

Untersuchungen zur Diversität und Lokalisation Gelsolin- verwandter Proteine des Regenwurms *Lumbricus terrestris*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Evelyn Krüger
aus Marl

April 2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. Jochen D'Haese
Korreferent: Prof. Dr. Hartmut Greven

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2001

Inhalt

1 Einleitung	1
2. Material und Methoden	14
2.1 Untersuchte Organe	14
2.2 Biochemische Methoden	14
2.2.1 Isolierung des Gelsolin-verwandten Proteins aus den Geweben des Regenwurms.....	14
2.2.2 Viskosimetrie.....	16
2.2.3 Isolierung der Proteine mit TRIzol.....	17
2.2.4 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen.....	17
2.2.5 SDS-PAGE.....	17
2.2.6 Western-Blots.....	19
2.2.7 Immunologische Detektion von Proteinen.....	19
2.2.8 Limitierte Proteolyse mit V8.....	20
2.3 Molekularbiologische Methoden	21
2.3.1 DEPC-Behandlung von Wasser und Geräten.....	21
2.3.2 Isolierung von RNA.....	21
2.3.3 Verwendete Primer.....	22
2.3.4 Reverse Transkription mit AMV-Reverser Transkriptase.....	24
2.3.5 Reverse Transkription und PCR mit <i>T_{th}</i> DNA Polymerase.....	24
2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
2.3.7 3`/5`-RACE (“rapid amplifikation of cDNA ends” (RACE)).....	26
2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.3.9 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Gelen und aus PCR-Ansätzen.....	27
2.3.10 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren.....	28
2.3.11 Herstellung kompetenter Bakterien.....	28
2.3.12 Einklonierung von PCR-Produkten.....	28
2.3.13 Ausstreichen von Bakterien auf Kulturplatten.....	29

2.3.14	Übernacht-Flüssigkultur.....	29
2.3.15	Lagerung von Bakterien als Glycerinkultur.....	29
2.3.16	Isolierung von Plasmiden.....	29
2.3.17	Restriktion von DNA.....	30
2.3.18	Sequenzierung von DNA.....	30
2.3.19	Isolierung von genomischer DNA.....	31
2.3.20	Nicht-radioaktive Markierung von DNA.....	31
2.3.21	Southern-Blots.....	31
2.3.22	Northern Blots.....	32
2.3.23	Hybridisierung der Northern blots.....	33
2.4	Morphologische Methoden.....	33
2.4.1	Beschichtung von Objektträgern mit Chrom-Alaun-Gelatine.....	33
2.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz mit Präparaten von Spermienstadien und reifen Spermien aus der Samenblase.....	34
2.4.3	Färbung von Spermienstadien mit Phalloidin.....	35
2.4.4	Färbung von Spermienstadien mit DAPI.....	36
2.4.5	Gefriermikrotomie.....	37
2.4.5.1	Vorbereitung des Gewebes, Einbettung und Schneiden.....	37
2.4.5.2	Indirekte Immunfluoreszenz.....	37
2.4.6	Semi- und Ultradünnschnitt-Technik.....	37
2.4.6.1	Einbettung in Araldit.....	38
2.4.6.2	Ultramikrotomie, Kontrastierung und Elektronenmikroskopie.....	38
2.4.6.3	Einbettung in LR-Gold.....	38
2.4.6.4	Immunogold-Applikation.....	39
2.5	Verwendete Computerprogramme.....	39

3. Ergebnisse	41
3.1 Varianten des Gelsolin-verwandten Proteins im Hautmuskelschlauch des Regenwurms	41
3.1.1 Aufreinigung der EWAM-Fractionen aus dem Hautmuskelschlauch durch Anionen-Austauscherchromatographie.....	41
3.1.2 Vergleich der proteolytischen Spaltprodukte der gereinigten EWAM-Fractionen.....	43
3.1.3 Die Sequenz einer zweiten Isoform aus der P2/P3-Gruppe des Gelsolin-verwandten Proteins.....	46
3.1.4 Charakterisierung der beiden Isoformen aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen	50
3.1.5 Vergleiche der Aminosäuresequenzen der EWAM-Isoformen P1 und P2 untereinander und mit anderen Actin-Modulatoren.....	51
3.2 Gelsolin-verwandte Proteine im Kaumagen	63
3.2.1 Aufreinigung der EWAM-Fractionen aus dem Kaumagen.....	63
3.2.2 Zuordnung der isolierten EWAM-Fraktion zu den Aktivitätspeaks des Hautmuskelschlauchs.....	65
3.2.3 RT-PCR mit Kaumagen-RNA.....	66
3.3 Gelsolin-verwandte Proteine in Spermienstadien	68
3.3.1 Aufreinigung von EWAM aus den Samenblasen des Regenwurms.....	68
3.3.2 Die hauptsächlich in den Samenblasen vorkommende EWAM-Isoform ist EWAM-P1.....	69
3.3.3 RT-PCR mit Samenblasen-RNA.....	71
3.3.4 Die Sequenzierung eines RT-PCR-Fragments bestätigt die Identität des Samenblasen-EWAM mit P1.....	71
3.4 Northern-Blots der Gesamt-RNA der untersuchten Gewebe	72
3.5 Untersuchungen mit genomischer DNA: P1 und P2 werden von verschiedenen Genen codiert	75

3.6 Lokalisation Gelsolin-verwandter Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz	77
3.6.1 Lokalisation von P2/P3 im Hautmuskelschlauch.....	77
3.6.2 Enzymhistochemische Färbung von Gefrierschnitten des Hautmuskelschlauchs.....	80
3.6.3 Anfärbung von Gefrierschnitten des Kaumagens mit anti-P2-Antikörpern.....	81
3.6.4 EWAM in anderen Geweben des Regenwurms.....	82
3.6.5 Lokalisierung von P2 innerhalb der Muskelzellen des Kaumagens.....	84
3.6.6 Färbung von Spermienstadien des Regenwurms.....	87
3.6.7 Lokalisation von F-Actin in den Spermienstadien.....	92
3.6.8 Die Färbung von Spermienstadien mit anti-Fragmin-Antikörpern ermöglicht eine distinkte Markierung in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	95
4. Diskussion	100
5. Zusammenfassung	128
6. Literatur	129
7. Anhang	141

1 Einleitung

Das Cytoskelett erfüllt nicht nur stützende und formerhaltende Funktionen in eukaryontischen Zellen, sondern es ermöglicht auch zelluläre Bewegungsvorgänge. Die wichtigsten dynamischen Elemente des Cytoskeletts sind das Actomyosin-System mit den Actin-bindenden Proteinen und das Mikrotubuli-System mit den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen. Das Mikrotubuli-System ist am Vesikel- und Organellentransport, an der Ausbildung der Teilungsfurche, an der gerichteten amöboiden Zellwanderung und der Cilienbewegung, Bewegung der Chromosomen während der Zellteilung, Orientierung der Spindel und Wanderung des Kerns beteiligt (Übersichtsartikel: Goode et al., 2000). In den vergangenen Jahren sind eine Anzahl von Proteinen identifiziert worden, die das Actin- und Mikrotubuli-Filamentsystem überbrücken, z. B. in Form von miteinander verbundenen Hetero-Motor-Komplexen (Goode et al., 2000). Obwohl beide Filamentsysteme häufig ähnliche Aufgaben bei zellulären Bewegungsvorgängen zu erfüllen scheinen, wird in der Zelle für bestimmte Vorgänge jeweils ein Filamentsystem bevorzugt eingesetzt: Mikrotubuli scheinen z. B. besonders am Vesikeltransport über weite Strecken wie dem axonalen Transport beteiligt zu sein (Goode et al., 2000) und während der amöboiden Bewegung an den Vorgängen des Ein- und Hinterherziehens des hinteren Zellpols sowie der Regulierung der Adhäsion an das Substrat (Ballestream et al., 2000).

Actin erfüllt vielfältige Aufgaben innerhalb der eukaryontischen Zelle: Es ist sowohl an der Kontrolle der Zellgestalt, an Funktionen wie Sekretion oder Phagozytose, an Zellteilungen, an der Verbindung mit anderen Zellen und der extrazellulären Matrix und auch an der Erzeugung von Kraft bei Bewegungsvorgängen beteiligt. Diese Vorgänge setzen eine ständige Umorganisation des Actingerüsts voraus, was zum Teil durch die dynamischen Eigenschaften des Actins selbst ermöglicht wird. Eine andere Voraussetzung besteht in der Feinabstimmung des Auf- und Abbaus des Actin-Cytoskeletts durch Actin-bindende Proteine. Besonders interessant sind jene Actin-bindenden Proteine, die auf den Polymerzustand von Actin Einfluss nehmen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Vertreter dieser Gruppe, dem Actin-bindenden Protein des Regenwurms EWAM (earth-worm actin modulator). Das entsprechende Protein der Wirbeltiere ist das Gelsolin.

Actin ist ein ubiquitäres Protein, das den größten Anteil des Cytoskeletts ausmacht. Es ist eines der mengenmäßig häufigsten Proteine und stellt ca. 2% des Gesamtproteins in der Normalzelle, 10% oder mehr des Gesamtproteins in Muskelzellen und amöboid beweglichen Zellen und sogar 20% in Blutplättchen, was einer Konzentration in einer Normalzelle von mehreren Hundert $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ entspricht (Stossel, 1989).

Vergleiche der Aminosäuresequenzen von Actinen aus unterschiedlichen Organismen zeigen, dass Actin stark konserviert ist. Beispielsweise zeigen die transkribierten Muskel- und cytoplasmatischen Proteine von Vertebraten und Protozoen nur minimale Sequenzunterschiede von ca. 5% (Pollard und Cooper, 1986). Dies weist darauf hin, dass alle Anteile des globulären Actin-Monomers essentiell für die Ausübung seiner Funktionen sind (Amos und Amos, 1991).

Die meisten Organismen besitzen mehrere Isoformen von Actin, die sich in einer oder wenigen Aminosäuren voneinander unterscheiden (Amos und Amos, 1991). Säugetiere z. B. besitzen mindestens sechs Actin-Isoformen mit geringen Unterschieden, nämlich drei α -Actine, die in Muskelzellen exprimiert werden (je eins in Skelett-, Herz- und glatter Muskulatur), das α -Actin und ein α -Actin als sogenannte cytoplasmatische Actine in Nichtmuskelzellen und ein weiteres α -Actin in glatten Darmmuskelzellen (Vandekerckhove und Weber, 1978, Herman, 1993). Diese Isoformen bilden Filamente mit leicht unterschiedlicher Stabilität, und sie weisen Unterschiede in der Stärke der Interaktion mit anderen Proteinen auf (Amos und Amos, 1991, Herman, 1993). Unterschiede zwischen Muskel- und Nichtmuskel-Actinen finden sich auch am amino-Terminus des Actin-Moleküls an der Bindungsstelle von Myosin (Holmes et al., 1993, Mounier und Sparrow, 1997). Zusätzlich erscheint die Domäne 1 (s. u.) in Nichtmuskel-Actinen weniger kompakt und flexibler, was vermutlich zu funktionellen Unterschieden beiträgt. Muskel-Actine zeichnen sich dagegen durch eine größere interne Flexibilität aus (Mounier und Sparrow, 1997).

Actin liegt in zwei Formen vor: Als globuläres Protein (G-Actin) und als filamentöses Polymer (F-Actin). Um Informationen über die dreidimensionale Gestalt von Actin-Monomeren zu erhalten, sind eine Reihe von Parakristallen und kristallinen Aggregaten, die Actin enthalten, untersucht worden (Aebi et al., 1981, Suck et al., 1981, Schutt et al., 1989). Erste mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse auswertbare Kristalle wurden durch die Bildung eines 1:1-Komplexes von Kaninchen-Skelettmuskel-Actin und Rinder-Pankreas-DNase I hergestellt, so dass die Tertiärstruktur des Actins auf atomarer Ebene sowohl in der ATP- als auch in der ADP-Form ermittelt werden konnte (Kabsch et al., 1990). Die Monomer-Struktur des G-Actins von ca. 43kDa zeigt danach zwei Domänen, wobei eine geringfügig größer als die andere ist. Die kleinere Domäne kann in die Subdomänen 1 und 2 unterteilt werden, die größere Domäne in Subdomänen 3 und 4. Actin hat molekulare Abmessungen von etwa 3,5 x 5,5 x 5,5nm. Ein Nukleotid (ATP oder ADP) bindet in

dem Spalt zwischen den beiden Domänen und direkt damit assoziiert das hoch-affin gebundene zweiwertige Metallion (unter physiologischen Bedingungen Mg^{2+}). Das elektronenmikroskopische Bild des F-Actins lässt mehrere Deutungen der Struktur zu (Egelmann, 1985, Amos, 1985). Meist wird das Actin-Filament als zweisträngige Helix beschrieben, wobei sich die beiden Stränge nach jeweils 36-40nm überschneiden. Die Kontakte zwischen den Monomeren sind nicht-kovalent und kommen durch „hydrophobe Finger“ zustande (Holmes et al., 1990).

Actin-Monomere besitzen *in vitro* die Fähigkeit, abhängig von der Salzkonzentration und der Konzentration der Monomere reversibel zu doppelhelikalen F-Actin-Filamenten von mehreren Mikrometern Länge zu polymerisieren.

Die Filamente sind polar gebaut, was elektronenmikroskopisch an reinen Actin-Filamenten nicht erkennbar ist. Dekorierung mit Fragmenten des Myosins wie dem Subfragment S1 lassen jedoch die strukturelle Polarität in Form einer Pfeilspitzen-Struktur erkennbar werden, wobei ein Ende des Filaments nach seinem Aussehen als „barbed“ und das andere als „pointed“ Ende bezeichnet wird (Huxley, 1963). Beide Enden sind in der Lage, G-Actin-Moleküle anzulagern oder abzugeben. Die kinetische Polarität äußert sich darin, dass am „barbed-“, schnell-wachsenden oder plus-Ende die Assoziation von Monomeren (in ATP-Form) an das Filament überwiegt und am „pointed-“, langsam-wachsenden oder minus-Ende die Dissoziation von Monomeren (in ADP-Form) vorherrscht. Dies führt zum sogenannten „Treadmilling“ des Polymers, d. h. zu einem Hindurchwandern individueller Actin-Moleküle durch das Filament (Wegner, 1976). Der Polymerisationsgrad, d. h. die Filamentlänge, wird durch die kritische Konzentration reguliert. Die kritische Monomerenkonzentration ist definiert als diejenige, bei der sich An- und Abbau die Waage halten, also der Nettozuwachs am plus-Ende gleich dem Nettoverlust am minus-Ende ist, und bezeichnet die Konzentration an G-Actin, die im Gleichgewichtszustand zwischen Polymeren und Monomeren herrscht (Wegner, 1976). Für das plus- und das minus-Ende gelten unterschiedliche kritische Konzentrationen (Wegner, 1982).

Zur Polymerisation ist weiterhin die Bindung eines Nukleotids notwendig, normalerweise ATP, das im Laufe der Polymerisation zu ADP hydrolysiert wird. ATP-Actin polymerisiert bevorzugt, die Abgabe des anorganischen Phosphats nach der Hydrolyse führt zur Destabilisierung des Filaments und fördert die Depolymerisation (Belmont et al., 1999). Die Monomere, die abdissoziieren, tauschen ihr ADP gegen ATP aus (Amos und Amos, 1991).

Die Polymerisation von G- zu F-Actin wird als dreiphasiger Vorgang aufgefaßt: 1.) schnelle Monomer-Aktivierung, 2.) geschwindigkeitslimitierende Nukleation durch Bildung von Trimeren als Polymerisationskeime, 3.) moderat schnelle Elongation, die zu einem Gleichgewichtszustand führt (Übersichtsartikel Carlier, 1991, Pollard, 1990).

Eine gezielte, regulierbare Umorganisation des Actinfilamentgerüsts im Zusammenhang mit der Zellaktivität muss eingebunden sein in Signaltransduktionswege, um auf extrazelluläre Stimuli reagieren zu können. Auf welche Weise chemische Signale, die von der Zelle empfangen werden, in Reaktionen der Zelle übersetzt werden, d. h. in Veränderungen der Zellfunktionen und (in tierischen Zellen) in eine zielgerichteten Bewegung (Chemotaxis), ist Gegenstand intensiver Forschungsaktivitäten in der Zellbiologie. Ein Teilaspekt dieser komplexen Fragestellung lässt sich durch die Untersuchung Actin-bindender Proteine - und hierbei speziell solcher Proteine, die Einfluss auf den Polymerzustand von Actin nehmen – beleuchten.

