrichen.

Nukleotid	Primersequenz	Aminosäure
hXirp1		
forward	5' → 3'	ab
1 fw	ATggCCgACAACCAgACACAg	1
247 fw	TCTgAggAACCCACCgAggg	83
436fw	CCCCAgCCAggTggAggAgAC	146
1294fw	gATgAgCTAAAgggggATgTg	432
2269fw	AgCCCCTCaggCAACaggATg	757
3358 fw	gTCAgTAgggAAgAgCAAgC	1120
3601fw	CAGATggCCTgggggCCACC	1201
4495fw	gAggCCgTgCCCCAgCTggg	1498
5056f w	CCCAGCTTTAAgggCAACCC	1686
reverse		
	5' → 3'	bis
rev 162	gAgCTCACTAgCTTgCCgCTg	54
rev 267	ACCCTCggTgggTTCCTCAg	89
rev 615	ggAgCCCaggCggTCCAgCg	205
rev 855	ggggTCCTggTTgATggCgTC	285
rev 1578	TCggCCgAgCTggTCTAggg	526
rev 2247	gTTgCCCCCTTggATgCTCTC	749
rev 3352 *	CAGCAGCTTTCTgggggCTg	1121*
rev 3486	CTTTCTgggggCTgCTgggAT	1162
rev 4248	TgTAGCCTgATTCTTggTgg	1416
rev 4695	CTggAggCTAgACATggAgC	1565
rev 5529	CTgggCAGCTggCTgggAgTAg	1843
hXirp2		
940 fw	TCAgCAgATgTgCAACAAgCC	312
rev 3679	ggTTTCTTTAATgCTCTTgCC	1227

Tab. 12 Auflistung der Primersequenzen zur Klonierung verschiedener hXirp-Konstrukte

Primersequenzen sind in 5'-3'Richtung aufgelistet. Namen der Primer weisen auf Richtung (forward-fw und reverse-rev) sowie auf die Nukleotidlokalisierung hin. Desweiteren sind die korrespondierenden Lokalisationen auf der Aminosäuresequenz angegeben. *Primer rev 3352 diente der Amplifikation des 3'Endes von hXirp1-S, wobei hXirp1-L als Templat genutzt wurde. Der Primer enthielt die Sequenzinformation (unterstrichen) für die beiden C-terminalen Leuzine auf Aminosäureposition 1120 und 1121 in hXirp1-S.

A) Primäre Antikörper und Phalloidin

Zielprotein	AK-Name	Donor & Subklasse	Verdünnung	Referenz/Hersteller
pan- α -Aktinin	BM75.2	Maus IgM	1:300	Sigma-Aldrich
α -Aktinin quergestreifte Muskulatur	a653	Kaninchen Ig polyklonal	1:75	van der Ven et al., 2000 a
F-Aktin	Phalloidin CPITC	#	1:100	Sigma-Aldrich
T7-Tag	T7	Maus IgG2b	1:1500	Novagen
Titin Z-Scheibe	T12	Maus IgG1	1:10	Fürst et al., 1988
Vinculin	Vin11.5	Maus IgG1	1 :300	Sigma-Aldrich

B) Sekundäre Antikörper

sekundärer AK zu	konjugiert mit	vom Donor	Verdünnung	Firma
Maus Ig	PO	Ziege	1:10.000	Jackson Immunoresearch Lab.
Maus IgG	TXR	Esel	1:150	Jackson Immunoresearch Lab.
Maus IgG1	FITC	Ziege	1:75	Southern Biotech
Maus IgG1	TXR	Ziege	1:100	Southern Biotech
Maus Ig A	FITC	Ziege	1:40	Southern Biotech
Maus IgM	TXR	Ziege	1:100	Southern Biotech
Kaninchen	FITC	Ziege	1:75	Southern Biotech

Tab. 13 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Name des Plasmids: **pCMV5FS**

Länge: 4,7 kbp

Beschreibung siehe unten

EcoRI
 GAATTCATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT
 CTTAAGTACCGATCGTACTGACCACCTGTCGTTTACCCA

BamHI MluI HindIII SalI
 CGCGGATCCACGCGTAAGCTTGTGCGACTGATAGAGGGGG
 GCGCCTAGGTGCGCATTGGAACAGCTGACTATCTCCCC

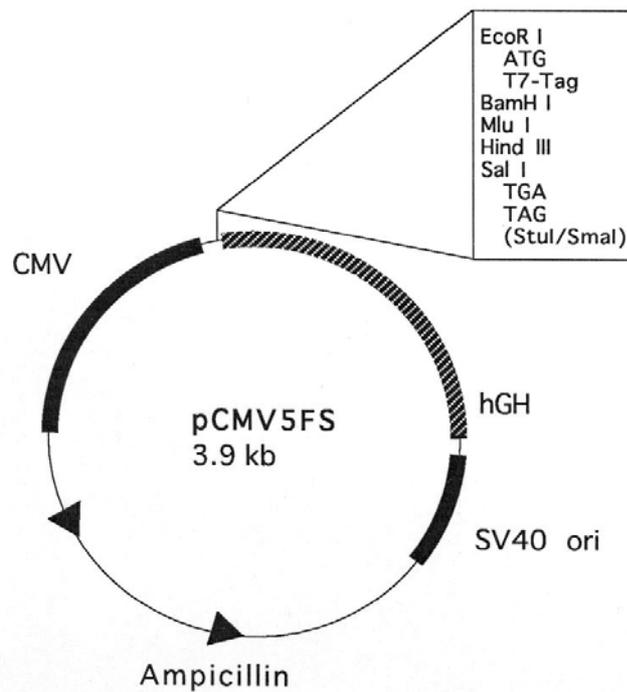


Abb. 50 Schematische Übersicht zum Vektor pCMV5FS

Name des Plasmids: **pMyP-G**
 Länge: 4.4 kb
 Herkunft: Firma Promega (pCAT 3E)

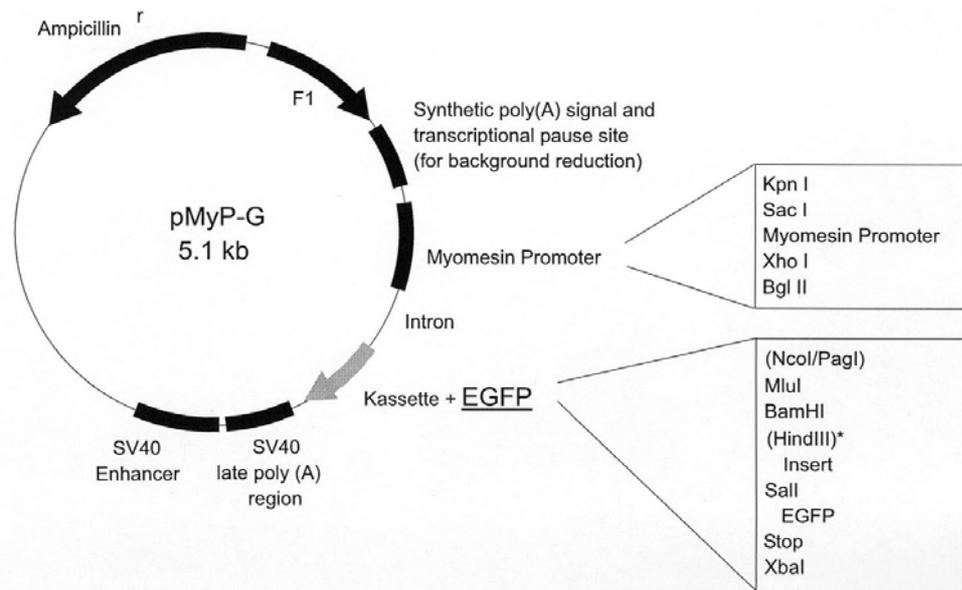
Synthetisches poly(A) Signal und Transkriptions-Pause-Site
 SV40 Enhancer
 SV40 late poly(A) region
 Myomesin Promoter
 F1 Origin
 Ampicillin Resistenzgen
 EGFP + Cloning Kasette

PagI cloned into NcoI

```

                                (HindIII)
          MluI  BamHI          SalI                                XbaI
ACCATGAGCGCGTGGATCCAAGCTTGTGCGAC - EGFP - TCTAGA

TGGTACTGCGCACCTAGGTTCGAACAGCTG                                AGATCT
      M  T  R  G  S          V  D
  
```



* nicht unique!!!

Abb. 51 Schematische Übersicht zum Vektor pMyP-G

Name des Plasmids: **pET-23W2**

Länge: 3666 bp

Herkunft: Firma Novagen

Beschreibung siehe unten

Multiple Cloning Site, His-Tag

T7 Promoter

F1 Origin

Ampicillin Resistenzgen

```

          T7 Promotor
          ───────────▶
Bgl II   AGATCTCGATCCC GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC

Xba I           rbs           Nde I Nhe I
TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACT
                                     M A S M T ─▶ T7-Tag

                                     Mlu I
                                     BamH I
GGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCCACGCGT Insert Sal I
G G Q Q M G R 1 G S T R V D

Xho I His-Tag
CTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCC GAAAGGAAG
L E H H H H H H H END

                                     Bpu1102 I           Sty I
CTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC
                                     T7 Terminator

GGGTCTTGAGGGGT
    
```