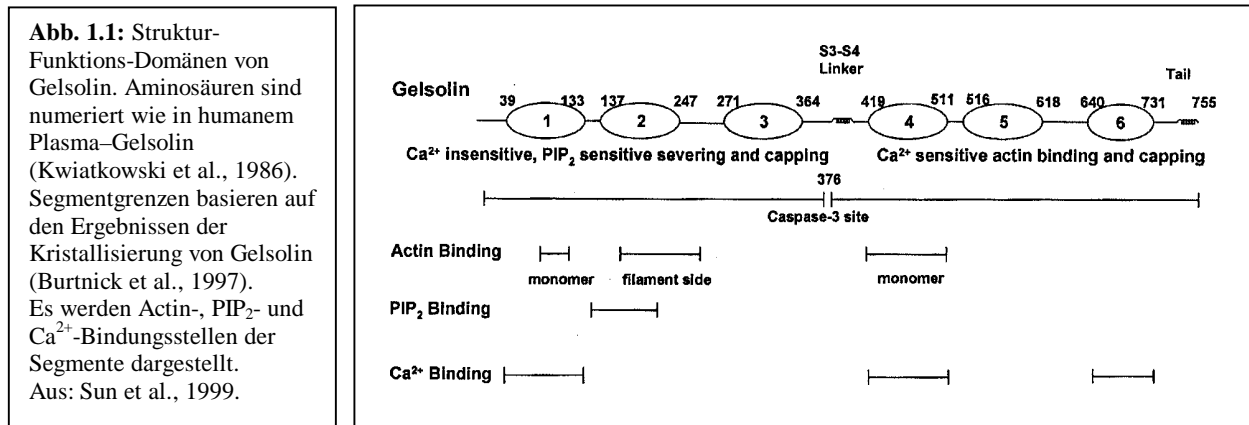
Wären keine Actin-bindenden Proteine vorhanden, läge nahezu das gesamte Actin aufgrund der hohen Konzentration an Actin-Monomeren und der physiologischen Verhältnisse in der Zelle als lineare, unverknüpfte Filamente vor. Tatsächlich jedoch liegt etwa die Hälfte als Monomere vor (Stossel, 1989). Die Funktionen, die Actin-bindende Proteine ausüben, lassen sich unterteilen in die laterale, stabilisierende Bindung an die Filamente, das Vernetzen der Filamente miteinander und Einflussnahme auf den Polymerisationsgrad des Actins. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass viele Proteine mehrere Möglichkeiten besitzen, mit Actin zu interagieren, was die Einteilung problematisch macht. Im Hinblick auf die Umorganisation des Actin-Cytoskeletts ist besonders die Gruppe von Proteinen interessant, die Einfluss auf den Polymerisationsgrad des Actins nehmen. Hierzu zählen Sequestrierer, die Monomere binden und damit aus dem Gleichgewicht entfernen (z. B. Profilin (Carlsson et al., 1976, Sun et al., 1995, Weber, 1999), DNase I (Lazarides und Lindberg, 1974), Vitamin-D-Binding-Protein (Jockusch und Hinssen, 1996), Thymosin β 4 (Hannappel et al., 1982), Capping-Proteine, die das plus- oder das minus-Filamentende blockieren (z. B. Cap 39 (Yu et al., 1991), Cap Z (Schafer et al., 1996, Carlier und Pantaloni, 1997, Littlefield und Fowler, 1998, Weber, 1999), Tropomodulin (Littlefield und Fowler, 1998, Weber, 1999), Beta-Actinin (Amos und Amos, 1991), Arp2/3-Komplex (actin-related proteins 2 und 3 und fünf weitere Proteine) (Mullins et al., 1998, Rohatgi et al., 1999, Svitkina und Borisy, 1999) und Modulatoren, die Filamentenden blockieren, Filamente schneiden und die Nukleation fördern (Hinssen,

1981 a). Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Protein EWAM wird wie Gelsolin, Severin, Fragmin und Villin zu den Modulatoren gerechnet.

Zum Vertebraten-Gelsolin liegen bislang die meisten Untersuchungen vor. Der Begriff Gelsolin wurde geprägt, da der zunächst beobachtete Effekt des Proteins war, Actin-Gele *in vitro* in ein Sol zu verwandeln. Dies beruht auf der Fähigkeit der Mitglieder der Familie der Gelsolin-verwandten Proteine, Actin-Filamente zu verkürzen, indem sie die nicht-kovalente Bindung zwischen den Actin-Actin-Monomeren in einem Actin-Filament aufbrechen (Schneiden), an das schnellwachsende Ende binden (Capping) und die Monomer-Anlagerung dadurch an diesem Ende blockieren. Schneiden stellt dabei die Abschwächung von genügend nicht-kovalenten Bindungen zwischen Actin-Molekülen eines Filaments dar (Sun et al., 1999). Andererseits fördert Gelsolin die Neubildung von Actin-Filamenten durch Nukleation. Gelsolin bindet diffusionsabhängig und schneidet mit einer Zeitverzögerung (Selden et al., 1998). Diese hat ihre Ursache eventuell in notwendigen Strukturveränderungen am Gelsolin und am Filament, das im Laufe des Schneidevorgangs abgelenkt wird (McGough et al., 1998). Die Interaktion mit Actin wird durch mikromolare Calcium-Konzentrationen und pH-Werte $<6,5$ synergistisch aktiviert und durch Phosphatidylinositide vom D3- und D4-Typ inhibiert (Kwiatkowski, 1999). Die Aktivierung durch mikromolares Ca^{2+} ist wahrscheinlich in einer Konformationsänderung des Gelsolins begründet. Gelsolin besitzt in EGTA eine kompakte Struktur, wobei die kurze carboxy-terminale Helix die Actin-Bindungshelix der Domäne 2 blockiert. Bei Anwesenheit von Ca^{2+} jedoch erfährt Gelsolin eine Streckung, so dass die Bindungsstelle frei wird (Pseudosubstrat- oder „tail-latch“- , d. h. „Schwanz-Klinken“-Hypothese, Burtnick et al., 1997). Eine Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration durch Komplexbildung mit EGTA führt nicht zu einer Inaktivierung und damit Dissoziation des Gelsolins vom Actin, da ein Ca^{2+} -Ion zwischen Gelsolin und Actin eingefangen und für EGTA unerreichbar bleibt (McLaughlin et al., 1993). Erst mit Phosphatidylinositiden ist eine Inhibierung von Gelsolin zu erreichen, das mit mikromolarer Affinität abhängig von Ca^{2+} -Konzentration und pH-Wert gebunden wird (Lin et al., 1997). Die Inhibierung durch Phosphatidylinositide kommt wahrscheinlich durch Konkurrenz zwischen Phosphatidylinositid und Actin um eine gemeinsame Bindungsstelle zustande (Burtnick et al., 1997, Kwiatkowski, 1999). Auch das Cytokin Lysophosphorsäure inhibiert die Schneideaktivität von Gelsolin (Meerschaert et al., 1998).

Gelsolin besteht aus zwei tandem-homologen Hälften, die jeweils eine dreifache segmentale Wiederholung aufweisen (Domänen oder Segmente 1-3 und 4-6) (Kwiatkowski

et al., 1986, Burtnick et al., 1997). Die beiden Hälften sind über eine Verbindungssequenz miteinander verbunden, die durch Caspase-3 gespalten werden kann. Da die carboxy-terminale Hälfte die Effektivität des Schneidens der amino-terminalen Hälfte verstärkt, wird eine kooperative Bindung beider Hälften an das Actinfilament vermutet (Selden et al., 1998).



Das Ergebnis der Interaktion von Gelsolin-verwandten Proteinen mit F-Actin ist *in vitro* stets die Bildung einer großen Anzahl kurzer, mit einer Kappe aus Gelsolin versehener Actin-Filamente, die sich nicht wieder miteinander verbinden oder sich an ihrem schnellwachsenden Ende verlängern können (Sun et al., 1999). Das kinetische Verhalten von reinem Actin bevorzugt dagegen die Bildung einer abnehmenden Anzahl von zunehmend längeren Filamenten (Kwiatkowski, 1999, Sun et al., 1999, Yin und Stull, 1999).

Actin-Modulatoren werden nach ihrer Masse in die Gruppe der 40kDa- und die Gruppe der 80kDa-Modulatoren unterteilt. Die Proteine aus der Gruppe der „großen“ Actin-Modulatoren werden Gelsolin genannt, während solche Proteine, die zwar die gleichen Eigenschaften *in vitro* zeigen, aber ein abweichendes Molekulargewicht besitzen, Gelsolin-verwandt oder Gelsolin-ähnlich genannt werden. Das zunächst aus den Makrophagen des Kaninchens isolierte 80kDa-Vertebraten-Gelsolin ist der am besten untersuchte Vertreter (Yin und Stossel, 1979). Gelsolin wurde anschließend in verschiedenen Säugetieren und in vielen Geweben, sowohl in Muskel- als auch in Nichtmuskelzellen, gefunden. Große Modulatoren finden sich jedoch nicht nur bei Vertebraten, sondern auch bei Wirbellosen. 80kDa-Gelsoline wurden aus der Muskulatur von Arthropoden, nämlich aus dem Schwanzmuskel der Krebse *Astacus leptodactylus* (Bock et al., 1994) und *Homarus americanus* (Lück et al., 1995) isoliert. Bei der Obstfliege *Drosophila melanogaster* wurde die cDNA eines 80kDa-Modulators sequenziert, eincloniert und elektrophoretisch analysiert (Heintzelman et al., 1993, Stella et al., 1994), ohne dass das Protein bislang aus den

Tieren selbst isoliert werden konnte. Das Protein wurde allerdings in verschiedenen Geweben des Fliegenembryos lokalisiert, u. a. in der Muskulatur und im Fettkörper. Auch beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnte bislang nur das Gen eines 80kDa-Proteins identifiziert werden (Waterston et al., 1992), wobei es sich möglicherweise tatsächlich um das Gen eines Flightless-artigen Proteins handelt (D`Haese, persönliche Mitteilung). Ebenfalls konnten aus dem Kiemendarm und Mantel von Tunicaten 80kDa-Modulatoren isoliert und sowohl auf Protein- wie auf DNA-Ebene analysiert werden (Ohtsuka et al., 1994, Giebing et al., 1996, Langer et al., 1998).

Bislang sind die 40kDa-Gelsolin-artigen Proteine Fragmin und Severin der Schleimpilze *Physarum polycephalum* (Hasegawa et al., 1980, Hinssen, 1981 a, Hinssen, 1981 b) und *Dictyostelium discoideum* (Brown et al., 1982), der Actin-Modulator des Hautmuskelschlauchs des Regenwurms *Lumbricus terrestris* (D`Haese und Hinssen, 1987, Giebing et al., 1994), der Actin-Modulator des Adduktor-Muskels der Muschel *Pecten jacobaeus* (Remmert et al., 1996) und Actin-Modulator aus Eiern des Seeigels *Hemicentrotus pulcherrimus* (Wang und Spudich, 1984, Coluccio et al., 1986) isoliert und biochemisch charakterisiert worden. Die Mitglieder der Proteinfamilie sind durch den Besitz einer sich drei- oder sechsfach wiederholenden Sequenz von 125 bis 150 Aminosäuren charakterisiert (Way und Weeds, 1988). Sequenz-Analysen haben zu der Ansicht geführt, dass 80kDa-Proteine im Laufe der Evolution durch eine Duplikation eines für die 40kDa-Modulatoren codierenden Gens entstanden sind (Kwiatkowski et al., 1986). Dieses Gen wiederum ist aus der Gentiplikation einer prototypischen Region hervorgegangen, was durch die Struktur von kristallisiertem Gelsolin nahegelegt wird (Way und Weeds, 1988, Burt-nick et al., 1997).

Die Genduplikation scheint also mehrfach im Laufe der Entwicklung der Wirbellosen stattgefunden zu haben: Kleine Gelsolin-artige Proteine treten sowohl bei den Protostomiern Annelida und Mollusca und bei den Deuterostomiern Echinodermata auf, während es auch Protostomier wie z. B. einige Arthropoden und eventuell Nematoden mit großen Modulatoren gibt.

Proteine, deren Aminosäuresequenz mit leichten Variationen wie Gelsolin aus sechs Tandem-Kopien der Kernsequenz bestehen, werden zur Gelsolin-Familie gerechnet. Hierzu gehören Adseverin, Human Flightless, Advillin, Supervillin und Villin.

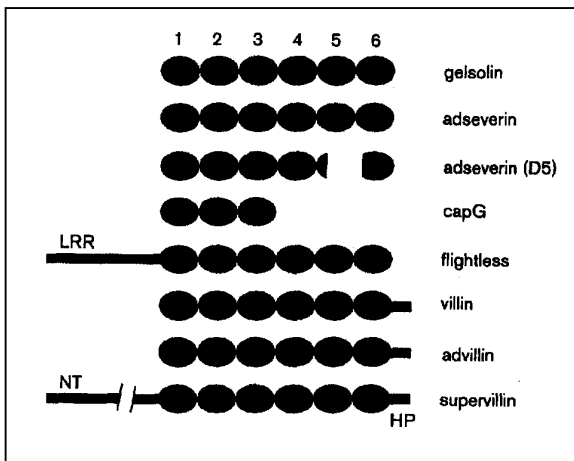


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von acht Mitgliedern der Gelsolin-Familie (nur Beispiele aus Säugetieren). Als Oval gezeigt wird die Kernsequenz, die jeweils sechsfach wiederholt wird. LRR = leucine-rich repeat, HP = headpiece, NT = nuclear translocation domain.
Aus: Kwiatkowski, 1999

In vitro sind die Eigenschaften von Gelsolin und Gelsolin-ähnlichen Proteinen recht gut untersucht, d. h. seine Sensitivität bezüglich Ca^{2+} und PIP_2 , die Fähigkeit, filamentöses Actin zu fragmentieren, an das schnellwachsende Ende zu binden und die Nukleation zu fördern. Für einige dieser Eigenschaften konnte gezeigt werden, dass sie auch *in vivo* bei Prozessen der Veränderung der Zellaktivität von Bedeutung sind. Einige dieser Untersuchungen sollen im Folgenden aufgeführt werden. Die Bedeutung der Nukleation ist besonders schwierig nachzuweisen, weshalb hierzu keine Untersuchungsergebnisse vorliegen.

Durch die Sensitivität gegenüber der Veränderung der zellulären Ca^{2+} - und PIP_2 -Konzentration ist Gelsolin eingebunden in Signalprozesse, die Membran- und Cytoskelett-Ereignisse miteinander verbinden. Das Kräuseln des vorderen Zellpols amöboider Zellen wird durch das kleine G-Protein Rac aktiviert (Sun et al., 1999). Da in Gelsolin-Null-mutanten Mäusen die Expression von Rac-GTPase auf das Fünffache erhöht ist und sowohl die Rac-Überexpression als auch die gestörte Beweglichkeit amöboider Zellen durch Transfektion von Gelsolin aufgehoben werden kann, wird Gelsolin als eine Art Effektor angesehen, der extrazelluläre Bewegungssignale von der Rac-GTPase an das Actin-Cytoskelett weiterleitet (Azuma et al., 1998). Die dazwischenliegenden Schritte sind noch nicht vollständig aufgeklärt, aber die Typ I-Phosphatidylinositol-5-Kinasen (PIP5Ks), die PIP_2 synthetisieren, könnten eine Verbindung darstellen (Fruman et al., 1998, Anderson et al., 1999). Die Aktivierung der PIP5Ks durch die kleinen G-Proteine führt in Membrannähe lokal zu erhöhten PIP_2 -Konzentrationen und löst dort Kaskaden aus, die zu einer Umgestaltung des Cytoskeletts führen können (Übersichtsartikel: Toker, 1998, Anderson et al., 1999), u. a., indem PIP_2 zu einer Inaktivierung von Gelsolin und Dissoziation vom plus-Ende führt (s. o.). Wird durch Mikroinjektion von Antikörpern PIP_2 blockiert, wird die Bildung von Stressfasern verhindert (Gilmore und Burridge, 1996). Eine Überexpression von Gelsolin führt zu einer vermehrten Kräuselung des Vorderrandes und verstärkter

Chemotaxis (Cunningham et al., 1991). Hartwig et al. (1995) konnte den gesamten Reaktionsweg der Plättchen-Aktivierung von der Thrombin-Stimulierung über Rac-Aktivierung, PIP₂-Synthese und plus-Ende nukleierte Actin-Anlagerung rekonstruieren.

Die Fragmentierung und das Binden an das schnellwachsende Ende der Actin-Filamente sind eng miteinander gekoppelte Prozesse. Die physiologische Relevanz konnte z. B. indirekt gezeigt werden, indem die Reaktionen von Zellen beobachtet wurden, bei denen die Expression von Gelsolin unterdrückt wurde. Neuriten von Gelsolin-Null-Mäusen etwa zeigen eine höhere Zahl von Filopodien über ihre gesamte Länge, da die Retraktion der Filopodien verzögert abläuft (Lu et al., 1997). Gelsolin scheint also am Abbau des Actin-Filament-Systems in sich zurückziehenden Filopodien beteiligt zu sein. Auch durch die Lokalisation von Gelsolin an Orten, an denen das Actin-Cytoskelett in transportable Fragmente zerlegt werden muss, konnten Hinweise gesammelt werden, dass die Schneideaktivität von Gelsolin *in vivo* von Bedeutung ist. In Ratten-Ganglien konnte Gelsolin nach Gabe von Nerven-Wachstumsfaktor in Lamellipodien und den Wachstumskegeln lokalisiert werden (Tanaka et al., 1993) und auch in Myelinzellen, die sich mit Hilfe ihrer Lamellipodien um den Nerv herumbewegen, um ihn einzuwickeln (Tanaka und Sobue, 1994). In Makrophagen und Thrombocyten konnte die Assoziation mit dem submembranösen Actin-Cortex gezeigt werden (Yin et al., 1981, Hartwig et al., 1989). McGrath et al. (2000) gelang es, durch Versuche mit fluoreszierenden Actin-Monomeren (PAF- und FRAP-Versuche) *in vivo* und unter Anwendung von mathematischen Modellen die Beteiligung von Gelsolin am Umbau von Actin durch Schneiden der Filamente in der vordersten Zone amöboid beweglicher Zellen (Primärkulturen von Aorta-Endothelzellen) sehr wahrscheinlich zu machen. Auch während der Apoptose scheint die Schneideaktivität von Gelsolin von Bedeutung zu sein. Caspase-3, eine Haupt-Effektor-Protease in einer Proteasen-Kaskade, die während der Apoptose aktiviert wird, schneidet Gelsolin *in vitro* (Kothakota et al., 1997). Das amino-terminale Spaltprodukt (Aminosäuren 1-352) schneidet Actin-Filamente Ca²⁺-unabhängig (Kothakota et al., 1997, Geng et al., 1999). Die Expression dieses Fragments des Gelsolins führt durch die Zerstörung des Actin-Cytoskeletts zu den charakteristischen Vorwölbungen der Membran (Sun et al., 1999). In Gelsolin-Null-Mutanten neutrophiler Granulocyten dagegen schreiten apoptotische Vorgänge langsamer voran (Kothakota et al., 1997). Dass Krebszellen, die eine erniedrigte Apoptoserate aufweisen, auch eine verringerte Gelsolin-Expression zeigen, unterstützt die These der pro-apoptotischen Wirkung von Gelsolin (Kwiatkowski, 1999). Die Expression von Gelsolin wird bei der Carcinogenese um 60-90% herunterreguliert (Kuzumaki et al., 1998). In

transformierten Epithelzellen ersetzt ein Säuger-Severin mit 40kDa Masse das 80kDa Gelsolin (Folger et al., 1999), was das Paradoxon der erhöhten Motilität von entarteten Zellen bei gleichzeitigem Verlust des Actin-Modulators Gelsolin erklären könnte.