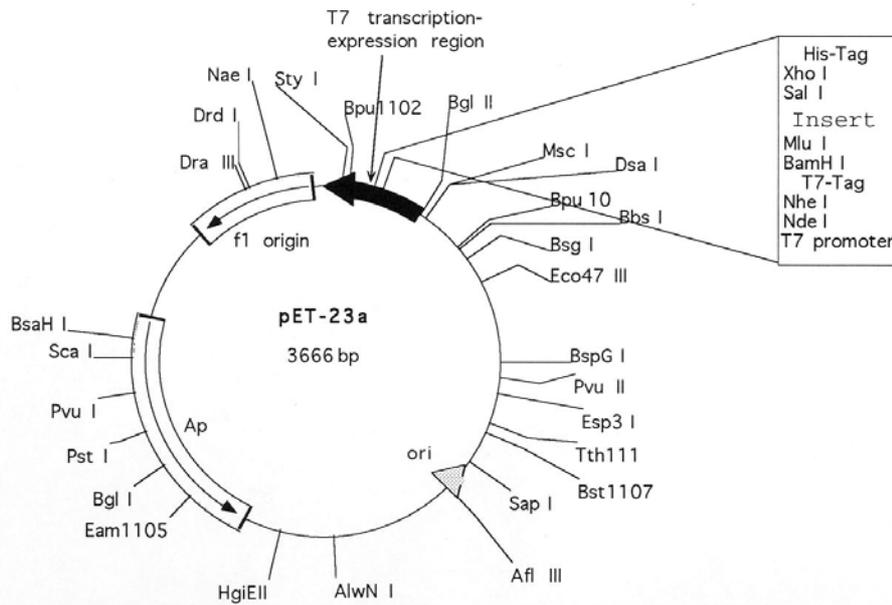


Abb. 52 Schematische Übersicht zum Vektor pET-23W2

6 Referenzen

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 2002. Molecular biology of the cell, 4th edition, Garland Publishing, Inc. New York and London
- Amann KJ, Renley BA, Ervasti JM. 1998. A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. *J Biol Chem.* 273:28419-23.
- Amato PA, Taylor DL. 1986. Probing the mechanism of incorporation of fluorescently labeled actin into stress fibers. *J Cell Biol.* 102:1074-84.
- Ampe C und Vandekerckhove J. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press
- Astier C, Raynaud F, Lebart MC, Roustan C, Benyamin Y. 1998. Binding of a native titin fragment to actin is regulated by PIP2. *FEBS Lett.* 429:95-8.
- Ayscough KR. 1998. In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 10:102-11.
- Bachmann C, Fischer L, Walter U, Reinhard M. 1999. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem.* 274:23549-57.
- Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L, Geiger B. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol.* 3:466-72.
- Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B. 2001. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 155:1319-32.
- Bao ZZ, Lakonishok M, Kaufman S, Horwitz AF. 1993. Alpha 7 beta 1 integrin is a component of the myotendinous junction on skeletal muscle. *J Cell Sci.* 106 (Pt 2):579-89.
- Bear JE, Loureiro JJ, Libova I, Fassler R, Wehland J, Gertler FB. 2002. Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell.* 101:717-28.
- Belkin AM, Zhidkova NI, Koteliansky VE. 1986. Localization of talin in skeletal and cardiac muscles. *FEBS Lett.* 200:32-6.
- Belkin AM, Zhidkova NI, Balzac F, Altruda F, Tomatis D, Maier A, Tarone G, Koteliansky VE, Burridge K. 1996. Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J Cell Biol.* 132:211-26.
- Benjamin M, Ralphs JR. 1996. Tendons in health and disease. *Man Ther.* 1:186-191.
- Bershadsky A, Chausovsky A, Becker E, Lyubimova A, Geiger B. 1996. Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol.* 6:1279-89.
- Berthier, C., Blaineau, S. 1997. Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fiber. *Biology of the Cell* 89, 413-434
- Blanchoin L, Pollard TD, Hitchcock-DeGregori SE. 2001. Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr Biol.* 11:1300-4.
- Bond M, Somlyo AV. 1982. Dense bodies and actin polarity in vertebrate smooth muscle. *J Cell Biol.* 95(2 Pt 1):403-13.

- Bork P, Sudol M. 1994. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci.* 19:531-3.
- Brault V, Reedy MC, Sauder U, Kammerer RA, Aebi U, Schoenenberger C., (1999), Substitution of flight muscle-specific actin by human (beta)-cytoplasmic actin in the indirect flight muscle of *Drosophila*. *J Cell Sci.* 112 (Pt 21):3627-39.
- Bryce NS, Schevzov G, Ferguson V, Percival JM, Lin JJ, Matsumura F, Bamburg JR, Jeffrey PL, Hardeman EC, Gunning P, Weinberger RP. 2003. Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms. *Mol Biol Cell.* 14:1002-16.
- BurrIDGE K, Chrzanowska-Wodnicka M. 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:463-518..
- Cai S, Liu X, Glasser A, Volberg T, Filla M, Geiger B, Polansky JR, Kaufman PL. 2000. Effect of latrunculin-A on morphology and actin-associated adhesions of cultured human trabecular meshwork cells. *Mol Vis.*:6:132-43.
- Carlier MF. 1998. Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 10:45-51..
- Carlier MF, Jean C, Rieger KJ, Lenfant M, Pantaloni D. 1993. Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5034-8.
- Carroll SL, Herrera AH, Horowitz R.. 2001. Targeting and functional role of N-RAP, a nebulin-related LIM protein, during myofibril assembly in cultured chick cardiomyocytes. *J Cell Sci.* 114 (Pt 23):4229-38.
- Carroll SL, Horowitz R. 2001. Myofibrillogenesis and formation of cell contacts mediate the localization of N-RAP in cultured chick cardiomyocytes. *Cell Motil Cytoskeleton.* 47:63-76.
- Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS, Masters BS, McCabe TJ, McMillan K, Padre RC, Spencer MJ, Tidball JG, Stull JT. 1996. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:9142-7.
- Chen MJ, Shih CL, Wang K. 1993. Nebulin as an actin zipper. A two-module nebulin fragment promotes actin nucleation and stabilizes actin filaments. *J Biol Chem.* 268:20327-34.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:637-706.
- Cohen C, Parry DA. 1990. Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins.* 7:1-15.
- Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci.* 25:147-50.
- Cooke, R. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press.
- Cooper JA. 2002. Actin dynamics: tropomyosin provides stability. *Curr Biol.* 12:R523-5.
- Cooper JA, Schafer DA. 2000. Control of actin assembly and disassembly at filament ends., *Curr Opin Cell Biol.* 12:97-103.
- Craig R. 1994. Myology, volume I, 2nd edition, Editor: Engel AG, Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., Health profession division.

- Craig S.W. und Pardo, J.V. 1983. Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. *Cell Motil.* 3(5-6):449-62.
- Crick, F.H.C. 1953. *Acta Crystallogr. Sec. D6*, 689-697
- Crosbie RH, Lebakken CS, Holt KH, Venzke DP, Straub V, Lee JC, Grady RM, Chamberlain JS, Sanes JR, Campbell KP. 1999. Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol.* 145
- Dabiri GA, Turnacioglu KK, Sanger JM, Sanger JW. 1997. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9493-8.
- Danowski, B., Imanaka-Yoshida, K., Sanger J. und Sanger, J. 1992. Costameres are site of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol* 118, 1411-1420.
- DesMarais V, Ichetovkin I, Condeelis J, Hitchcock-DeGregori SE. 2002. Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J Cell Sci.* 115(Pt 23):4649-60.
- Du A, Sanger JM, Linask KK, Sanger JW. 2003. Myofibrillogenesis in the first cardiomyocytes formed from isolated quail precardiac mesoderm. *Dev Biol.* 257:382-94.
- Durbeej M, Campbell KP. 2002. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev.* 12:349-61.
- Ervasti JM, Campbell KP. 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol.* 122:809-23.
- Epstein ND, Davis JS. 2003. Sensing stretch is fundamental. *Cell.* 112:147-50.
- Fay FS, Fujiwara K, Rees DD, Fogarty KE. 1983. Distribution of alpha-actinin in single isolated smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 96:783-95.
- Fedorov AA, Fedorov E, Gertler F, Almo SC. 1999. Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. *Nat Struct Biol.* 6:661-5.
- Firulli AB, Han D, Kelly-Roloff L, Koteliansky VE, Schwartz SM, Olson EN, Miano JM. 1998. A comparative molecular analysis of four rat smooth muscle cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34:217-26.
- Foos G, Grimm S, Klempnauer KH. 1992. Functional antagonism between members of the myb family: B-myb inhibits v-myb-induced gene activation. *EMBO J.* 11:4619-29.
- Foos G, Grimm S, Klempnauer KH. 1994. The chicken A-myb protein is a transcriptional activator. *Oncogene.* 9:2481-8.
- Fürst, D. O., M. Osborn, R. Nave, and K. Weber. 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
- Gambaryan S, Hauser W, Kobsar A, Glazova M, Walter U. 2001. Distribution, cellular localization, and postnatal development of VASP and Mena expression in mouse tissues. *Histochem Cell Biol.* 116:535-43
- Geiger B, Bershadsky A. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol.* 13:584-92.

- Geiger B, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ. 1980. Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(7):4127-31.
- Geiger B, Yehuda-Levenberg S, Bershadsky AD. 1995. Molecular interactions in the submembrane plaque of cell-cell and cell-matrix adhesions. *Acta Anat (Basel)*. 154:46-62.
- George-Weinstein M, Gerhart J, Blitz J, Simak E, Knudsen KA. 1997. N-cadherin promotes the commitment and differentiation of skeletal muscle precursor cells. *Dev Biol*. 185:14-24.
- Gergely, J., Grabarek, Z., Tao, T. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press
- Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P. 1996. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*. 87:227-39.
- Gimona M, Mital R. 1998. The single CH domain of calponin is neither sufficient nor necessary for F-actin binding. *J Cell Sci*. 111 (Pt 13):1813-21.
- Glacy SD. 1983. Subcellular distribution of rhodamine-actin microinjected into living fibroblastic cells. *J Cell Biol*. 97:1207-13.
- Green KJ, Jones JC. 1996. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J*. 10:871-81.
- Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, Tim RW, Taivainen A, Bartoloni L, Gilchrist JM, Stajich JM, Gaskell PC, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA, Carpen O, Westbrook CA, Speer MC. 2000. Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet*. 9:2141-7.
- Hayashi Y, Haimovich B, Reszka A, Boettiger D, Horwitz A. 1990. Expression and function of chicken integrin beta 1 subunit and its cytoplasmic domain mutants in mouse NIH 3T3 cells. *J Cell Biol*. 110:175-84.
- Henry MD, Campbell KP. 1999. Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol*. 11:602-7..
- Hill MA, Gunning P. 1993. Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J Cell Biol*. 122:825-32.
- Himmel M, Van Der Ven PF, Stocklein W, Furst DO. 2003. The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins. *Biochemistry*. 42:430-9.
- Hitchcock-DeGregori SE, An Y. 1996. Integral repeats and a continuous coiled coil are required for binding of striated muscle tropomyosin to the regulated actin filament. *J Biol Chem*. 271:3600-3.
- Hitchcock-DeGregori SE, Song Y, Greenfield NJ. 2002. Functions of tropomyosin's periodic repeats. *Biochemistry*. 41:15036-44.
- Hook TC, Newcomb PM, Herman IM. 1991. Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J Cell Biol*. 112:653-64.
- Huff T, Muller CS, Otto AM, Netzker R, Hannappel E. 2001. beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol*. 33:205-20..
- Huttelmaier S, Mayboroda O, Harbeck B, Jarchau T, Jockusch BM, Rudiger M. 1998. The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol*. 8:479-88.