Die extrazellulären Varianten von Gelsolin, die Plasma-Gelsoline, dienen vermutlich dem Zerschneiden von filamentösem Actin im Plasma von Vertebraten. Beim Absterben von Zellen wird sowohl G- als auch F-Actin in den extrazellulären Raum entlassen, wo die physiologischen Bedingungen die Bildung von elongierten Actin-Filamenten begünstigen (Janmey und Lind, 1987, Suhler et al., 1997, Burtnick et al., 1997). Solche Filamente würden die Viskosität des Blutes vergrößern und Kapillaren verstopfen, was vermutlich durch die Arbeit des Plasma-Gelsolins verhindert wird. Burtnick et al. (1997) nehmen an, dass die kurzen, am schnellwachsenden Ende blockierten Actin-Filamente bei der im Plasma herrschenden niedrigen G-Actin-Konzentration schnell vollständig zerfallen und die Monomere von dem Vitamin D-bindenden Protein sequestriert und aus dem Blutstrom entfernt werden. Neuere Untersuchungen geben jedoch Hinweise darauf, dass sezerniertes Gelsolin auch als Lipid-Carrier-Protein dienen könnte (Suhler et al., 1997), da es in der Lage ist, Lysophosphorsäure (LPA) effektiv zu binden (Meerschaert et al., 1998).

Der Muskel stellt hinsichtlich seiner hochgeordneten Struktur und seines relativ rigiden, invariablen Cytoskeletts einen Sonderfall dar, hier scheint die Anwesenheit von Gelsolin also nicht sinnvoll zu sein. Aus Muskelgeweben konnten jedoch recht große Mengen an Gelsolin isoliert werden (z. B. aus der glatten Muskulatur des Schweinemagens („PSAM“, Hinssen et al., 1985 a), aus der glatten Muskulatur der Ratten-Aorta (Chapponnier et al., 1990), aus der glatten Muskulatur der Hühnermagens und dem Skelettmuskel des Kaninchens (Hinssen et al., 1985 b). Für dünne Filamente aus der Schaf-Aorta konnte ein Verhältnis von 0,007 mol Gelsolin : 1 mol Actin gemessen werden (Gusev et al., 1994).

Mit Blick auf die Schneide- und Nukleations-Eigenschaften werden die vermuteten Funktionen der Gelsolin-verwandten Proteine in Muskeln im Zusammenhang mit der Organisation, dem Auf- und Umbau der dünnen Filamente gesehen (Rouayrenc et al., 1984). Eine Funktion beim Aufbau des kontraktilen Apparates, etwa während der Embryogenese (Kwiatkowski, 1999), wäre hierfür ein Beispiel. Aber auch nach Abschluss der Genese der Myofibrillen sind reife Muskeln keine absolut starren Konstruktionen, sondern sie unterliegen einer dauernden Reorganisation. Das äußert sich z. B. darin, dass fluoreszierende Actin-Monomere, die in lebende adulte Herzmuskelzellen injiziert wurden, bereits 30 Sekunden nach der Injektion in die I-Banden und Z-Linien eingebaut sind (Dome et al., 1988, LoRusso et al., 1992). Ein Beispiel für die Notwendigkeit dieses Turnovers ist der

ständige Austausch gealterter Actin-Moleküle, die aus dem dünnen Filament herausgeschnitten werden müssen (Rouayrenc et al., 1984). Versuche mit Rattenmuskeln unter katabolen Bedingungen zeigten, dass die Aktivität von Gelsolin zunahm, eventuell, um Actin-Filamente verstärkt abzubauen und zu verstoffwechseln (D`Haese et al., 1987). In glatten Muskelzellen des Ovars von Mäusen ist Gelsolin vermutlich an den kontraktile und morphogenetischen Prozessen während der Reifung des Follikels und während der Ovulation beteiligt (Teubner et al., 1994).

In Muskeln von Vertebraten konnte Gelsolin in den Z-Linien von Skelettmuskeln und in punktförmigen Strukturen in glatten Muskeln, die vermutlich den cytoplasmatischen Dense Bodies entsprechen, lokalisiert werden (Hinssen et al., 1985 b). Eine weitere Funktion von Gelsolin in Muskeln könnte daher der eines End-Proteins an intrazellulären Anheftungsstellen von Actin ähnlich wie CapZ sein.

Nach dem Calcium-Einstrom und der Aktivierung der Actomyosin-ATPase des Muskels erreicht die Calcium-Konzentration einen Bereich, der zum Schneiden der dünnen Filamente führen müsste. Da ein solches Schneiden aber nicht beobachtet wird, müssen die dünnen Filamente durch andere Proteine, wie etwa Tropomyosin (Hinssen et al., 1985 a) oder Nebulin (Gonsior und Hinssen, 1995), geschützt sein.

Chaponnier et al. (1990) demonstrierten den wechselnden Gelsolin-Gehalt in der glatten Muskulatur der Aorta bei Änderung der Organisation der Myofilamente im Laufe der Entwicklung, Migration und Proliferation. Bei Verletzungen der Gefäße werden die Myofilamente proliferierender und wandernder Zellen stark umorganisiert. Der Gehalt an Gelsolin stieg jedoch nicht über den Gehalt etablierter, wohlorganisierter Muskelzellen, was aber zu erwarten gewesen wäre, wenn man die Hauptaufgabe von Gelsolin im Schneiden, Cappen und Nukleieren sieht. Daraus lässt sich schließen, dass noch weitere Funktionen neben den „klassischen“ Aufgaben des Gelsolins existieren müssen. Es liegen eine Anzahl von Untersuchungen vor, die eine Beteiligung von Gelsolin an der Regulation der Kontraktion von Muskelzellen nahelegen, wenn auch die genauen Mechanismen, die dazu führen, noch ungeklärt sind. Es muss dabei aber in Betracht gezogen werden, dass die den Ergebnissen zugrunde liegenden Versuche an rekonstituierten Systemen *in vitro* durchgeführt wurden, deren Verhalten gegenüber nativen Systemen verschieden sein können. Eine Voraussetzung für solche „nicht-klassischen“ Funktionen von Gelsolin-verwandten Proteinen wäre auf jeden Fall eine Beeinflussung nicht direkt gebundener, sondern vom Modulator weit entfernter Actin-Moleküle des Filaments. Dies ist prinzipiell möglich, denn es konnte gezeigt werden, dass ein einzelnes Gelsolin-Molekül, das an das schnellwach-

sende Ende von F-Actin bindet, starke und über weite Strecken hinweg wirkende Konformationsänderungen des gesamten Filaments hervorrufen kann (Vouyiouklis und Brophy, 1997).

Für glatte Muskelzellen wird eine direkte Beeinflussung der Calcium-Sensitivität der Actomyosin-ATPase durch Gelsolin diskutiert (Teubner et al., 1994, Gusev et al., 1994), indem die Caldesmon-Inhibition reduziert wird. Gelsolin hat demnach einen positiven Effekt auf die Fähigkeit von Calmodulin, die Inhibierung der Actin-aktivierten Myosin-ATPase durch Caldesmon aufzuheben (Gusev et al., 1994). Gelsolin aktiviert die Actomyosin-ATPase durch Verkürzung der Actin-Filamente *in vitro* (Strzelecka-Golaszewska et al., 1985, Gailly et al., 1990). Gelsolin aus Rinder-Aorta verstärkt in der Gegenwart von Tropomyosin die Actin-aktivierte Myosin-ATPase durch die Verkürzung von F-Actin um das Vierfache (Ebisawa und Nonomura, 1985).

Das Gelsolin-verwandte Protein des Regenwurms EWAM war der erste Modulator, der aus der Muskulatur von Wirbellosen isoliert wurde (D`Haese und Hinssen, 1987). Die Menge an EWAM, die aus den schräggestreiften Muskelzellen des Hautmuskelschlauchs des Regenwurms isoliert werden kann (D`Haese und Hinssen, 1987), ist vergleichbar mit der, die aus der glatten Muskulatur von Vertebraten aufgereinigt werden kann (Hinssen et al., 1985a).

EWAM zeigt eine Ca^{2+} -sensitive Fragmentierung von Actin-Filamenten innerhalb von wenigen Sekunden, wie Gelsolin des glatten Muskels (Hinssen et al., 1985 a) und Makrophagen-Gelsolin (Janmey et al., 1985). Die Ca^{2+} -Konzentration, die zur Aktivierung notwendig ist, ist etwas niedriger als die, die für Fragmin (Hasegawa et al., 1980), Severin (Yamamoto et al., 1982) und verschiedene Vertebraten-Gelsoline gefunden wurde (Yin und Stossel, 1980, Yin et al., 1981, Hinssen et al., 1985a).

Die Auftrennung des Extrakts aus Hautmuskelschlauch mit Anionen-Austauscherchromatographie ergibt drei Aktivitätspeaks. Zwei dieser Proteinfractionen haben eine unterschiedliche apparente Masse von 43 und 45kDa im SDS-PAGE und verschiedene isoelektrische Punkte (D`Haese und Hinssen, 1987). Die Proteine der 45kDa-Bande lassen sich durch Anionenaustauscher-Chromatographie in zwei nacheinander eluierende Varianten weiter auftrennen. In funktionellen Tests waren die Eigenschaften dieser Fraktionen nicht unterscheidbar. Es wurde daher angenommen, dass es sich um verschiedene Isoformen von EWAM handelt.

Eine Isoform, die des ersten Peaks und daher P1 genannt, konnte komplett sequenziert werden (Giebing et al., 1994). An dieser Isoform wurden Untersuchungen zur Zuordnung

bestimmter Funktionen zu den individuellen Domänen mit Hilfe von Deletionsmutanten durchgeführt (Giebing et al., 1997).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war zunächst geplant, durch unterschiedliche Methoden Klarheit darüber zu erlangen, ob es sich bei diesen Varianten tatsächlich um Isoformen handelt. Um die Protein-Varianten weiter zu charakterisieren, wurden daher ihre immunologischen Eigenschaften und ihre Spaltmuster bei limitierter Proteolyse untersucht.

Weiterhin war beabsichtigt, durch die Sequenzierung einer weiteren EWAM-Variante, neben der bereits bekannten Sequenz von EWAM-P1, die Existenz von Isoformen weiter abzusichern.

Die Sequenzinformationen würden darüber hinaus Vergleiche mit anderen, gut untersuchten Actin-Modulatoren möglich machen. Es wurde daher erwartet, dass es aufgrund dieses Vergleiches möglich wäre, Vermutungen über die dreidimensionale Gestalt und die Lage funktionell wichtiger Peptide anzustellen. Der EWAM ist ein 40kDa-Modulator, für den, wie für 80kDa- Proteine, eine Komplexbildung mit zwei Actin-Monomeren nachgewiesen wurde (D`Haese und Hinssen, 1987). Die Lage der zweiten Actin-Bindungsstelle, die notwendigerweise auch F-Actin binden können muss, konnte jedoch noch nicht identifiziert werden (Giebing et al., 1997). Eine Lokalisation der zweiten Actin-Bindungsstelle könnte Hinweise auf den Mechanismus der Nukleation des EWAM geben, der sich von dem des Gelsolins unterscheidet, denn beim Gelsolin sind an der Nukleation das zweite und vierte Segment beteiligt (Pope et al., 1995).

Die Untersuchung anderer Organe auf Protein- und Nukleinsäureebene zeigte, dass die Actin-Modulator-Isoformen organspezifisch exprimiert werden. Durch die Lokalisation der Isoformen in den unterschiedlichen Organen und innerhalb von Zellen, besonders in den einer starken Formveränderung unterworfenen Stadien der Spermatogenese, und durch eine Kolo-kalisation des EWAM mit Actin wurden Hinweise auf die Funktion der Gelsolin-verwandten Proteine des Regenwurmes erwartet.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchte Organe

Es wurde das Gelsolin-verwandte Protein des Hautmuskelschlauchs, des Kaumagens und der Samenblasen isoliert.

RNA, Protein-Rohextrakte und zum Teil Gefrierschnitte wurden weiterhin untersucht von folgenden Geweben: Isolierter Ring- und Längsmuskel des Hautmuskelschlauchs, Pharynx, Lateralherzen, Bauchmark, Darm.

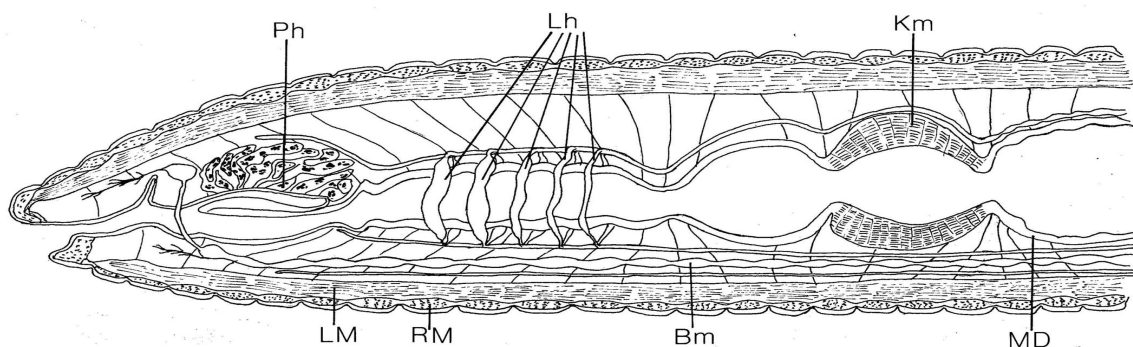


Abb. 2.1: Vorderende von *Lumbricus terrestris*, halbschematischer Medianschnitt (nach Peters und Walldorf (1986a), verändert). Bm: Bauchmark, KM: Kaumagen, LH: Lateralherzen, LM: Längsmuskel des Hautmuskelschlauchs, MD: Mitteldarm, Ph: Pharynx, RM: Ringmuskel des Hautmuskelschlauchs (aus Gründen der Übersichtlichkeit Samenblasen, die vom 10. und 11. Segment ausgehen, nicht eingezeichnet)

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Isolierung des Gelsolin-verwandten Proteins aus den Geweben des Regenwurms

Die Regenwürmer der Art *Lumbricus terrestris* wurden von einem Angelsportgeschäft lebend bezogen („Tauwürmer Giant Size“) und entweder sofort verarbeitet oder bei 4°C auf Blumenerde und Kaffesatz z. T. für mehrere Wochen gehältert. Vor der Präparation wurde die benötigte Anzahl Tiere (zwischen 50 und 100 Stück) unter fließendem Leitungswasser gesäubert und für ½ Stunde auf Eis gelegt. Die Tiere wurden längs aufgeschnitten, Kaumagen und/oder Samenblasen wurden entnommen und die restlichen Organe mit einem Spatel entfernt. Hautmuskelschläuche und Kaumagen wurden anschließend in Waschlösung von Erdpartikeln gesäubert.

Waschlösung:

20mM KCl
0,5mM MgCl₂
10mM Imidazol-HCl pH 6,4
20mM 2-Mercaptoethanol)

Die Aufreinigung aus dem Hautmuskelschlauch und dem Kaumagen erfolgte ähnlich wie von D`Haese und Hinssen (1987) beschrieben. Die Vorgehensweise umfasste eine Extraktion des EWAM in Abwesenheit von Ca²⁺, Ammoniumsulfat-Fällung und meist Gelfiltrationschromatographie unter Verwendung einer Superdex SD 200-Matrix (Amersham Pharmacia, Schweden).

Bei der Aufreinigung des EWAM aus den Spermienstadien wurde die Methode leicht modifiziert:

Es wurden pro Versuch 50 oder 100 Regenwürmer präpariert. Die entnommenen Samenblasen (jeweils möglichst alle 6) wurden in Regenwurmringer + EGTA auf Eis gesammelt. In einem Glas-Teflon-Handhomogenisator wurden die Samenblasen durch Zerdrücken eröffnet. Mit einem Teesieb wurden die festen Bestandteile, hauptsächlich die Wände der Samenblasen, abgetrennt. Die unreifen Spermienstadien wurden durch Zentrifugation in einem JA 20 Beckmann-Rotor bei 20.000rpm für 20min. pelletiert. Im Überstand befanden sich ausschließlich reife Spermien. Das Pellet wurde mit dem fünffachen Volumen EWAM-Extraktionspuffer im Glas-Teflon-Handhomogenisator aufgeschlossen.

EWAM-Extraktionspuffer:

0,5% Triton X-100
5mM Ethylenglycol-bis[β-Aminoethylether]-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)
5mM β-Mercaptoethanol
1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
1mM MgCl₂, 20mM KCl
10mM Imidazol/HCl pH 6,7.

Es folgten fraktionierte Fällungen mit 40%iger und anschließend mit 80%iger Ammoniumsulfat-Sättigung. Hierzu wurde Ammoniumsulfat p.a. in kleinen Portionen unter Rühren bei 4°C in die Proteinlösung gegeben, bis eine Sättigung von 40% erreicht war. Die Sus-

pension wurde für mindestens eine weitere Stunde gerührt und anschließend 25min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Vorgang wurde mit dem Überstand mit 80% Ammoniumsulfat-Sättigung wiederholt. Das Pellet dieses Arbeitsschrittes wurde im ein- bis zweifachen Volumen Puffer gelöst. Das Pellet wurde in wenig Dialysepuffer aufgenommen und über Nacht gegen 2l Startpuffer dialysiert. Eine Ultrazentrifugation bei 65.000rpm für 5 Stunden sedimentierte das Hämoglobin. Anschließend wurde das Dialysat sterilfiltriert, um Trübungen zu entfernen.