- Huttelmaier S, Harbeck B, Steffens O, Messerschmidt T, Illenberger S, Jockusch BM. 1999. Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett.* 451:68-74.
- Hyodo M, Kawakita S, Desaki J. 2001. Scanning electron microscopic study of the muscle fiber ends at the myotendinous junction in the posterior cricoarytenoid and cricothyroid muscles in rats. *Acta Otolaryngol.* 2001 121(8):953-6
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., Holmes, K.C. 1990. Atomic Structure of the actin-DNAse I complex, *Nature.* 347, 37-44
- Kajava AV. 2001. Review:proteins with repeated sequence-structural prediction and modeling. *J Struct Biol.* 134(2-3):132-44.
- Katoh K, Kano Y, Masuda M, Onishi H, Fujiwara K. 1998. Isolation and contraction of the stress fiber.*Mol Biol Cell.* 9:1919-38.
- Katz BZ, Zamir E, Bershadsky A, Kam Z, Yamada KM, Geiger B. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.* 11:1047-60.
- Kay BK, Williamson MP, Sudol M.. 2000. The importance of being proline:the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14:231-41.
- Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR. 2002. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell.* 111:943-55.
- Krause M, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB. The Ena/VASP enigma. *J Cell Sci.* 115(Pt 24):4721-6.
- Kühnel, W. 1995. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag
- Labeit S, Gibson T, Lakey A, Leonard K, Zeviani M, Knight P, Wardale J, Trinick J. 1991. Evidence that nebulin is a protein-ruler in muscle thin filaments. *FEBS Lett.* 282:313-6.
- Labeit S, Kolmerer B. 1995. Titins:giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* 270(5234):293-6.
- LaFlamme SE, Akiyama SK, Yamada KM. 1992. Regulation of fibronectin receptor distribution. *J Cell Biol.* 117:437-47.
- Langanger G, Moeremans M, Daneels G, Sobieszek A, De Brabander M, De Mey J. 1986. The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells.*J Cell Biol.* 102:200-9.
- Law DJ, Allen DL, Tidball JG. 1994. Talin, vinculin and DRP (utrophin) concentrations are increased at mdx myotendinous junctions following onset of necrosis.*J Cell Sci.* 107 (Pt 6):1477-83.
- Lazarides, E. und Hubbard, B.D. 1976. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:4344-8.
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L. 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol.* 317:41-72.
- Li H, Linke WA, Oberhauser AF, Carrion-Vazquez M, Kerkvliet JG, Lu H, Marszalek PE, Fernandez JM. 2002. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature.* 418(6901):998-1002.

- Linke WA, Rudy DE, Centner T, Gautel M, Witt C, Labeit S, Gregorio CC. 1999. I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol.* 146:631-44.
- Lu MH, DiLullo C, Schultheiss T, Holtzer S, Murray JM, Choi J, Fischman DA, Holtzer H. The vinculin/sarcomeric- α -actinin/ α -actin nexus in cultured cardiac myocytes. *J Cell Biol.* 117:1007-22.
- Luo G, Herrera AH, Horowitz R. 1999. Molecular interactions of N-RAP, a nebulin-related protein of striated muscle myotendon junctions and intercalated disks. *Biochemistry.* 38:6135-43.
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science,* 255:1162-4
- Macias MJ, Wiesner S, Sudol M. 2002. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett.* 513:30-7.
- Männer J. 2000. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat Rec.* 259:248-62.
- Matsudaira P. 1994. Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol.* 5:165-74.
- Maruyama K. 1994. Connectin, an elastic protein of striated muscle. *Biophys Chem.* 50(1-2):73-85.
- Mayer BJ, Eck MJ. 1995. SH3 domains. Minding your p's and q's. *Curr Biol.* 5:364-7.
- McLachlan, A. D., Steward, M. 1975. Tropomyosin coiled coil interactions: evidence for an unstaggered structure, *J. Mol. Biol.* 98. 293-304
- Moncman CL, Wang K. 1995. Nebulette: a 107 kD nebulin-like protein in cardiac muscle. *Cell Motil Cytoskeleton.* 32:205-25.
- Moncman CL, Wang K. 2002. Targeted disruption of nebulette protein expression alters cardiac myofibril assembly and function. *Exp Cell Res.* 273:204-18.
- Moores und Kendrick Jones. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press.
- Morley P, Whitfield JF. 1993. The differentiation inducer, dimethyl sulfoxide, transiently increases the intracellular calcium ion concentration in various cell types. *J Cell Physiol.* 156:219-25.
- Motta A, Pastore A, Goud NA, Castiglione Morelli MA. 1991. Solution conformation of salmon calcitonin in sodium dodecyl sulfate micelles as determined by two-dimensional NMR and distance geometry calculations. *Biochemistry* 30:10444-50.
- Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Domann E, Carl UD, Walter U, Gertler FB, Wehland J, Chakraborty T. 1997. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.* 16:5433-44.
- North AJ, Bardsley WG, Hyam J, Bornslaeger EA, Cordingley HC, Trinnaman B, Hatzfeld M, Green KJ, Magee AI, Garrod DR. 1999. Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci.* 112 (Pt 23):4325-36.
- Okabe S, Hirokawa N. 1989. Incorporation and turnover of biotin-labeled actin microinjected into fibroblastic cells: an immunoelectron microscopic study. *J Cell Biol.* 109(4 Pt 1):1581-95.

- Ono S, Ono K. 2002. Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J Cell Biol.* 156:1065-76
- Otterbein LR, Graceffa P, Dominguez R. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science.* 293(5530):708-11.
- Ozawa E, Nishino I, Nonaka I. 2001. Sarcolemmopathy: muscular dystrophies with cell membrane defects. *Brain Pathol.* 11:218-30.
- Pacholsky D, Himmel M, Vakeel P, Löwe T, Stradal T, Rottner K, Fürst DO, van der Ven PFM. 2003. Xin repeats define a novel actin binding motif. eingereicht zur Publikation
- Pardo JV, Siliciano JD, Craig SW. 1983. A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:1008-12.
- Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. 1993. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem.* 1993 Dec 22;129:101-20.
- Perriard JC, Hirschy A, Ehler E. 2003. Dilated cardiomyopathy. A disease of the intercalated disc ?. *Trends Cardiovasc Med.* 13:30-8.
- Pfuhl M, Winder SJ, Pastore A. 1994. Nebulin, a helical actin binding protein. *EMBO J.* 13:1782-9.
- Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ, Weis WI. 2002. Biochemical and structural definition of the I-fadain- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J Biol Chem.* 277:18868-74.
- Pokutta S, Weis WI. 2002. The cytoplasmic face of cell contact sites. *Curr Opin Struct Biol.* 12:255-62.
- Politou AS, Spadaccini R, Joseph C, Brannetti B, Guerrini R, Helmer-Citterich M, Salvadori S, Temussi PA, Pastore A. 2002. The SH3 domain of nebulin binds selectively to type II peptides: theoretical prediction and experimental validation. *J Mol Biol.* 316:305-15.
- Pollard TD. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press.
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:545-76.
- Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112:453-65.
- Porter GA, Dmytrenko GM, Winkelmann JC, Bloch RJ. 1992. Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol.* 117:997-1005
- Prehoda KE, Lee DJ, Lim WA. 1999. Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell.* 97:471-80.
- Purslow PP. 2002. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 133:947-66.
- Reinhard M, Rudiger M, Jockusch BM, Walter U. 1995. VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.* 399(1-2):103-7.
- Renfranz PJ, Beckerle MC. 2002. Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Curr Opin Cell Biol.* 14:88-103.

- Rickles RJ, Botfield MC, Zhou XM, Henry PA, Brugge JS, Zoller MJ. 1995. Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10909-13.
- Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol.* 153:1175-86.
- Rybakova IN, Patel JR, Davies KE, Yurchenco PD, Ervasti JM. 2002. Utrophin binds laterally along actin filaments and can couple costameric actin with sarcolemma when overexpressed in dystrophin-deficient muscle. *Mol Biol Cell.* 13:1512-21.
- Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM. 2000. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol.* 150:1209-14.
- Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM. 1997. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:12413-8.
- Salmikangas P, Mykkanen OM, Gronholm M, Heiska L, Kere J, Carpen O. 1999. Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 8:1329-36.
- Salmikangas P, van der Ven PF, Lalowski M, Taivainen A, Zhao F, Suila H, Schroder R, Lappalainen P, Furst DO, Carpen O. 2003. Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum Mol Genet.* 12:189-203.
- Sanger JW, Chowrashi P, Shaner NC, Spalthoff S, Wang J, Freeman NL, Sanger JM. 2002. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin Orthop.* 403 Suppl:S153-62.
- Sanger JM, Sanger JW. 1980. Banding and polarity of actin filaments in interphase and cleaving cells. *J Cell Biol.* 86:568-75.
- Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A. 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci.* 15:430-4.
- Schroder R, Pacholsky D, Reimann J, Matten J, Wiche G, Furst DO, van der Ven PF. 2002. Primary longitudinal adhesion structures: plectin-containing precursors of costameres in differentiating human skeletal muscle cells. *Histochem Cell Biol.* 118:301-10.
- Selden LA, Kinoshian HJ, Estes JE, Gershman LC. 1999. Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics. *Biochemistry.* 38:2769-78.
- Sinn HW, Balsamo J, Lilien J, Lin JJ. 2002. Localization of the novel Xin protein to the adherens junction complex in cardiac and skeletal muscle during development. *Dev Dyn.* 225:1-13.
- Small JV, Furst DO, Thornell LE. 1992. The cytoskeletal lattice of muscle cells. *Eur J Biochem.* 208:559-72.
- Small JV, Gimona M. 1998. The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell. *Acta Physiol Scand.* 164:341-8.
- Small JV, Rottner K, Kaverina I, Anderson KI. 1998. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta.* 1404:271-81.
- Smilenov LB, Mikhailov A, Pelham RJ, Marcantonio EE, Gundersen GG. 1999. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science.* 286(5442):1172-4.