Dialysepuffer:

10mM KCl, 20mM Imidazol
1mM EGTA
0,5mM Dithiothreitol (DTT)
0,5mM MgCl₂ pH 7,6.

**Startpuffer der Säulenauf-
trennung:**

= Dialysepuffer + 0,5mM ATP.

Die chromatographische Auftrennung des Extrakts erfolgte über eine DEAE-Sephrose-Ionenaustauschersäule CL 6B mit 10ml Volumen mit 2,4ml Fraktionsvolumen bei einer Durchflussrate von 0,4ml/min. Es wurde zunächst mit 3 Volumen bei 10mM KCl eluiert, dann wurde mit einem linear ansteigenden KCl-Gradienten bis 150mM innerhalb von 15 Säulenvolumen eluiert. Fraktionen, die viskositätserniedrigende Aktivität zeigten, wurden mit Ammoniumsulfat gefällt und meist durch eine Gelfiltration mit 100mM KCl an Superdex SD 200 (Amersham Pharmacia, Schweden) weiter gereinigt. Die Flussrate der Gelfiltration betrug 0,4ml/min, die Fraktionsgröße 2ml.

2.2.2 Viskosimetrie

Die Fraktionen, die das Gelsolin-verwandte Protein enthielten, wurden mit Hilfe der Viskosimetrie mit Kaninchen-Skelettmuskel-Actin identifiziert (vergl. Hinssen et al., 1984). Es wurde ein Kapillar-Viskosimeter nach Ostwald mit 1ml Meßvolumen und einer Ausflußzeit für Wasser von 45s verwendet. Zur Ermittlung der modulatorhaltigen Fraktionen wurden alle 5 bis 10 Fraktionen Proben viskosimetrisch untersucht. Hierzu ließ man Skelettmuskel-G-Actin (0,76mg/ml Endkonzentration) in 0,2x Actin-Polymerisations-Puffer, 0,5mM CaCl₂ und 0,05xPolymerisations-Mix 10min bei 25°C polymerisieren. Nach Zugabe von 200µl Probe zur Erlangung eines Gesamtvolumens von 1ml wurde jeweils die Viskosität der Mischung (als Zeit, die die Flüssigkeit benötigt, um senkrecht zwei Messpunkte im Viskosimeter zu passieren) bei 25°C gemessen (MacLean-Fletcher und Pollard,

1980, Hinssen et al., 1984). Je mehr sich die Viskosität der Mischung nach Zugabe der Probe dem Wasserwert des Viskosimeters annähert, desto höher ist ihre Aktivität. Die Aktivität (in Prozent) ergibt sich als der Quotient der Laufzeitdifferenzen von F-Actin und F-Actin mit Modulator und F-Actin und Wasser.

Aktive Fraktionen wurden vereinigt und mit Ammoniumsulfat gefällt. Alle Schritte der Aufreinigung wurden mit SDS-PAGE dokumentiert.

Actin-Polymerisations-Puffer:10mM Na₂ATP

100mM Imidazol-HCl pH 7,0

Polymerisations-Mix:

2mM KCl

40mM MgCl₂

2.2.3 Isolierung der Proteine mit TRIzol

Mit TRIzol (Gibco BRL) können gleichzeitig RNA, DNA und Proteine isoliert werden. Die Proteinextrakte enthalten anschließend also keine Nukleinsäuren mehr und lassen sich daher besonders deutlich und konturiert mit SDS-PAGE auftrennen. Bei der Isolierung von Proteinen mit TRIzol wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Nach der Abtrennung der oberen, RNA-haltigen Chloroformphase wurden die Inter- und Phenolphase bei -20°C z. T. für einige Wochen eingefroren, bevor die Proteine isoliert wurden.

2.2.4 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Bio-Rad-Reagenz (Mikromethode), das das Farbstoffkonzentrat Coomassie-Brilliant-Blue R-250 (CBB, Bio-Rad) enthält. CBB bildet mit dem Protein einen farbigen Komplex. Der Komplex ist bei 595nm im Spektralphotometer (Beckmann) messbar. Als Standard diente eine Lösung von Rinderserum-Albumin (BSA) mit einer Konzentration von 0,5mg ml⁻¹.

2.2.5 SDS-PAGE

Nach der Methode von Laemmli (1970) und O'Farrell (1975) wurden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht in einem Mighty Small™ SE 245 Dual Gel Caster (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, Dimensionen des Gels 10cm x 8cm x 0,75mm) oder in Gradientengelen aufgetrennt. Es wurde mit einem Sammel- und einem Trenngel gearbeitet. Die Auftrennung erfolgte über ca. 1h bei 4°C und einem konstanten Strom von 23mA pro Gel. Die Gele wurden anschließend fixiert, gefärbt

(Neuhoff et al., 1985, 1988, 1990a, b) und überschüssiger Farbstoff wurde in einer Entfärbelösung entfernt (Stegemann, 1972). Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mit einem Agfapan APX 25-Rollfilm (Agfa).

In der diskontinuierlichen SDS-PAGE besaßen die Plattengele mit einem linearen Gradienten von 9-17% und Abmessungen von 1x150x170mm. Die Elektrophorese dauerte ca. 16h bei 4°C mit einer Stromstärke von 40mA pro Gelplatte und 400 Pulsen/sec (Ortec 4100 pulsed constant power supply).

Zur Abschätzung der molaren Massen wurde eine hochmolekulare Standardproteinmischung (Sigma SDS-6H) benutzt. Die Mischung enthält Myosin aus Kaninchen-Skelettmuskel (205kDa), β -Galactosidase aus *Escherichia coli* (116kDa), Phosphorylase B aus Kaninchen-Skelettmuskel (97,4kDa), Rinderserumalbumin (68kDa), Albumin aus Hühnererei (45kDa), Carboanhydrase aus Rindererythrocyten (29kDa), Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne (21kDa) und Cytochrom C (12,5 kDa).

Probenvorbereitung:

Die Proteinproben wurden in einem SDS-Inkubationsmedium (= Laemmli-Puffer) fünf Minuten gekocht und auf eine Endkonzentration von 14% (v/v) Glycerin und 0,002% Bromphenolblau eingestellt.

<p>11fach Laemmli-Puffer:</p> <p>11% (w/v) SDS 55% (v/v) β-Mercapto-ethanol 110mM TRIS-HCl, pH 8,0.</p>	<p>Sammelgel:</p> <p>4,8% Acrylamid 0,18% Bis-Acrylamid 0,1% SDS 125mM TRIS-HCl pH 6,8 0,1% Ammoniumperoxid-sulfat (APS) 0,1% N,N,N',N'-Tetra-methylethylendiamin (TEMED).</p>	<p>Trenngel:</p> <p>9, 15 oder 17% Acrylamid 0,13% Bis-Acrylamid 190mM TRIS-HCl pH 8,8 0,1 oder 0,2% SDS 10% Glycerin 0,4% APS 0,067% TEMED.</p>
<p>SDS-Elektrodenpuffer:</p> <p>0,1% (w/v) SDS 192mM Glycin 25mM TRIS-HCl, pH 8,8</p>	<p>Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbung:</p> <p>10% (w/v) Ammoniumsulfat 0,1% CBB (Serva Blue G-250) 2% (v/v) Phosphorsäure</p>	<p>Entfärbelösung:</p> <p>4,8% (v/v) Eisessig 28,6% (v/v) Methanol</p>

2.2.6 Western-Blots

Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus den Polyacrylamidgelen semi-dry elektrophoretisch mit einem Biometra Fast Blot-Gerät auf Nitrocellulose-Filter (Protran, Schleicher & Schuell, Porengröße 0,1 μ m) transferiert (Towbin et al., 1979, Khyse-Andersen, 1984). Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von max. 5mA/cm² Gelfläche mit einer Kühlung mit 5°C kaltem Wasser für ca. 1h. Der Erfolg des Transfers wurde durch reversibles Anfärben der Proteinbanden mit Ponceau S-Lösung kontrolliert (Salinovich und Montelaro, 1986). Anschließend wurde die Membran 1-2min unter mehrmaligem Wechseln mit PBS gewaschen und entfärbt.

Transferpuffer:

20% Methanol
192mM Glycin
25mM TRIS-HCl, pH 8,5

Ponceau S-Lösung:

0,2% (w/v) Ponceau S
3% (v/v) Sulfosalicylsäure
3% (v/v) Trichloressigsäure

2.2.7 Immunologische Detektion von Proteinen

Zunächst wurden die überschüssigen Proteinbindungsstellen der Membran mit Abdecklösung über Nacht bei 4°C saturiert, um eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern.

Abdecklösung:

0,2xPBS
0,2M NaCl
0,2% BSA
0,1% Tween 20

Die Blots wurden mit monoklonalem Maus-anti-P2 Erstantikörper, 1:10.000 mit Abdecklösung verdünnt, Kaninchen-anti-Fragmin-Antikörper, 1:50 000 verdünnt, oder Kaninchen-anti-P1-Antikörper, 1:50 000 verdünnt, 3 bis 4 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend 3x10min. mit Abdecklösung bei 4°C gewaschen. Die Zweitantikörperinkubation erfolgte mit einem 1:5.000 in Abdecklösung verdünnten, gegen Maus oder Kaninchen gerichteten Antikörper (Kaninchen-anti-Maus-Alkalische Phosphatase-Konjugat oder Ziege-anti-

Maus-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, beides Dianova) für 2 Stunden bei 4°C. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen bei Raumtemperatur in Abdecklösung entfernt, und anschließend wurde das Nitrocellulosefilter 2x10min mit Alkalische-Phosphatase-Puffer an das Milieu der alkalischen Phosphatase äquilibriert.

Alkalische-Phosphatase-Puffer:

0,1M TRIS-HCl

0,1M NaCl

50mM MgCl₂ pH 9,5.

Die Färbelösung enthielt 66µl der Nitroblautetrazolium (NBT)-Stammlösung (= 0,0066mg/ml) und 33µl der 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP)-Stammlösung (= 0,0033mg/ml) in Alkalische-Phosphatase-Puffer. Die Alkalische Phosphatase des Zweitantikörpers katalysiert eine Protonenabspaltung am BCIP, das dadurch zu einem blauen Indigofarbstoff wird, während das NBT durch die Aufnahme des Protons zu einem purpurfarbenen Diformazan reagiert (Blake et al., 1984).

BCIP-Stammlösung:

100mg BCIP in 1,9ml 100% Dimethylformamid (DMF) lösen,
ergibt ca. 50mg/ml in DMF; Lagerung bei -20°C

NBT- Stammlösung:

100mg NBT in 1,9ml 70% (v/v) DMF lösen;
ergibt ca. 50mg/ml in 70% (v/v) DMF; Lagerung bei -20°C

2.2.8 Limitierte Proteolyse mit V8

Erster Ansatz: 5µg gereinigter EWAM (P1 in einem Volumen von 2,5µl, P2 und P3 in einem Volumen von 10µl) wurden mit 50ng V8 *Staphylococcus aureus*-Protease in einem Volumen von 0,1µl versetzt, so daß sich ein Verhältnis von 1:100 ergab. Diese Mischung wurde für 0, 1, 3, 5, 10, 20, 40 oder 80min bei 20°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von Laemmli-Puffer und Kochen für 5min.

In einem zweiten Ansatz wurden 30mg gereinigter EWAM in einem Volumen von 30µl mit 0,15mg V8-Protease in einem Volumen von 1,5µl (für die Proteolyse von P1) oder 0,3mg

Protease in 0,15µl (für die Proteolyse von P2) für 1min (P1) bzw. 15min (P2) bei 25°C inkubiert.

In einem dritten Ansatz wurde Actin zu den gereinigten EWAM-Proteinfraktionen in einem Verhältnis von 2:1 (Actin:EWAM) hinzugefügt. Vor der Inkubation mit der Protease wurde die Lösung auf eine Konzentration von 2mM Ca²⁺ gebracht. Die Proteolyse wurde wie im zweiten Ansatz durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Produkte der Proteolyse in einem SDS/PAGE aufgetrennt und entweder mit Coomassie gefärbt oder auf Nitrocellulose transferiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DEPC-Behandlung von Wasser und Geräten

Bei der Arbeit mit RNA ist darauf zu achten, daß Geräte und die verwendeten Lösungen frei von RNAsen sind, da RNA sehr anfällig für enzymatisch katalysierte Hydrolyse ist. RNAsen sind ubiquitär, sehr stabil und nicht durch Autoklavieren zerstörbar, sondern renaturieren nach der Behandlung wieder. Die Behandlung von Kunststoffgeräten und Lösungen mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) unter Rühren bei 37°C für eine Stunde und anschließendes Autoklavieren oder Backen der Glasgeräte bei 180-200°C für vier Stunden dekontaminieren von RNAsen. DEPC ist ein starker RNase-Inhibitor (Fedorcsak und Ehrenberg, 1966). Kochen (z. B. im Autoklaven) zersetzt DEPC.

2.3.2 Isolierung von RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) oder mit TRIzol (Gibco BRL) isoliert.

RNeasy-Kit: Das Gewebe (ein Kubus von ca. 3mm Kantenlänge, bei der Verarbeitung des Samenblasen-Inhalts das Pellet der in Ringer + Ca²⁺ aufgefangenen Spermienstadien) wurde mit einem Glas-Teflon-Homogenisator (elektrisch angetrieben) in RLT-Puffer aus dem Kit aufgeschlossen und bei -80°C mehrere Tage bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Die DNA in der Probe wurde mit dem Qiashreder (Qiagen) geschert. Bei der weiteren Bearbeitung wurde den Herstellerangaben gefolgt. Die Elution der RNA von den Säulchen erfolgte mit 2x30µl DEPC-H₂O.

TRIzol: Es wurde weitgehend den Anweisungen des Herstellers gefolgt. Das Gewebe wurde mit einem Glas-Teflon-Homogenisator in TRIzol homogenisiert (elektrisch ange-

trieben). Das Homogenat wurde z. T. für mehrere Tage bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.3.3 Verwendete Primer

Erste Informationen über die Aminosäuresequenz wurden durch die Sequenzierung von Peptiden, die durch Lys-C Verdau erhalten worden waren, ermöglicht (Giebing et al., 1993, Giebing, 1994). Ein PCR-Fragment konnte mit Hilfe von PCR-Primern, die aufgrund dieser Sequenz-Informationen konstruiert worden waren, amplifiziert werden und diente als Sonde für das Screening der Hautmuskelschlauch-spezifischen cDNA-Bibliothek. Hierdurch konnte die Sequenz eines positiven Klons sequenziert werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz einem ca. 40kDa großen Gelsolin-verwandten Protein zugeordnet werden konnte, das EWAM-P1 darstellt (Giebing et al., 1993). Nun stellte sich heraus, daß die Lys-C-Peptide EWAM-P2 zuzuordnen sind. Durch Vergleich der Sequenz von EWAM-P1 mit den Sequenzen der Lys-C-Peptide konnten Bereiche identifiziert werden, in denen sich EWAM-P1 und P2 unterscheiden. Diese Regionen sollten geeignet sein, um spezifische Primer herzustellen. Die erste ausgewählte Sequenz von Aminosäure 66 bis 71 in P1 lautet QHGKIFYNE, während an der entsprechenden Stelle in P2 DYGSFFSG zu finden ist. Der hiervon abgeleitete sense-Primer wurde ISO 2 genannt. Zusammen mit dem antisense-Primer anti-FILD (Giebing et al., 1994) konnte in einer PCR mit Genbibliothek ein 450bp-PCR-Fragment amplifiziert werden, das nach Einklonierung sequenziert wurde. Mit Hilfe dieser Sequenzinformationen konnten weitere Primer hergestellt werden, die es ermöglichten, 3`- und 5`-RACE durchzuführen. Die Enden der Sequenz wurden schließlich durch PCR mit Genbibliothek mit jeweils einem sequenz- und einem vektorspezifischen Primer erhalten. Die Genbibliothek liegt im Lambda-Zap Vektor vor und wurde mit Eco RI und Xho I gerichtet einkloniert (Giebing, 1989). 5`-seitig liegen der T3-Primer und M13 (reverse) auf dem Vektor, 3`-seitig wurden T7, M13 (-40), SP6 und ein selbst entworfener Primer (Revbluescript123) ausgenutzt.

Tabelle 2.1 gibt einem Überblick über die verwendeten Primer, woher Informationen zu ihrer Konstruktion stammten und für welchen Zweck sie jeweils eingesetzt wurden.