- Smilli, L.B. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press
- Smith CK 2nd, Janney MJ, Allen RE. 1994. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol.* 159:379-85.
- Sommer J.R. und Johnson E.A.. 1979. Handbook of Physiology, Sect 2, The Cardiovascular System, Vol. 1, The Heart, Am. Physiol. Soc. Bethesda
- Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:138-45.
- Stradal T, Kranewitter W, Winder SJ, Gimona M. 1998. CH domains revisited. *FEBS Lett.* 431:134-7.
- Sudol M, Hunter T. 2000. NeW wrinkles for an old domain. *Cell.* 2000 103:1001-4.
- Thompson TG, Chan YM, Hack AA, Brosius M, Rajala M, Lidov HG, McNally EM, Watkins S, Kunkel LM. 2000. Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol.* 148:115-26.
- Thornell LE, Butler-Browne GS, Carlsson E, Eppenberger HM, Furst DO, Grove BK, Holmbom B, Small JV. 1986. Cryoultramicrotomy and immunocytochemistry in the analysis of muscle fine structure., *Scan Electron Microsc. (Pt 4):*1407-18.
- Tidball JG. 1987. Alpha-actinin is absent from the terminal segments of myofibrils and from subsarcolemmal densities in frog skeletal muscle. *Exp Cell Res.* 170:469-82.
- Tidball JG, O'Halloran T, Burrige K. 1986. Talin at myotendinous junctions. *J Cell Biol.* 103:1465-72.
- Tidball JG, Quan DM. 1992. Reduction in myotendinous junction surface area of rats subjected to 4-day spaceflight. *J Appl Physiol.* 73:59-64.
- Tidball JG, Spencer MJ, Wehling M, Lavergne E. 1999. Nitric-oxide synthase is a mechanical signal transducer that modulates talin and vinculin expression. *J Biol Chem.* 274:33155-60.
- Titus, M. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press
- Tokuyasu, K.T., Dutton, A.H., Singer, S.J. 1983a. Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeleton) localization and intermediate filament organization in chicken skeletal muscle. *J Cell Biol.* 96:1727-35. (a)
- Tokuyasu, K.T., Dutton, A.H., Singer, S.J. 1983b. Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeleton) localization and intermediate filament organization in chicken cardiac muscle. *J Cell Biol.* 96:1727-35. (b)
- Trauth K, Mutschler B, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Klempnauer KH. 1994. Mouse A-myb encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *EMBO J.* 13:5994-6005.
- Trotter JA. 2002. Structure-function considerations of muscle-tendon junctions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 133:1127-33.
- Trotter JA, Corbett K, Avner BP. 1981. Structure and function of the murine muscle-tendon junction. *Anat Rec.* 201:293-302.
- Trybus, K.M. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press

- van der Flier A, Sonnenberg A. 2001. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta*. 1538(2-3):99-117.
- van der Flier A, Kuikman I, Kramer D, Geerts D, Kreft M, Takafuta T, Shapiro SS, Sonnenberg A. 2002. Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin [beta] subunits. *J Cell Biol*. 156(2):361-76.
- van der Ven PF, Obermann WM, Lemke B, Gautel M, Weber K, Furst DO. 2000 a. Characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of gamma-filamin/ABP-L in sarcomeric Z-disc formation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 45:149-62.
- van der Ven PF, Wiesner S, Salmikangas P, Auerbach D, Himmel M, Kempa S, Hayess K, Pacholsky D, Taivainen A, Schroder R, Carpen O, Furst DO. 2000 b. Indications for a novel muscular dystrophy pathway. gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *J Cell Biol*. 151:235-48.
- van der Ven PF, Bartsch JW, Gautel M, Jockusch H, Furst DO. 2000 c. A functional knock-out of titin results in defective myofibril assembly. *J Cell Sci*. 113 (Pt 8):1405-14.
- van der Ven PF, Schaart G, Jap PH, Sengers RC, Stadhouders AM, Ramaekers FC. 1992. Differentiation of human skeletal muscle cells in culture:maturation as indicated by titin and desmin striation. *Cell Tissue Res*. 270:189-98.
- Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, Hunter T, Noel JP. 2000. Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol*. 7:639-43
- von Arx P, Bantle S, Soldati T, Perriard JC. 1995. Dominant negative effect of cytoplasmic actin isoproteins on cardiomyocyte cytoarchitecture and function. *J Cell Biol*. 131(6 Pt 2):1759-73.
- Walter U, Eigenthaler M, Geiger J, Reinhard M. 1993. Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv Exp Med Biol*. 344:237-49.
- Wang, K. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press
- Wang DZ, Hu X, Lin JLC, Kitten GT, Solursh M, Lin JJC. 1996. Differential displaying of mRNAs from the atrioventricular region of developing chicken hearts at stages 15 and 21. *Front Biosci*. 1:a1-a15.
- Wang, K. und Ramirez-Mitchell, R. 1983. A network of transverse and longitudinal intermediate filaments is associated with sarcomeres of adult vertebrate skeletal muscle. *J Cell Biol*. 96:562-70.
- Wang DZ, Reiter RS, Lin JL, Wang Q, Williams HS, Krob SL, Schultheiss TM, Evans S, Lin JJ. 1999. Requirement of a novel gene, Xin, in cardiac morphogenesis. *Development*. 126:1281-94.
- Weng Z, Rickles RJ, Feng S, Richard S, Shaw AS, Schreiber SL, Brugge JS. 1995. Structure-function analysis of SH3 domains:SH3 binding specificity altered by single amino acid substitutions. *Mol Cell Biol*. 15:5627-34.
- Weber KT. 1989. Cardiac interstitium in health and disease:the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*. 13:1637-52.
- Winder SJ. 2003. Structural insights into actin-binding, branching and bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 15:14-22.