Tabelle 2.1:

Primer, Orientierung, Position, Sequenz	erhalten durch	verwendet für
Iso2, sense, ca. Aminosäure 70 5`ATA CCC GGG AGT TTC TTC AGC GG3`	Alignment der Lys-C Peptide (Giebing, 1994)	Amplifikation des ersten P2-Fragments
anti-FILD, antisense, ca. Aminosäure 200 (und 300) 5`TCI A ^G / _A ATG AAI AC ^G / _A TC3`	Alignment der Lys-C Peptide (Giebing, 1994)	häufig benutzt, ist nicht spezifisch für P2, stark konservierte Sequenz, tritt zweimal in EWAM auf

<p>KIWRI, sense, ca. Aminosäure 50 ^{5'} AAG ATC TTG ^{G/A} GI ATC GTI AA ^{C/T} T ^{3'}</p>	<p>Alignment der Lys-C Peptide (Giebing, 1994)</p>	<p>häufig benutzt, ist nicht spezifisch für P2, stark konservierte Sequenz</p>
<p>GREEL, sense und antisense, ca. Aminosäure 85 (sense-Sequenz gezeigt) ^{5'} TG AAG GGT AGA GAG GAG CTC ^{3'}</p>	<p>Alignment des ersten P2-Fragments mit P1</p>	<p>- 3'RACE - Amplifikation des 5'-Endes zusammen mit T3 und anti-FENGL-Primer in einer semi-nested PCR</p>
<p>FENGL, sense und antisense, ca. Aminosäure 145 (sense-Sequenz gezeigt) ^{5'} TTA AGC TAT TTT GAA AAC GGA TTA ^{3'}</p>	<p>Alignment des ersten P2-Fragments mit P1</p>	<p>- 3'RACE - Amplifikation des 5'-Endes zusammen mit T3 und anti-GREEL-Primer in einer semi-nested PCR - Amplifikation des 3'-Endes zusammen mit T7 und MQYLQ-Primer in einer semi-nested PCR</p>
<p>MQYLQ, sense, ca. Aminosäure 225 ^{5'} G ATG CAG TAT CTG CAG AAC CC ^{3'}</p>	<p>3'RACE</p>	<p>Amplifikation des 3'-Endes zusammen mit T7 und FENGL-Primer in einer semi-nested PCR</p>
<p>anti-CPQRL, antisense, ca. Aminosäure 190 ^{5'} TGT CCT CAG CGC CTG AAG TCG G ^{3'}</p>	<p>3'RACE</p>	<p>Sonden-Produktion für Northern Blot</p>
<p>P2(leader), sense, von Nukleotid -25 an ^{5'} GTT CTG TTT AAC CTA CAG CCG ^{3'}</p>	<p>Amplifikation des 5'-Endes</p>	<p>Sonden-Produktion für Northern Blot</p>
<p>Sense P2S1, sense, vom Anfang von S1 des EWAM-P2 an ^{5'} GCC GGC GGA TCC ATG TCT GGT CTT GTG AAG GCA ^{3'}</p>	<p>nach der Sequenzierung der gesamten Sequenz</p>	<p>Amplifikation von einzelnen Segmenten</p>
<p>RevP2S2, antisense, Ende von S2 in EWAM-P2 ^{5'} GGC GGC AAG CTT GTC TGT CTG GTC TTC GGG TAA ^{3'}</p>	<p>durch Sequenzierung der gesamten Sequenz</p>	<p>Amplifikation von einzelnen Segmenten</p>
<p>RevP2S3, antisense, Ende von S3 in EWAM-P2 ^{5'} GGC GGC AAG CTT TCA GCA AAA AAG CCT CTG AAA ^{3'}</p>	<p>durch Sequenzierung der gesamten Sequenz</p>	<p>Amplifikation von einzelnen Segmenten</p>
<p>P1(340bp), sense, entsprechende Stelle in P1 wie GREEL in P2, ca. Aminosäure 85 ^{5'} GCG GAC CCG AAG AGC AAT G ^{3'}</p>	<p>P1-spezifisch</p>	<p>PCR mit genomischer DNA</p>
<p>anti-TEYK, antisense, ca. Aminosäure 165 ^{5'} GCA GAC GCG GTT TGT ATT C ^{3'}</p>	<p>hybridisiert mit P1- und P2-Sequenzen</p>	<p>PCR mit genomischer DNA, nested PCRs</p>
<p>40p, sense, Aminosäure 1, plus BamHI ^{5'} GCC GGC GGA TCC ATG GCA ACA GGT TTA ATT AAA GCG AAG GAA TAC ^{3'}</p>	<p>P1-spezifisch</p>	<p>Sonden-Produktion für Northern Blot</p>
<p>43p, antisense, Aminosäure 368, plus HindIII ^{5'} GGC GGC AAG CTT AGC TGC AAT TGC AAC GTT GAA CGC C ^{3'}</p>	<p>P1-spezifisch</p>	<p>Sonden-Produktion für Northern Blot</p>
<p>ACT U235 ^{5'} AA ^{C/T} TGG GA ^{C/T} GA ^{C/T} ATG GA ^{A/G} AA ^{3'}</p>	<p>Actin-spezifischer sense-Primer (Fretz, 1996)</p>	<p>- Kontrolle der Integrität der RNA - interner Standard bei RT-PCRs</p>
<p>ACT L667 ^{5'} GCC AT ^{C/T} TC ^{C/T} TG ^{C/T} TC ^{A/G} AA ^{A/G} TC ^{3'}</p>	<p>Actin-spezifischer antisense-Primer (Fretz, 1996)</p>	<p>- Kontrolle der Integrität der RNA - interner Standard bei RT-PCRs</p>
<p>Revbluescript123 ^{5'} GCA AGG CGA TTA AGT TGG GTA ACG ^{3'}</p>	<p>antisense-Primer auf dem Bluescript-Vector, 123 Basen vom Insert entfernt</p>	<p>1. Runde einer nested-PCR, um das 3'-Ende von P2 zu erhalten</p>

2.3.4 Reverse Transkription mit AMV-Reverser Transkriptase

Die Hybridisierung von 2µg oligo(dT)15-Primer an 1µg RNA fand in einem Gesamtvolumen von 10µl bei 60°C (in einem DEPC-behandelten Reaktionsgefäß) 5min. lang statt. Anschließend wurde die Mischung mit 20u RNase-Inhibitor (RNasin Ribonuklease Inhibitor (Promega)), 16nmol Nukleotiden (Boehringer, Mannheim), 32u AMV-Reverser Transkriptase (RTase) (Promega) und Promega-Reaktionspuffer für RTase in einem Gesamtvolumen von 20µl vereinigt. Das Programm der reversen Transkription lautete: **10min. bei 25°C, 1h bei 42°C, 5min. bei 95°C.**

2.3.5 Reverse Transkription und PCR mit *T_{th}* DNA Polymerase

Um eine Fehlhybridisierung des oligo(dT)-Primers eventuell zu verhindern, wurde eine Reverse Transkriptase verwendet, die bei sehr hohen Temperaturen arbeitet. Eine solche Eigenschaft besitzt die *Thermus thermophilus* HB-8 (*T_{th}*) DNA Polymerase (Promega) (Rüttimann et al., 1985). In Gegenwart von Manganionen besitzt die *T_{th}* DNA Polymerase eine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität, die zur Erststrangsynthese der cDNA ausgenutzt wird. Diese Aktivität besteht auch bei 70°C, der oligo(dT)-Primer jedoch bindet bei solchen Temperaturen kaum noch. Aus diesem Grund wurde die Erststrangsynthese bei 65°C vorgenommen. Werden die Manganionen durch den Chelator EGTA aus dem Probenansatz entfernt und stattdessen Magnesiumionen zugefügt, dann zeigt die *T_{th}* DNA Polymerase eine DNA-abhängige DNA Polymeraseaktivität, die zur Zweitstrangsynthese und zur Amplifikation in der nachfolgenden PCR ausgenutzt werden kann.

Eingesetzt wurden je 1µg mit TRIzol bzw. RNeasy isolierte Gesamt-RNAs aus dem Kaugagen, aus dem Hautmuskelschlauch und der Samenblase sowie mit Magnetic Beads isolierter mRNA aus dem Ringmuskel.

Der Reaktionsansatz für die reverse Transkription im DEPC-behandelten PCR-Gefäß enthielt 1x RT Puffer (Kitbestandteil), 1mM MnCl₂, 0,25mM dNTP-Mix, 0,75µM oligo dT-anchor Primer, 5u *T_{th}* DNA Polymerase in 20µl. Dieser Ansatz wurde für 20min. bei 65°C im PCR-Gerät inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Der Ansatz für die PCR (0,2pmol sense-Primer, 0,2pmol PCR-anchor-Primer (Kitbestandteil), 1x Chelat-Puffer (Kitbestandteil), 2,5mM MgCl₂ in 80µl) wurde getrennt vorbereitet und anschließend mit dem 1.-Strang-Ansatz vereinigt.

Das Programm für die 2.-Strang-Synthese lautete: 5min. bei 95°C (Denaturierung), 20min. bei 70°C (2.-Strang-Synthese). Im Anschluß erfolgte eine PCR mit folgendem Programm:

5min. 95°C, (40sec. 93°C, 1,5min. 50°C, 2min. 72°C)x 30, 7min. 72°C.

Es wurde ein Southern Blot der Proben angefertigt, mit einem DIG-markierten PCR-Produkt aus FENGL und anti-FILD hybridisiert und mit BCIP/NBT gefärbt.

2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR mit cDNA:

Mit cDNA, zur Sonden-Produktion oder mit Plasmid-DNA wurden Standard-PCRs ausgeführt. Hierzu wurden 1µl DNA-Lösung unbekannter Konzentration oder 2,5µl der cDNA mit 25pmol des sense- und antisense-Primers, 1u Taq-Polymerase (Qiagen), 0,5nmol Nucleotide (PeqLab) und 5µl 10x-Puffer (Qiagen) in einem Gesamtvolumen von 50µl vermischt. Manchmal wurde Q-Solution (Qiagen) hinzugefügt, um die Amplifikation zu verstärken. Das Programm der PCR war: 5min 94°C, (40sec 93°C, 40sec 50°C, 1min 72°C)x 30, 7min 72°C. Wenn besonders lange Amplifikate erwartet wurden, wurde die Extensionszeit auf bis zu 4min verlängert. Häufig wurde eine zweite, semi-nested- oder nested-PCR angeschlossen, um die Spezifität der Produkte zu erhöhen.

PCR mit Bakterien

Zum Auffinden rekombinanter Klone wurde Koloniematerial direkt als DNA-Quelle der PCR eingesetzt. Von der Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine kleine Menge Bakterien in ein vorbereitetes PCR-Gefäß mit 20µl PCR-Mix durch Hineintippen gegeben, bevor mit diesem Zahnstocher die Übernachtskultur angeimpft wurde. Der PCR-Mix enthält: 1mM Nukleotid-Mix, 25pmol des sense- und antisense-Primers, 0,5mM MgSO₄, 1µl DMSO, 1x PCR-Puffer, 0,5µl Vent (exo⁻) (New England Biolabs GmbH). Das Programm entsprach der Standard-PCR.

PCR mit kompletten λ-Phagen der Genbibliothek

Die cDNA-Bibliothek des Hautmuskelschlauches des Regenwurms (Giebing et al., 1994) enthält die cDNA-Inserts in dem λ-ZAP-Vektor in eindeutiger Orientierung und war daher geeignet, die 5⁻- und 3⁻-Enden der P2-Sequenz zu amplifizieren. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, wurde jeweils eine semi-nested-PCR, den spezifischen Primer betreffend, angeschlossen. Als problematisch stellte sich die hohe Salz- und besonders MgCl₂-Konzentration des SM-Puffers der Phagensuspension heraus. Aus diesem Grund wurde die als Template eingesetzte Menge Genbibliothek zunächst mit Gelfiltrations-Säulchen Se-

phadex G50 (Bio-Rad) entsalzt. Die PCR wurde durchgeführt wie die Standard-PCR, nur daß die erste Denaturierungszeit auf 10min Dauer ausgedehnt wurde (Giebing et al., 1994).

2.3.7 3`/5`-RACE („rapid amplifikation of cDNA ends“ (RACE))

Das RACE wurde mit Hilfe des 5`/3` RACE Kits (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Ziel des Vorgehens ist es, Voll-Längen-cDNA zu erhalten. Besonders das 5`-Ende fehlt häufig in aus Genbibliotheken isolierten Klonen, da die Reverse Transkriptase nicht über die gesamte Sequenz liest und vorzeitig vom RNA-Strang abfällt. Aus diesem Grund wurden Methoden entwickelt, mit deren Hilfe DNA-Sequenzen von einem mRNA-Template zwischen einer bekannten internen Stelle und dem 3` bzw. 5`-Ende der mRNA amplifiziert werden können. Zuerst wurde eine solche Methode von Frohmann et al. (1988) beschrieben. **Das 5`RACE** ermöglicht die Amplifikation von unbekanntem 5`-Enden der mRNA. Die Erststrang-cDNA wird durch AMV-Reverse Transkriptase aus Gesamt-RNA unter Verwendung eines spezifischen (antisense-) Primers („SP1“) synthetisiert. Da AMV-Reverse Transkriptase auch bei Temperaturen bis 55°C noch arbeitet, können so schwierige Sekundärstrukturen in der mRNA überwunden werden. Diese Erststrang-cDNA wird mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer, Mannheim) aufgereinigt. Mit Hilfe von Terminaler Transferase (Kitbestandteil) wird ein poly-A-Schwanz an das 3`-Ende angehängt (also an das unbekannte Ende). Diese mit einem poly-A-Schwanz versehene cDNA wird als Template in einer ersten PCR eingesetzt. Als sense-Primer dient ein „oligo dT-anchor-Primer“, der als letztes Nukleotid an seinem 3`-Ende ein A, G oder C aufweist, damit er am inneren Ende des poly-A-Schwanzes bindet, sowie an seinem 5`-Ende eine Sequenz, die in folgenden PCR-Ansätzen als Primer dienen soll. Als antisense-Primer dient ein zweiter spezifischer Primer („SP2“). Das Produkt dieser PCR wird einer zweiten, nested-PCR unterworfen, mit dem sense-Primer „PCR anchor Primer“, der auf die durch den „oligo dT-anchor Primer“ eingeführte Sequenz paßt, und einem dritten spezifischen antisense-Primer („SP3“).

Für das **3`RACE** wird die mRNA mit dem oligo-dT anchor Primer revers transkribiert. Aufreinigungsschritte entfallen, da die RNase H-Aktivität der AMV-Reversen Transkriptase zum Abbau der RNA ausgenutzt wird. Das 3`-Ende wird anschließend mit einem spezifischen sense-Primer („SP5“) und dem PCR anchor Primer, der diesmal als Antisense-Primer dient, amplifiziert. Unter Umständen ist eine nested PCR mit einem zweiten spezifischen sense-Primer („SP6“) vorzunehmen. Die PCR-Produkte wurden mit einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, kapillar auf Nylonmembran transferiert und mit einer DIG-mar-

kierten Sonde hybridisiert. Das PCR-Fragment, das als Sonde markiert worden war, wurde mit Hilfe der Primer FENGL und anti-FILD amplifiziert.

5`RACE: Die verwendeten Antisense-Primer:

Als SP1, also zur reversen Transkription, diente FILD, als SP2 anti-P2 (170Bp) und als SP3 anti-GREEL, als Template diente RNA aus Hautmuskelschlauch und Kaumagen.

3`RACE: Die verwendeten Sense-Primer:

Als SP5 diente GREEL, als SP6 P2 (170Bp), als Template cDNA aus Hautmuskelschlauch.

2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in Horizontalelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel in 1x TBE-Puffer mit 90V (= ca. 10V/cm) für ca. 1 Stunde. Die Gele enthielten 1µg/ml Ethidiumbromid, das die DNA färbt. Die Dokumentation erfolgte unter Fluoreszenzanregung des Farbstoffes auf einem UV-Transilluminator (306nm) mit einem Polaroid-Schwarzweißfilm. Um die unterschiedlichen 5`-Enden von ca. 450bp Länge voneinander zu trennen, wurde ein 1,5%iges Agarosegel verwendet.

TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE):

0,09M TRIS-Borat
0,002M Ethylendiamintetraessigsäure
(EDTA)
pH 8,3.

6x-DNA-Probenpuffer:

0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol
50% (v/v) Glycerin
50mM EDTA

2.3.9 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Gelen und aus PCR-Ansätzen

Elution von entsprechenden Banden mit dem Jetsorb-Kit (Genomed), wobei die Nukleinsäuren an Silikagelsuspensionen gebunden werden, oder mit dem Qiaquick-Kit (Qiagen), die eine Bindung an Silikamembranen einschließt, erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Nukleinsäuren binden in Gegenwart von chaotropen Salzen an die Silikaoberflächen. Nach einem Waschschrift mit alkoholhaltigem Puffer wird die DNA unter Nidrigsalzbedingungen eluiert. Die Elution der DNA von der Glasmilch oder den Säulchen erfolgte mit der doppelten Menge Wasser. Für die Sequenzierung wurden die PCR-Proben direkt mit dem Qiaquick-PCR-Aufreinigungs kit (Qiagen) von Nukleotiden und Primern

gereinigt und nicht über das Gel (die Glasmilch verursacht häufig eine relativ starke Streuung in den Proben durch übertragene SiO₂-Partikel).

2.3.10 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde entweder durch UV-Spektrometrie oder durch Abschätzung der Intensität der Fluoreszenz im Vergleich zum Lambda-Phagen-Standard, der mit EcoRI und HindIII gedaut war (PeqLab), ermittelt. Bei diesem Marker treten die Banden in bekannten, konstanten Verhältnissen zueinander auf. Bei der UV-Spektrometrie wurde die Absorption einer Verdünnung der Nukleinsäurelösung in einer Quarzküvette bei 260nm Wellenlänge gegen den verwendeten Puffer als Leerwert gemessen. Die Konzentration ergibt sich als: Meßwert x Verdünnungsfaktor x 40 (für RNA) oder 50 (für DNA) = Konzentration in µg/ml. Die Reinheit der Präparation von Protein konnte durch Berechnung des Quotienten aus der Absorption bei 260nm und 280nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren) nach der Subtraktion des Streuwertes (Absorption bei 320nm) abgeschätzt werden. Für DNA-Präparationen wurde ein Wert von 1,8-2,0 und für RNA-Präparationen von 1,9-2,2 akzeptiert.

2.3.11 Herstellung kompetenter Bakterien

100ml vorgewärmtes LB-Medium wurden mit DH5αF⁻-Bakterien (in Glycerin bei -80°C gelagert) angeimpft. Die Flüssigkultur wurde bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,3-0,4 bei 37°C mit 280rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde für 15min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4°C und 4000rpm sedimentiert. Das Pellet wurde in 20ml frisch hergestellter 0,1M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Der Vorgang der Zentrifugation und Resuspension wurde einmal wiederholt. Nach einer Lagerung für 24-48h bei 4°C waren die Bakterien kompetent und verwendbar zur Transformation. Für den späteren Gebrauch wurden die Bakterien bei -80°C eingefroren gelagert.

2.3.12 Einklonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden in verschiedene Vektoren nach Herstellerangaben ligiert:

In pGEM-T-Easy-Vektor (Invitrogen), wobei die Tatsache ausgenutzt wird, daß bei der Amplifikation mit Taq-Polymerase Adenosin-Überhänge entstehen. Der Vektor ist durch Thymosin-Überhänge „klebrig“ für die PCR-Fragmente. Die Ligationsprodukte wurden in Ca²⁺-kompetente DH5αF⁻-Bakterien transformiert.

In den pZErO-2-Vektor mit dem Zero Background TM/Kan PLUS Cloning Kit (Invitrogen) mit anschließender Transformation in Top-10-Zellen (Invitrogen) erfolgte nach Herstellerangaben. Es wachsen nur Klone, die sowohl transformiert wurden als auch das gewünschte Insert enthalten, da der selbst-ligierte Vektor ein letales Gen enthält, das durch das Insert auseinandergerissen wird. Die Insertion erfordert eine blunt-end-Ligation. Die Enden der mit Taq-Polymerase amplifizierten DNA-Fragmente mußten daher zunächst mit Vent-Polymerase blunt-end aufgefüllt werden. Der Vektor wurde mit EcoRV blunt-end geschnitten.

2.3.13 Ausstreichen von Bakterien auf Kulturplatten

Medium für auszuplattierende Zellen war LB-Medium mit 1,5% Agar-Agar. Zur Selektion wurde, je nach transformiertem Vektor, Ampicillin (Endkonzentration 150µg/ml), Kanamycin oder Tetracyclin (je 15µg/ml) zugesetzt. Für den Blau-Weiß-Test (Horwitz et al., 1964) wurden IPTG (Endkonzentration 0,5mM) und X-Gal (Endkonzentration 30µg/ml) nach der Sterilisation dem noch flüssigen Medium zugegeben oder später auf der Oberfläche der erstarrten Kulturplatten verstrichen.

2.3.14 Übernacht-Flüssigkultur

Bakterienklone wurden mit autoklavierten Zahnstochern gepickt und in 3ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler (280rpm) inkubiert.

Endkonzentration Ampicillin: 150µg/ml, Endkonzentration Tetracyclin: 15µg/ml.

LB-Medium:

1% Bacto-Trypton

0,5% Hefe-Extrakt

0,5% NaCl pH 7,5

2.3.15 Lagerung von Bakterien als Glycerinkultur

500µl einer Bakteriensuspension wurden in Eppendorfgefäßen mit 20% sterilem Glycerin versetzt. Die Lösungen wurden gut miteinander gemischt. Die Eppendorfgefäße wurden in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -80°C eingefroren gelagert. Die schockgefrorenen Klone können bei -80°C jahrelang gelagert werden.

2.3.16 Isolierung von Plasmiden

Zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterien im Mikromaßstab (Minipräparation) wurden 1,5-2ml einer 3ml-Übernachtskultur durch Zentrifugation sedimentiert (2min 1000rpm im Eppendorfgefäß). Die Isolierung wurde mit verschiedenen Kits (z. B. Qiaprep-Spin-Miniprep-Kit, Qiagen) vorgenommen, denen das Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) mit anschließender Ethanol-Präzipitation zugrunde lag.

2.3.17 Restriktion von DNA

Der Daus der DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen erfolgte in der Regel in Ansätzen von 10 μ l. Enzymmengen und Puffer wurden entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1h bei dem Temperaturoptimum der verwendeten Restriktionsendonuklease (in der Regel 37°C). Sollte mit zwei Enzymen gedaut werden, die in verschiedenen Puffern arbeiten, wurde die DNA nach erfolgter erster Inkubation mit dem Qiaquick-Kit (Qiagen) vom ersten Enzym gereinigt. Nach Beendigung des Daus wurde die DNA auf einem Agarosegel analysiert.

2.3.18 Sequenzierung von DNA

Die nicht-radioaktive Sequenzierung wurde an einem DNA-Sequenzierer vorgenommen (Licor 4000, MWG, Ebersberg). Die Sequenzierungen wurden in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung mit markierten M13 reverse- und M13 (-40)-Primern vorgenommen. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit 5 μ l Plasmidpräparation, verdünnt auf 0,1 μ g/ μ l, sowie 1 μ l Sequenzierprimer (0,3pmol/ μ l) und jeweils 2 μ l des entsprechenden Nukleotidmixes (enthält Nukleotide, Abbruchnukleotide und Enzym) vorgenommen. An das 5'-Ende des Sequenzierprimers ist ein Infrarotfarbstoff gekoppelt. Das Programm dieser als Cycle-Sequenzierung bezeichneten Reaktion lautete: 5min. Denaturierung bei 93°C, danach 20 Zyklen mit jeweils 1min. bei 60°C und 30sec. bei 93°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l Ladungspuffer (=Stop-Lösung, enthält den Blaumarker, Glycerin und Formamid zur Denaturierung der Sequenzprodukte) gestoppt. 1,5 μ l des Reaktionsansatzes wurden auf das Gel aufgetragen. Die mit einem Infrarotfarbstoff markierten DNA-Fragmente wurden in einem 6%igen Polyacrylamidgel (Sequagel XR, Hessisch-Oldendorf) mit 7M Harnstoff in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und in Echtzeit über eine Laser-Photomultiplier-Einheit detektiert. Die Dimensionen des Geles waren 40cm Länge und 0,25mm Dicke. Die Auftren-

nung der Fragmente erfolgte bei 50°C und 31,5W. Die Detektion und Auswertung geschah mit Hilfe des Programmes Base-ImageIR Version 4.0 von Licor (MWG, Ebersberg).

Einige PCR-Fragmente wurden direkt, ohne sie einzuklonieren, zum Sequenzieren an Seq-Lab (Göttingen) geschickt, wo die Sequenzierung auf einem ABI Prism Sequencer von Perkin Elmer vorgenommen wurden. In diesem Fall waren nicht die Primer, sondern die Abbruchnukleotide markiert.

2.3.19 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Samenblasen isoliert. Es wurden verschiedene Kits, z. B. das DNeasy-Kit (Qiagen) oder E.Z.N.A. invertebrate DNA Kit (peQLab, Erlangen), verwendet, deren Funktionsweise auf der Adsorption der DNA an Silikamembranen beruht. Das Prinzip dieser Isolierung entspricht dem unter 2.4.9 Beschriebenen.

2.3.20 Nicht-radioaktive Markierung von DNA

Die PCR-Fragmente wurden durch „random priming“ nach einer modifizierten Methode von Feinberg und Vogelstein (1984) mit dem DIG DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) mit Digoxigenin markiert. 100ng bis 1µg PCR-Fragment wurden für eine Markierungsreaktion über Nacht eingesetzt, wobei den Herstellerangaben gefolgt wurde. Nach Denaturierung des Doppelstranges durch Erhitzen und sofortiges Abkühlen auf Eis der im Kit mitgelieferten Reaktionspartner werden Hexanukleotide statistischer Zusammensetzung als Primer hybridisiert. Anschließend erfolgt die Markierung mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I bei der Synthese des neuen Doppelstranges unter Verwendung eines Desoxynukleotidgemisches, das ein mit Digoxigenin markiertes Nukleotid enthält. Die Konzentration an markierter DNA wurde bestimmt, indem eine serielle Verdünnung der Probe sowie einer markierten DNA bekannter Konzentration (Kitbestandteil) als Standard auf eine Nylonmembran getropft, nach Herstellerangaben fixiert und zur Detektion inkubiert wurde.

2.3.21 Southern-Blots

Für Southern-Blots wurden die DNA-Fragmente in Agarosegelen elektrophoretisch getrennt. Nach einer Fotodokumentation wurde die DNA denaturiert, indem das Gel 30min in Denaturierungslösung geschwenkt wurde. Nach zweimaliger Inkubation für 15min in Neutralisierungslösung wurde die DNA auf eine Nylonmembran (Qiabrane (Qiagen) oder Hybond-N+ (Amersham)) mit 20x SSC bei 4°C über Nacht kapillar transferiert.

Denaturierungslösung:

1,5M NaCl
0,5M NaOH

Neutralisierungslösung:

1,5M NaCl 0,5M
Tris-HCl pH 7,2
1mM EDTA pH 8

20x SSC:

3M NaCl
0,3M tri-Natriumcitrat pH 7

Die transferierte DNA wurde nach dem Trocknen des Blots durch Backen (80°C für 2h) auf der Membran fixiert. Die Detektion erfolgte nach Herstellerangaben des DIG Nucleic Acid Detection Kits (Boehringer, Mannheim) nach Inkubation mit anti-DIG-alkalische Phosphatase-Konjugat und Visualisierung mit NBT/BCIP.

2.3.22 Northern Blots

Je 2 Kaumägen und je ca. 100mg Hautmuskelschlauch und Spermienstadien-Pellets wurden in je 1ml TRIzol (Gibco BRL) mit einem Glas-Teflon-Homogenisator zerkleinert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Nach der Isolierung der RNA mit TRIzol und ihrer Trocknung unter Vakuum wurden die Proben in je 50µl DEPC-Wasser aufgenommen und für 10min. bei 56°C im Wasserbad inkubiert, um die RNA-Pellets zu lösen. Je 1µl wurde 1:25 verdünnt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Um die Integrität der RNA zu beurteilen, wurden pro Spur 10µg RNA auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen, für den Blot 20µg pro Spur.

Die RNA wurde mit Glyoxal und DMSO denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt wie von Sambrook et al. (1989) beschrieben. Die zu blottenden 20µg RNA in einem Volumen von 5,4µl wurden mit einem Volumen von 5,4µl deionisiertem Glyoxal, 16,1µl DMSO und 3µl 0,1M Natriumphosphatpuffer versetzt und 1h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden auf Eis 4µl Glyoxal-Ladungspuffer zugegeben.

Die Auftrennung erfolgte in einem 1,2%igem Agarosegel in 10mM Natriumphosphatpuffer pH 7 bei 3-4V/cm. Die RNA wurde mit Hilfe eines abwärtsgerichteten Kapillartransfers mit alkalischem Transferpuffer (Chomczynski, 1992) auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) geblottet. Die Membran wurde 15min in 0,2M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 neutralisiert und anschließend 15min bei 80°C gebacken. Als Größenstandard wurden 10µg EcoRI/HindIII gedaute λ-DNA (Fermentas, St. Leon Rot) glyoxyliert und auf einem Gel mit der RNA aufgetrennt. Diese Spuren wurden nach der Elektrophorese vom restlichen Gel abgetrennt. Durch 20min Waschen 50mM NaOH wurde das

Glyoxal entfernt, mit 3x15min in 10mM Natriumphosphatpuffer wurde das Gel neutralisiert und schließlich mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid in Natriumphosphatpuffer gefärbt.

2.3.23 Hybridisierung der Northern blots

Spezifische DNA-Sequenzen auf den Nylonmembranen wurden durch Hybridisierung mit 20ng radioaktiv markierter Sonde detektiert. Hierzu wurden korrespondierende DNA-Fragmente durch „random priming“ mit [α -³²P]dCTP (ICN, Meckenheim) mit Hilfe des „Megaprime DNA-Labeling-Kits“ (Amersham) nach Herstellerangaben markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Elutip-Säulen (Schleicher und Schuell) abgetrennt. Für P1 wurde dafür das den gesamten Leserahmen von EWAM P1 enthaltende Plasmid (EWAM 1-3, Giebing et al., 1997) mit den Primern 40p und 43p einer PCR unterworfen. Das resultierende PCR-Fragment ist ca. 1050bp lang und stellt das gesamte Insert dar. Für die P2-Sonde wurde cDNA (aus dem 3`-RACE mit Kaumagen-RNA) mit den Primern P2(Leader) und anti-CPQRL amplifiziert. Dieses PCR-Fragment ist ca. 600bp lang.

Die Nylonmembranen wurden in Hybridisierungspuffer für 3h bei 65°C prähybridisiert. Die radioaktiven Sonden wurden 5min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch zweimaliges Waschen mit 2xSSC/0,1% SDS für je 15min und zweimaliges Waschen mit 0,1xSSC/0,1% SDS für je 45min bei 65°C entfernt. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C mit Kodak Biomax XR Film und Verstärkerfolie (Amersham).

2.4 Morphologische Methoden

2.4.1 Beschichtung von Objektträgern mit Chrom-Alaun-Gelatine:

Zur Entfettung wurden in Färbeküvetten einsortierte Objektträger zunächst 0,5-1h in 0,1M HCl geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen in dest. Wasser wurden sie in 95%igem Ethanol 1h bis ü.N. gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mehrfach in den Schiffchen in die Chrom-Alaun-Gelatine-Lösung getaucht. Zum staubfreien Antrocknen wurden die Schiffchen jeweils in den Luftstrom unter der Sterilbank gestellt.

Herstellung der Chrom-Alaun-Gelatine:

2,64g Gelatine in 500ml dest. Wasser bei nicht mehr als 50°C lösen. 250mg Chrom-Kalium-Sulfat hinzufügen. Die Lösung noch warm durch Whatman-Papier filtrieren.

2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz mit Präparaten von Spermienstadien und reifen Spermien aus der Samenblase

Die hinteren beiden Samenblasen (sie sind die größten) wurden herauspräpariert und in Regenwurmringer + Ca^{2+} zerzupft.

Regenwurmringer:

80mM NaCl

4mM KCl

1mM MgCl_2 4mM NaHCO_3

50mM Saccharose

5mM TRIS

2mM Ethylenglycol-bis[β -aminoethylether]-

N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA), pH 6,4.

Variante: ohne EGTA, mit 0,1mM Ca^{2+} , pH 7,0.

Durch 5minütige Zentrifugation bei 1.000rpm wurden reife Spermien (sie befinden sich im Überstand) von den unreifen Spermienstadien abgetrennt. Das Pellet wurde mit Ringer verdünnt. Beide Fraktionen wurden auf Chrom-Alaun-beschichteten Objektträgern mit einem zweiten Objektträger dünn verteilt und ca. 10min. antrocknen gelassen. Die Präparate wurden 10min. in -20°C kaltem Methanol fixiert und anschließend 3sec. in -20°C kaltes Aceton getaucht. Die getrockneten Präparate sind bei -20°C längere Zeit haltbar (Camatini et al., 1986). Zur immunologischen Untersuchung wurden die Objektträger mit 1% Rinderserumalbumin (BSA)/0,5xPBS eine Stunde lang bei Raumtemperatur rehydriert und abgedeckt.

Phosphate buffered saline**(PBS) (1x):**8mM Na_2HPO_4 1,5mM KH_2PO_4

137mM NaCl

2,7mM KCl pH 7,4.

Durch Waschen mit 0,5xPBS/1% Triton bei Raumtemperatur wurden die Zellen zugänglicher für die Antikörper gemacht. Die Inkubation mit dem anti-Fagmin-Antikörper erfolgte

in einer Verdünnung 1:100 in 1%BSA/0,5xPBS bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer. Als Kontrolle wurde der Erstantikörper fortgelassen, ansonsten wurden diese Objektträger wie die anderen behandelt. Ungebundener Antikörper wurde durch 2x10min. Waschen mit 0,5xPBS/1% Triton und 1x10min. Waschen mit 0,5xPBS entfernt. Der Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus-Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC)-Konjugat, Dianova) wurde 1:50 in 0,5xPBS/1% BSA verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C in einer abgedunkelten feuchten Kammer für 1 Stunde. Überschüssiger Antikörper wurde mit 0,5xPBS fortgewaschen, und die Präparate konnten nach Eindeckelung mit einem Tropfen 0,5xPBS oder Mowiol mit n-Propylgallat als anti-fading-Mittel (Giloh und Sedat, 1982) mikroskopisch untersucht werden. Es wurde entweder ein Olympus –Fluoreszenzmikroskop (BH 2-RFL) mit Grünanregung und einem Sperrfilter von 570nm verwendet. Für die Dokumentation diente dann ein Tmax 400 pro (Kodak) Schwarz-Weiß-Negativfilm, der auf 1600 oder 4000 ASA belichtet wurde. Oder die Lichtmikroskopie erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Photomikroskops (Axioskop 2), das mit ebenfalls mit Epifluoreszenz ausgerüstet war. Die Dokumentation erfolgte hierbei mit einem Tmax 400 pro Film, der mit 400 ASA belichtet wurde.

Mit anti-Fragmin-Antikörper gefärbte Spermienstadien wurden auch mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica DMR) mit einer Fluoreszenzanregung bei 520nm untersucht, das mit einem Argon-Laser-System ausgestattet war (Mellet Griot, USA).

Mowiol 4.88 (Hoechst) mit n-Propylgallat:

20g Mowiol (Polyvinylalkohol) in 80ml PBS und 40ml Glycerin lösen. Als Schutz vor schnellem Ausbleichen wird 0,5% n-Propylgallat im Verhältnis 5:1 (Mowiol:n-Propylgallat) zugefügt.

2.4.3 Färbung von Spermienstadien mit Phalloidin

Es wurde ein fluoreszierendes Phalloidin, das an Rhodamin gekoppelt war, verwendet (Molecular Probes). Die Spermienstadien wurden wie oben beschrieben auf Objektträgern ausgestrichen und Aceton/Methanol-fixiert, ebenso reife (Fremd-) Spermien aus den Receptacula seminis. Nach einer 20minütigen Permeabilisierung und gleichzeitiger Fixierung der Zellen mit Triton/Formaldehyd-Fixierlösung bei zunächst 37°C (im Laufe der Inkubation wurden die Präparate auf Raumtemperatur gebracht) wurden die Präparate 2x 5min. mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen.

Triton/Formaldehyd-Fixierlösung:

4% Formaldehyd

0,5xPBS

0,1% Triton pH 7,4.

Zum Ansetzen 4g festes Paraformaldehyd in ca. 50ml dest. Wasser bei 50-60°C unter Rühren lösen, nachdem einige Tropfen 1M NaOH zugegeben wurde. 5ml 10xPBS zufügen, pH-Wert auf 7,4 einstellen, auf 100ml auffüllen. Die Lösung wird möglichst frisch angesetzt.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit Phalloidin in PBS (1 Unit in 200µl) für 30min. bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten feuchten Kammer.