- Winder SJ, Gibson TJ, Kendrick-Jones J. 1995. Dystrophin and utrophin:the missing links! FEBS Lett. 369:27-33.
- Warrick und Spudich. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins, 2nd edition, Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press
- Wu J.C., Sung H.C., Chung T.H., DePhilip R.M. 2002. Role of N-cadherin- and integrin-based costameres in the development of rat cardiomyocytes. J Cell Biochem. 84:717-24.
- Xie Z, Xu W, Davie EW, Chung DW. 1998. Molecular cloning of human ABPL, an actin-binding protein homologue. Biochem Biophys Res Commun. 251:914-9.
- Yarmola EG, Somasundaram T, Boring TA, Spector I, Bubb MR. 2000. Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. J Biol Chem. 275:28120-7.
- Ylanne J, Chen Y, O'Toole TE, Loftus JC, Takada Y, Ginsberg MH. 1993. Distinct functions of integrin alpha and beta subunit cytoplasmic domains in cell spreading and formation of focal adhesions. J Cell Biol. 122:223-33.
- Yamaguchi, M., Y. Hirai, K. Takehana, T. Oba, S. Yamamoto, M. Muguruma, J. Masty, and S. Yamano. 1990. Dense bands and polarity of thin filament at myotendinous junction in guppy muscle. Protoplasma 158:121-129.
- Yamaguchi M, Yamano S, Muguruma M, Robson RM. 1988. Polarity and length of actin filaments at the fascia adherens of the cardiac intercalated disk. J Ultrastruct Mol Struct Res. 100(3):235-44.
- Zamir E, Geiger B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. J Cell Sci. 114(Pt 20):3583-90.
- Zamir E, Katz BZ, Aota S, Yamada KM, Geiger B, Kam Z. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions., J Cell Sci. 112 (Pt 11):1655-69
- Zamir E, Katz M, Posen Y, Erez N, Yamada KM, Katz BZ, Lin S, Lin DC, Bershadsky A, Kam Z, Geiger B. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. Nat Cell Biol. 2:191-6.
- Zamora AJ, Carnino A, Roffino S, Marini JF. 1995. Respective effects of hindlimb suspension, confinement and spaceflight on myotendinous junction ultrastructure. Acta Astronaut. 36(8-12):693-706.
- Zarrinpar A, Lim WA. 2000. Converging on proline:the mechanism of WW domain peptide recognition. Nat Struct Biol. 7:611-3
- Zhang JQ, Elzey B, Williams G, Lu S, Law DJ, Horowitz R. 2001. Ultrastructural and biochemical localization of N-RAP at the interface between myofibrils and intercalated disks in the mouse heart. Biochemistry. 40:14898-906.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. D.O. Fürst für die Überlassung des Themas und sein Engagement als Betreuer. Herrn Dr. P.F.M. van der Ven danke ich für die tatkräftige Hilfe in den Klonierungen.

Mein Dank gilt Frau Guhlan und Frau Mai, die in vielen Bereichen des Labors ein gutes und fleißiges Händchen besaßen.

Ich danke selbstverständlich allen anderen Doktoranden, Katja Gehmlich, Mirko Himmel, Padmanabhan Vakeel und dem kommenden Diplomanden Stefan Eulitz, die mir mit hilfreichen Diskussionen zur Seite standen.

Besonderen Dank für Diskussionen, Anregung zum Aktinbindungsassay, B16F1-, A7r5-Zellen und nicht zuletzt für ihre Gastfreundschaft schulde ich Frau Dr. T. Stradal und Herrn Dr. K. Rottner von der BGF Braunschweig.

Herrn Dr. C. Erck von der BGF Braunschweig danke ich für die Überlassung des MyoD-Vektors.

Allen anderen nicht namentlich erwähnten werde ich sicherlich schon gedankt haben.

Tabellarischer Lebenslauf

Name	Dirk Pacholsky	
Geburtstag	19. November 1972	
Geburtsort	Halberstadt	
<u>Schulbildung</u>	9/1979 – 7/1985	POS „Heinrich Heine“, Salzwedel
	9/1985 – 6/1989	POS „Wilhelm Weitling, Magdeburg
	9/1990 – 6/1991	EOS „Otto von Guericke“, Magdeburg
		Abitur
<u>Wehrdienst</u>	7/1991 – 6/1992	
<u>Studium</u>	9/1992	Studium der Biologie an der Universität Potsdam
	3/ 1999	Abschluß als Diplombiologe
	10/ 1999	Doktorand im Institut für Biologie und Biochemie, Abteilung Zellbiologie

Hiermit erkläre ich, daß diese Arbeit von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ich erkläre, daß ich diese Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Dirk Pacholsky