Rhodamin-Phalloidin-Lösung:

Rhodamin-Phalloidin (Molecular Probes) wird lyophilisiert in Portionen zu 300 Einheiten geliefert, wobei eine Einheit der Menge Phalloidin entspricht, die zur Färbung eines Objektträgers mit 200µl Inkubationslösung nötig ist. Diese Substanzmenge wird mit 1,5ml Methanol gelöst, so daß eine Konzentration von 200 Units/ml erhalten wird, was ungefähr 6,6µM entspricht. Ein Objektträger ist also mit einem Äquivalent von 5µl dieser Stammlösung zu färben. Zur Lagerung werden Portionen dieser Stammlösung eingedampft und bei -20°C eingefroren. Für die Anwendung ist die entsprechende Menge PBS hinzuzufügen.

Überschüssiges Phalloidin wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Präparate wurden mit Mowiol mit n-Propylgallat (s. o.) eingedeckelt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops mit Grünanregung (s. o.) untersucht.

2.4.4 Färbung von Spermienstadien mit DAPI

DAPI (4', 6-Diamino-2-Phenylindol) (Molecular Probes) färbt bevorzugt doppelsträngige DNA. Es scheint mit AT-Clustern in der kleinen Furche zu assoziieren (Kubista et al., 1987) und wird daher zur Kernfärbung verwendet. Nach Scali und Tinti (1992) wurde eine Stammlösung mit 0,1mg DAPI in 1ml dest. Wasser angesetzt. Die wie oben beschriebenen vorbereiteten Objektträger wurden mit 1µl der Stammlösung in 1ml 0,5x PBS für 5-10min

im Dunkeln inkubiert. Nach 10 minütigem Waschen in 0,5x PBS konnten die Proben mikroskopisch untersucht werden. Unter UV-Anregung fluoresziert DAPI blau. Nach diesem Protokoll angewendet färbt DAPI Kerne spezifisch, und es ist wenig bis keine Färbung des Cytoplasmas zu beobachten.

2.4.5 Gefriermikrotomie

2.4.5.1 Vorbereitung des Gewebes, Einbettung und Schneiden

Vor der Präparation wurden die Regenwürmer mit gekühltem Mineralwasser für ca. 5min relaxiert (Heumann und Zebe, 1967). Die Würmer wurden in Regenwurm-Ringer auf Eis präpariert. Etwa 5mm dicke Präparate des Kaumagens mit Hautmuskelschlauch, Normalsegmente und des Bauchmarks wurden mit Stecknadeln auf Kork-Plättchen fixiert, mit Einbettungsmittel (Tissue Tech, Jung) umgeben und in Stickstoff-gekühltem Propan eingefroren. Die Präparate wurden bis zum Schneiden bei -80°C in Alufolie gewickelt in Plastikbeuteln aufbewahrt. Ca. 10-14 μm dicke Gefrierschnitte wurden bei -28°C geschnitten und auf mit Chrom-Alaun-Gelatine beschichteten Objektträgern aufgefangen.

2.4.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die immunologischen Färbungen mit Antikörpern gegen P2 wurden ähnlich wie bei D`Haese und Carlhoff (1987) beschrieben durchgeführt. Es erwies sich als vorteilhaft, die Präparate vor der Inkubation mit Aceton/Methanol zu fixieren, wie bei der Behandlung der Spermienstadien beschrieben, da sich die Schnitte dann nicht mehr so leicht vom Objektträger ablösen. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, die Lösungen enthielten 0,2% Natriumazid. Nach der Rehydrierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Abdeckpuffer für 10min wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt mit anschließender Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop und Fotodokumentation wie für die Färbung der Spermienstadien beschrieben. Pro Schnitt wurde ein Volumen von 50 μl von der Antikörperlösungen aufgebracht. Als Kontrolle wurde der Erstantikörper fortgelassen, ansonsten wurden diese Objektträger wie die anderen behandelt.

2.4.6 Semi- und Ultradünnschnitt-Technik

2.4.6.1 Einbettung in Araldit

Gewebestückchen mit etwa 2mm Kantenlänge wurden mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer bei pH 7,4 und 4°C über Nacht fixiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,1M Cacodylatpuffer erfolgte die Nachfixierung mit Osmiumtetroxid (Karnovsky, 1971) für eine Stunde bei 4°C. Anschließend wurden die Präparate mehrfach mit 0,1M Cacodylatpuffer gewaschen. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Acetonreihe folgte die Einbettung in Araldit. Die Polymerisation erfolgte für mehrere Tage bei 60°C. Zunächst wurden mit einem Ultramikrotom OM U3 (Reichert) Semidünnschnitte von 0,5µm Dicke hergestellt, die mit einer 0,1%igen Toluidinblaulösung gefärbt wurden.

2.4.6.2 Ultramikrotomie, Kontrastierung und Elektronenmikroskopie

Von geeigneten Stellen wurden mit Glasmessern Ultradünnschnitte hergestellt und auf Kupfernetzchen aufgefangen. Diese Schnitte wurden 20min mit einer 5%igen wässrigen Uranylacetatlösung und anschließend für 20min mit Bleicitrat (Reynolds, 1963) kontrastiert. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 9-S2 untersucht.

2.4.6.3 Einbettung in LR-Gold

Alle Arbeitsschritte fanden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C statt. Die Würmer wurden in gekühltem Regenwurm-Ringer + EGTA + 5mM MgCl₂ präpariert. Da die Antigendichte für EWAM auf Ultradünnschnitten für gering gehalten wurde, wurde das Gewebe mit zusätzlichem EWAM-P2 „gespickt“. Hierfür wurde es zunächst in Ringer mit 20% Glycerin und 0,2mM PMSF für 30min und anschließend für 30min in der gleichen Lösung mit 50% Glycerin permeabilisiert. Nachdem die Präparate für 30min in Ringer gewaschen worden waren, wurden sie mit 2% Paraformaldehyd in Sörensen-Puffer (pH 7,2) für 30min bei vorfixiert, anschließend gewaschen und mit Ringer-Lösung, die EWAM-P2 enthielt, inkubiert (3 Gewebestückchen von insgesamt ca. 100mg je mit 200µl Lösung, die 0,1mg EWAM enthielt). Nun wurde der Ansatz für 15min auf 1,5mM Ca²⁺ gebracht, so dass der in das Gewebe hineindiffundierte EWAM an die dünnen Filamente binden konnte. Nachdem die Proben für 30min in Ringer gewaschen worden waren, wurden sie über Nacht in Sörensen-Puffer (pH 7,2) mit 2% Paraformaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd (Polysciences, Warrington) und 1mM CaCl₂ fixiert. Nach dem Waschen mit Sörensen-Puffer und einer

Inkubation mit 50mM NH_4Cl wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in LR-Gold eingebettet. Die Polymerisation erfolgte bei -20°C unter UV-Licht für 48h. Die Ultradünnschnitte wurden auf Nickelnetzchen aufgefangen und vor der Antikörper-Inkubation nicht kontrastiert.

Sörensen-Puffer, pH 7,2:Lösung A: 120mM KH_2PO_4 Lösung B: 120mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

28,4ml Lösung A + 72,4ml Lösung B ergibt pH 7,2.

2.4.6.4 Immunogold-Applikation

Die Inkubationen fanden, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert, mit Ausnahme der Antikörperlösungen. Die reaktiven Gruppen der Ultradünnschnitte wurden zunächst mit 50mM Glycin in PBS für 15min, mit 5% BSA/1% Mäuseserum in PBS für 40min und 3x5min mit 0,1% BSA-c in PBS (Abdeckpuffer) abgedeckt. Pro Netzchen wurden 20 μl des Erstantikörpers (monoklonaler Maus-anti-P2-Antikörper), 1:5 verdünnt in Abdeckpuffer, über Nacht bei 4°C appliziert. Nachdem die Präparate in Abdeckpuffer gewaschen worden waren, wurden sie mit je 30 μl der Zweitantikörperlösung (Gold-anti-Maus-Konjugat, 1:20 in Abdecklösung verdünnt) für 1h inkubiert. Nachdem sie mit Abdecklösung und PBS gewaschen worden waren, wurden die Schnitte mit 2% Glutaraldehyd in PBS für 5min nachfixiert. Abschließend wurden die Schnittpräparate 4min mit 4%igem Uranylacetat in 5% Ethanol und 4min mit Bleicitrat (Reynolds, 1963) kontrastiert.

2.5 Verwendete Computerprogramme

Primer wurden mit Hilfe des interaktiven Primer-Bewertungs- und Suchprogramms DOPE (<http://dope.interactiva.de>) bewertet.

Zur Analyse der Sequenzen wurden folgende Programme verwendet: Alignments der verschiedenen Sequenzen wurden mit CLUSTAL W (1.7) (Thompson et al., 1994) durchgeführt.

Mit der Hilfe der Programme von Ciechanover et al. (1989) und Guruprasad et al. (1990) unter <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam> bzw. http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool wurde aus der gegebenen Aminosäuresequenz die Lebensdauer und Stabilität der abgelei-

teten Proteine innerhalb eukaryontischer Zellen abgeschätzt. Diese Programme berechnen auch den IEP und die Anzahl der verschiedenen Aminosäuren.

Das Programm PSORT-Prediction of Protein Localization Sites Version 6.4 (WWW) unter der Adresse <http://www.psort.nibb.ac.jp> macht Voraussagen über die Lokalisation von Proteinen innerhalb von eukaryontischen Zellen (Nakai and Kanehisa, 1992).

Das Programm <http://smart.embl-heidelberg.de/smart> sucht nach Proteinen ähnlicher Domänen-Organisation (Schultz et al., 1998 und Schultz et al., 2000).

3. Ergebnisse

3.1 Varianten des Gelsolin-verwandten Proteins im Hautmuskelschlauch des Regenwurms

Im Hautmuskelschlauch des Regenwurms lassen sich mit Hilfe der Anionen-Austauscherchromatographie drei Varianten und mit Hilfe der gelelektrophoretischen Auftrennung zwei Varianten des Gelsolin-verwandten Proteins EWAM identifizieren oder isolieren (D'Haese und Hinssen, 1987). Möglichkeiten, die unterschiedlichen Varianten des EWAM zu analysieren, sind die Untersuchung der immunologischen Eigenschaften der chromatographisch gewonnenen Fraktionen und damit ihrer immunologischen Verwandtschaft, ein Vergleich ihrer Spaltprodukte nach einer limitierten Proteolyse, ihre Lokalisation in den Organen des Tieres und schließlich Untersuchungen auf Nukleotidebene, indem die Varianten sequenziert werden und die Expression der mRNA betrachtet wird. Die Analysen auf Proteinebene setzen zunächst eine Optimierung der Trennung voraus, die zu einer vollständigen chromatographischen Trennung der Aktivitätspeaks im Hautmuskelschlauch führt.

In den folgenden Kapiteln werden dann die Verhältnisse des Hautmuskelschlauchs mit einem anderen muskulösen Organ, dem Kaumagen, verglichen, sowie mit nicht-Muskelzellen, den Stadien der Spermatogenese. Auf das Vorkommen einer extrazellulären Form des Gelsolin-verwandten Proteins wird im Rahmen der Diskussion eingegangen.

3.1.1 Aufreinigung der EWAM-Fraktionen aus dem Hautmuskelschlauch durch Anionen-Austauscherchromatographie

Der Rohextrakt von 100 Würmern wurde, wie in 2.3.1 beschrieben, an DEAE-Sepharose in einer Säule mit 40ml Volumen chromatographisch aufgetrennt. Die Verwendung einer Stufe bei 30mM KCl und eines langsam ansteigenden Gradienten bis auf 250mM KCl führte zu einer vollständigen Trennung von drei Aktivitätspeaks. Der Rohextrakt sowie die eluierten Fraktionen wurden viskosimetrisch auf ihre Fähigkeit hin getestet, die Viskosität von F-Actin zu erniedrigen. Exemplarisch sind in **Abb. 3.1** das Elutionsprofil einer Chromatographie sowie die überlagert dargestellten Ergebnisse der viskosimetrischen Untersuchungen dargestellt. Der erste Aktivitätspeak, P1 genannt, eluierte bei diesem flachen Gradienten mit 30mM KCl, der zweite, der mit P2 bezeichnet wird, mit etwa 80mM KCl und der dritte, der P3 genannt wird, mit etwa 110mM. Es konnten keine weiteren Modulator-haltigen Fraktionen gefunden werden, die mit noch höherer Salzkonzentration von der DEAE-Sepharose eluieren (**Abb. 3.1**). Die gemessenen maximalen Aktivitäten

betragen ca. 65, 75 und 80% mit 60, 95 und 85 μ g Protein. Eine weitere Aufreinigung wurde durch Gelfiltration an Superdex 200 erreicht.

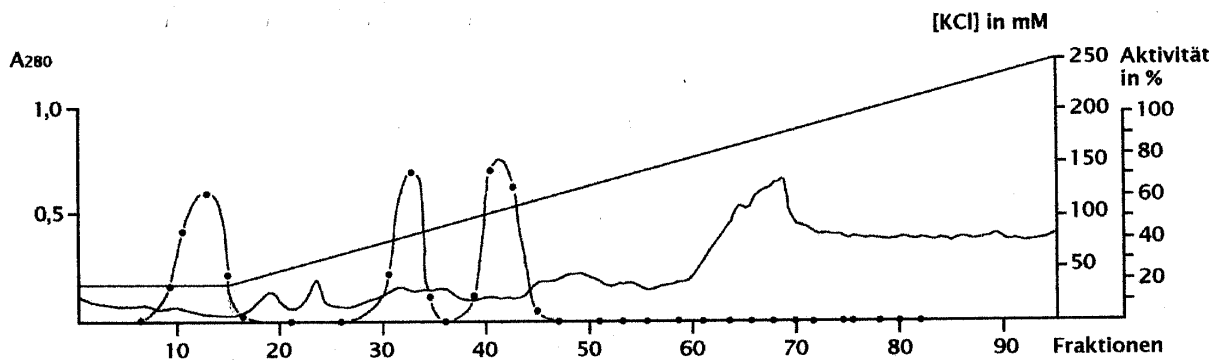


Abb. 3.1: Elutionsprofil einer Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B (40ml) des Extrakts aus den Hautmuskelschläuchen von 100 Regenwürmern zur Isolierung der Isoformen des Gelsolin-artigen Proteins. Drei unterschiedliche Modulatorfraktionen konnten eluiert werden mit ca. 450ml eines KCl-Gradienten von 30 bis 250mM bei einer Durchflußrate von 0,5ml/min. Je 200 μ l der Fraktionen wurden auf ihre Aktivität, d. h. auf ihre Fähigkeit, die Viskosität von F-Actin zu erniedrigen, getestet. Die aktiven Fraktionen (Fraktionsgröße 5ml) wurden vereinigt.

Bei der Auftrennung der aktiven Fraktionen mit SDS-PAGE sind nur zwei der Isoformen aufgrund ihres unterschiedlichen apparenten Gewichts unterscheidbar (**Abb. 3.2, Spuren (2), (3), (4), (13)**). P1 besitzt danach ein apparentes Gewicht von ca. 43kDa, P2 und P3 von ca. 45kDa. Diese der Größe nach unterscheidbaren Isoformen lassen sich mit den anti-P1, anti-P2 und anti-Fragmin-Antikörpern unterschiedlich gut anfärben. Während der anti-Fragmin-Antikörper alle drei Aktivitätspeaks etwa gleich gut erkennt (**Abb. 3.2, Spuren (5) bis (8)**), werden mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen anti-P1-Antikörper nur der erste Aktivitätspeak (**Abb. 3.2, Spur (14)**) und mit dem monoklonalen anti-P2-Antikörper nur der zweite (**Abb. 3.2, Spur (11) und (15)**) und der dritte Aktivitätspeak (**Abb. 3.2, Spur (12)**) angefärbt.

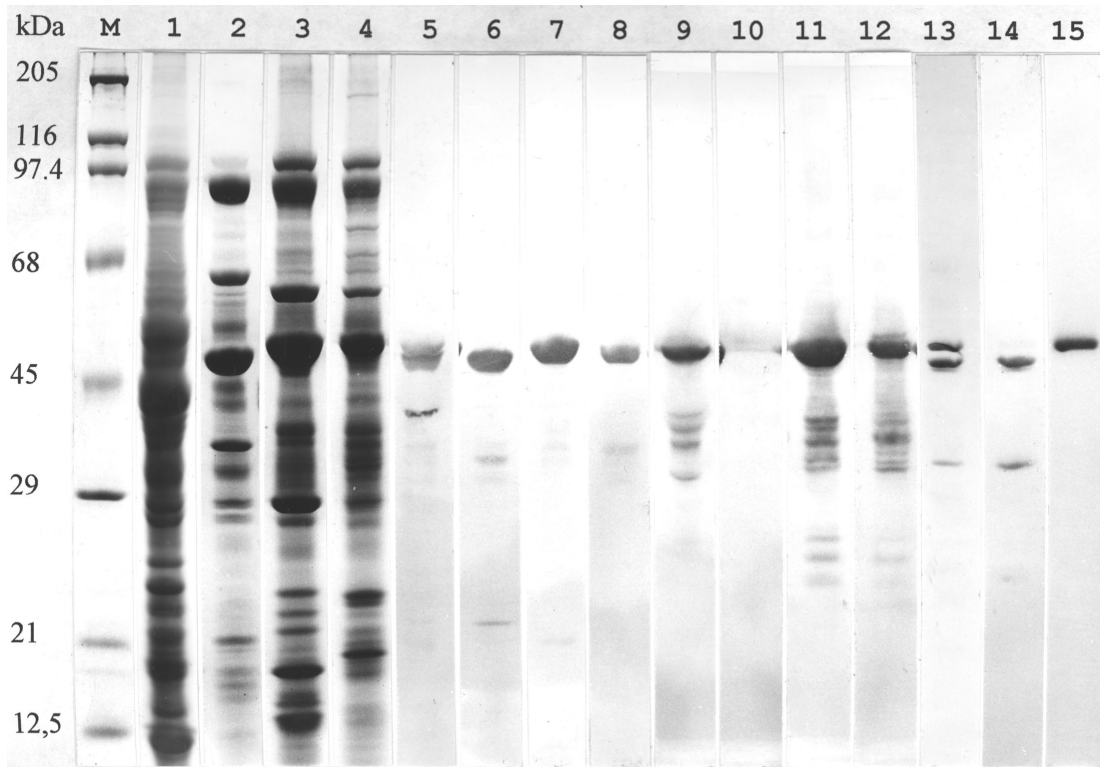


Abb. 3.2: SDS-PAGE und immunologische Charakterisierung der drei Aktivitätspeaks aus dem Hautmuskelschlauch. (M) und (1)-(4): Coomassie-gefärbt, (M): Molekulargewichts-Standard, (1): Rohextrakt des Hautmuskelschlauch-Extrakts, (2): erster Aktivitätspeak der DEAE-Elution, (3): zweiter Aktivitätspeak der DEAE-Elution, (4): dritter Aktivitätspeak der DEAE-Elution, (5)-(8): Western-Blot von (1)-(4) in gleicher Reihenfolge, Färbung mit anti-Fragmin-Antikörpern, (9)-(12): Western-Blot von (1)-(4) in gleicher Reihenfolge, Färbung mit anti-P2-Antikörpern, (13): Mischung der über Gelfiltration gereinigten ersten und zweiten Aktivitätspeaks, Coomassie-gefärbt (14): Western-Blot von (13), Färbung mit affinitätsgereinigten, polyclonalen anti-P1-Antikörpern, (15): Western-Blot von (13), Färbung mit monoklonalen anti-P2-Antikörpern

3.1.2 Vergleich der proteolytischen Spaltprodukte der gereinigten EWAM-Fractionen

Eine weitere Möglichkeit neben der immunologischen Untersuchung, Unterschiede der Varianten nachzuweisen, besteht z. B. darin, die Spaltungsmuster nach einem limitierten proteolytischen Verdau miteinander zu vergleichen. Abweichende Spaltungsmuster sind ein Anhaltspunkt für die Existenz von unterschiedlichen Proteinen. Hierzu wurden, wie unter 2.3.9 beschrieben, die Gelfiltrations-gereinigten EWAM-Fractionen mit *Staphylococcus aureus*-Protease V8 verdaut. Da ein solcher Verdau bereits von Thiele (1991) durchgeführt worden war, wird hier auf einige Abbildungen verzichtet. Die Verdau-Versuche ergaben folgende Erkenntnisse:

1.) Auf die Behandlung mit der Protease V8 reagieren die verschiedenen EWAM-Isoformen unterschiedlich. Zunächst wurden gereinigte Fractionen von P1, P2 und P3 für eine unterschiedliche Dauer zwischen einer und 80min der Proteolyse ausgesetzt. Während P2

und P3 schon nach einer Minute stark verdaut waren, zeigte P1 erst nach ca. 20min eine deutliche Degradation (nicht abgebildet).

2.) Das Spaltmuster von P2 und P3 ist sehr ähnlich (nicht abgebildet), während das von P1 stark von ihnen abweicht (Abb. 3.4: Spuren (2) und (7)).

3.) Die Färbung mit monoklonalem anti-P2 zeigt die immunologischen Unterschiede auch der Spaltprodukte der EWAM-Fraktionen P1 und P2/P3: Der Antikörper erkennt ausschließlich P2 und P3 und ihre Spaltprodukte (für P2 gezeigt: Abb. 3.4: Spuren (8) und (10)), er färbt dagegen nicht P1 oder seine Spaltprodukte (Abb. 3.4: Spur (3)) an.

4.) Erst bei der Proteolyse nach Actin-Bindung wird ein ca. 15kDa-Spaltprodukt von P1 angefärbt (Abb. 3.4: Spuren (4) und (5)), das das gleiche apparente Molekulargewicht hat wie ein Fragment von P2, das ebenfalls nach der Mischung mit Actin verdaut wurde (Abb. 3.4: Spuren (9) und (10)). Auch die Konformation von P2 scheint durch die Bindung des Actins verändert zu werden, da sich das Muster der Spaltprodukte ändert. Ein 29kDa-Spaltprodukt tritt stärker auf, wenn P2 alleine verdaut wird (nicht abgebildet), P2 wird also etwas vor dem Verdau geschützt.

5.) Die Bindung von Actin und P1 (Mischung 2:1) ermöglicht einen weitaus stärkeren Abbau von Actin durch die Protease, als wenn Actin einzeln verdaut wird (**Abb. 3.3: Spuren (3) und (10)**). Das legt den Schluss nahe, dass durch die Bindung des G-Actins an den Actin-Modulator die Konformation des Actins so verändert wird, dass es dem Angriff der Protease gegenüber empfindlich wird. Eine solche Konformationsänderung könnte auch bei der durch den Modulator unterstützten Nukleation des Actins eine Rolle spielen.

Aus der immunologischen Charakterisierung und der Analyse der Spaltungsmuster lässt sich schließen, dass mindestens zwei distinkte Isoformen im Hautmuskelschlauch existieren, nämlich P1 und P2/P3, wobei letztere nach den Ergebnissen sehr ähnlich oder identisch sind.

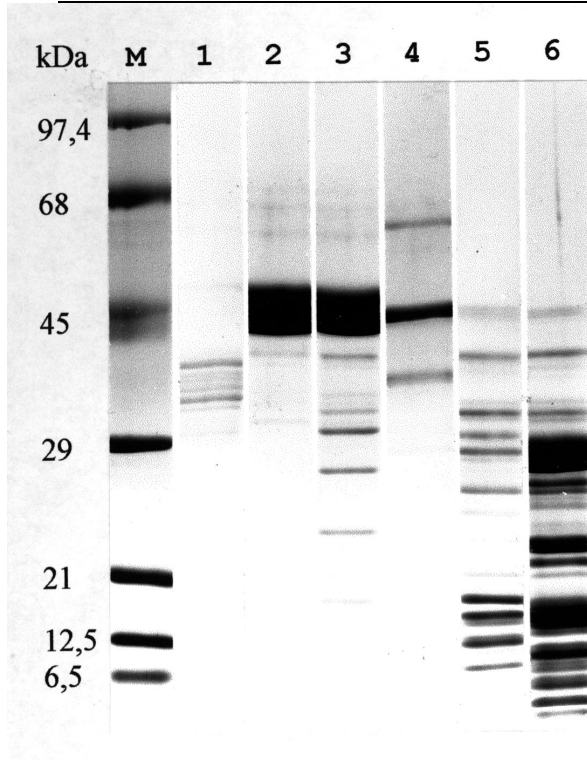


Abb. 3.3: Die *Staphylococcus aureus*-Protease V8 kann sowohl Actin als auch den Modulator nach der Bindung von Actin und EWAM-P1 stärker verdauen. Coomassie-Färbung. (M): Molekulargewichts-Standard, (1): Protease V8, 200fach stärker konzentriert als in den Verdau-Ansätzen, (2): Actin, (3): Actin, Verdau mit V8, (4): gereinigter EWAM-P1, (5): gereinigter EWAM-P1, Verdau mit V8, (6): Mischung aus Actin und EWAM-P1 im Verhältnis 2:1, Verdau mit V8.

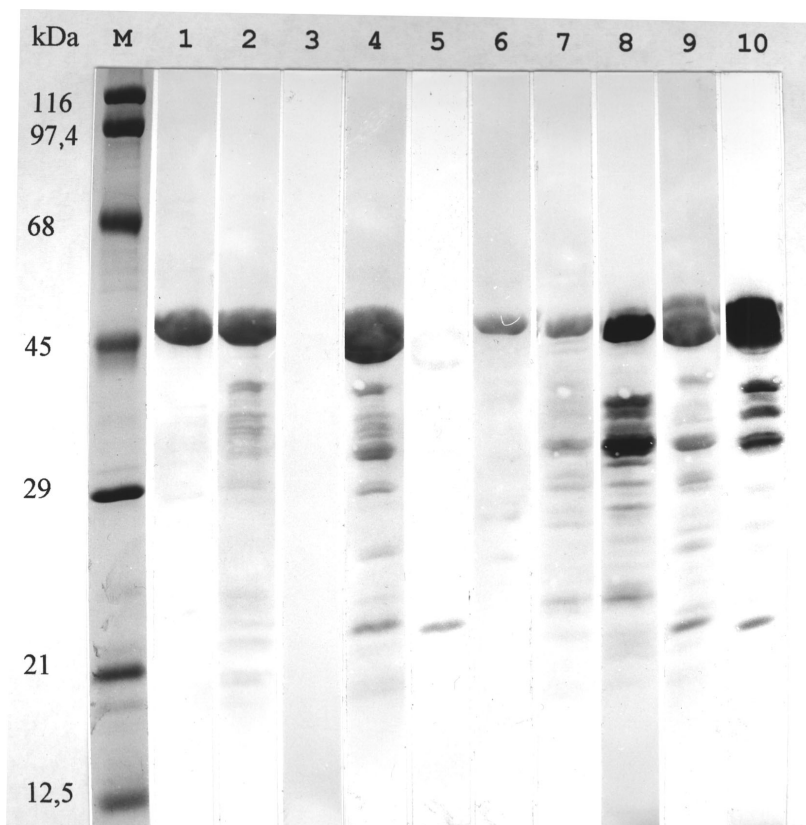


Abb. 3.4: Vergleich der Spaltungsmuster von P1 und P2 nach proteolytischem Verdau mit *Staphylococcus aureus*-Protease V8, mit und ohne Bindung von Actin. Spuren (1) bis (5): EWAM-P1, Spuren (6) bis (10): EWAM-P2. (M): Coomassie-gefärbt, (1), (2), (4), (6), (7), (9): Ponceau-Färbung des Blots, (3), (5), (8), (10): Markierung mit dem anti-P2-Antikörper. (M): Molekulargewichts-Standard, (1): gereinigter P1, (2) und (3): gereinigter P1, Verdau mit V8, (4) und (5): gereinigter P1 + Actin (Verhältnis 1:2), Verdau mit V8, (6) gereinigter P2, (7) und (8): gereinigter P2, Verdau mit V8, (9) und (10): gereinigter P2 + Actin (Verhältnis 1:2), Verdau mit V8.

3.1.3 Die Sequenz einer zweiten Isoform aus der P2/P3-Gruppe des Gelsolin-verwandten Proteins

Vom Hautmuskelschlauch war eine Genbibliothek im Vektor λ ZAP erstellt worden (Giebing et al., 1994). Mit Hilfe von Sequenzinformationen aus der Sequenzierung von Peptiden des isolierten P2-Aktivitätspeaks war mit Hilfe entsprechender Primer und Sonden ein Klon isoliert worden, dessen Sequenz aber dem Aktivitätspeak P1 zugeordnet wurde (Giebing et al., 1994). Nicht mit der Sequenz von P1 übereinstimmende Proteinsequenzen waren Ausgang für die Suche nach P2/P3-spezifischen Klonen. Mit diesem Ansatz war außerdem die Hoffnung verbunden, doch noch Sequenzunterschiede zwischen P2 und P3 aufzufinden. Es konnte jedoch trotz über zehnfacher Wiederholung der Hybridisierung von mit der Genbibliothek infizierten Bakterienkolonien der Plattierungszellen XL1-Blue kein Klon isoliert werden, der die Information für P2/P3 trug. Dagegen konnte mit der P2/P3-spezifischen Sonde ein P1-Klon identifiziert und isoliert werden. Wurde die gleiche Prozedur mit einer Actin-spezifischen Sonde durchgeführt, so zeigten etwa 10% der Klone eine positive Reaktion. Das ist ein realistischer Wert, denn in einem Muskelgewebe sollte Actin etwa 10% der Gesamtproteine ausmachen.

Die Sonde war durch Amplifikation mit einem P2-spezifischen Primer (ISO2) (siehe 2.4.3 und Tabelle 2.1) und einem Primer aus einer in Gelsolin-artigen Proteinen konservierten Region (anti-FILD) in RT-PCRs mit Hautmuskelschlauch-cDNA erhalten worden. Um Sequenzinformationen zu erhalten, wurde das Amplifikat in den pZErO-2-Vektor inkloniert. Das Plasmid des Klons 6/12.12. Nr. 3 diente als Template der Cycle-Sequenzierung mit M13 reverse und M13 (-40)-Primern in Sense- und Antisense-Richtung. Die Sequenzierung dieses Fragments von ca. 400bp (**Abb. 3.5**) brachte Informationen zum Design neuer Primer, indem Stellen ausgewählt wurden, in denen sich P1 und P2/P3 auf der Nukleotidebene unterscheiden (siehe 2.4.3).

Abb. 3.5: Erstes PCR-Fragment, das mit den Primern ISO2 und anti-FILD amplifiziert wurde, und abgeleitete Aminosäuresequenz (die Zahlen geben die entsprechenden Aminosäuren in P1 an)

	AGACTCCTAC	ATCATCCTCA	ATACGTACAA	GCTGAAGGGT	AGAGAGGAGC	TCGCCTACGA
72	G D S Y	I I L	N T Y	K L K G	R E E	L A Y
	TGTTGACTTC	TGGATTGGAA	GCAAAAGCAC	TCAGGACGAA	TATTGCGTGG	CAGCTTACAA
92	D V D F	W I G	S K S	T Q D E	Y C V	A A Y
	GACCGTTGAG	TTGGATGCGT	ACCTCGACGA	CGCGGCCATT	CAACATCGGG	ACGCGGAGGG
112	K T V E	L D A	Y L D	D A A I	Q H R	D A E
	CAACGAATCC	GATCTGTTTT	TAAGCTATTT	TGAAAACGGA	TTAACCATCA	TGGAGGGTGG
132	G N E S	D L F	L S Y	F E N G	L T I	M E G
	CGCCGAGAGT	GGATTCAATA	ACGTGAAGGC	GGAGGAATAC	AAAGCACGGC	TGCTGCATTT
152	G A E S	G F N	N V K	A E E Y	K A R	L L H

```

CTCCGGACTT AAGAAACACA TCGTCGTCAA GGAGGTTCTT CTTTGTCTC AGCGCCTGAA
172 F S G L K K H I V V K E V P L C P Q R L
GTCGGAC
192 K S D

```

Durch Kombination von verschiedenen Methoden (3′/5′-RACE, PCR mit cDNA und mit λ-Phagen der Genbibliothek als Template etc.) konnte, wie im Folgenden dargestellt wird, schließlich die gesamte Basensequenz der mRNA einer zweiten Isoform aus der P2/P3-Gruppe des Gelsolin-verwandten Proteins des Regenwurms entschlüsselt werden. Das 5′-RACE erbrachte überhaupt keine amplifizierbaren Fragmente, trotz mehrerer nachgeschalteter nested-PCRs. Mit Hilfe der PCR mit λ-Phagen der Genbibliothek als Template konnten für das 5′-Ende von P2 zwei etwas unterschiedlich lange Fragmente amplifiziert werden, eines mit etwa 430bp und eines mit etwa 450bp (**Abb. 3.6**).

Abb. 3.6: Für das 5′-Ende werden zwei unterschiedlich lange Amplifikate erhalten (Nukleotid-Austausche fett geschrieben)

450bp-Fragment:

```

GGCACGAGGTTCAGGGAAACGTCTGTCTTCATAAATCGGATTCCCGTTTGAGATCGCAGCTG
ZAP-Adaptor                               Stop!
TTGTTTTGTTCTGTTTAACTACAGCCGAAAGATGTCTGGTCTTGTGAAGGCAAAGCGCTAC
                               M S G L V K A K R Y
GACTGGAAGGACTCGAACTTGGCTATGTTCGGCTCAGCCCTCGACAAATCCGTTAAGAAGGA
D W K D S N L A M F G S A L D K S V K K
GTCAGCCTTGAAGGAAGCAGCCTGGAAGGGAGTTGGGGAGAAAGTTGGCCTGAAAATCTGGC
E S A L K E A A W K G V G E K V G L K I W
GCATTGTGAATTTCAAAGTGACTGAATGGCCGAGAAAGATTAtGGTTCGTTCTTCAGCGGA
R I V N F K V T E W P E K D Y G S F F S G
GACTCCTACATCATCCTCAATACGTACAAGCTGAAGGGTAGAGAGGAGCTC
D S Y I I L N T Y K L K G R E E L

```

430bp-Fragment:

```

GGCACGAGGTTTGAGACTGCAGCTGTTGTTTTGTTTTGTTTAACTACAGCCGAAAGATGTC
ZAP-Adaptor                               M
TGGTCTTGTGAAGGCAAAAACGCTACGACTGGAAGGACTCCAACTTGGCTATGTTCGGCTCTG
S G L V K A K R Y D W K D S N L A M F G S
CCCTCGACAAATCCGTTAAGAAGGAGTCAGCCTTGAAGGAGGCAGCCTGGAAGGGAGTTGGG
A L D K S V K K E S A L K E A A W K G V G
GAGAAAGTTGGCCTGAAAATCTGGCGCATTGTGAATTTCAAAGTGACTGAATGGCCGAGAA
E K V G L K I W R I V N F K V T E W P E
AGATTATGGTTCGTTCTTCAGCGGAGACTCCTACATCATCCTCAATACGTACAAGCTGAAGG
K D Y G S F F S G D S Y I I L N T Y K L K
GTAGAGAGGAGCTC
G R E E L

```

In der 5'-nicht-codierenden Region der längeren Sequenz kommt ein Stop-Codon vor (TAA), ebenso, wie es für die erste Isoform beschrieben wurde (Giebing et al., 1994). Eine Konsensus-Sequenz direkt vor dem Startcodon für den Start der Translation ($CC^A/GCCATG$) nach Kozak (1986) ist nicht vorhanden. Allerdings findet sich ein Purin (A) in der Position -3 (vom A des Startcodons aus gesehen), das als hochkonserviert und notwendig für die Bindung der Ribosomen angesehen wird (Kozak, 1986). 75% der eukaryontischen mRNA weisen hier ein A auf, 20% ein G. Nur weniger als 5% verfügen jedoch über eine vollständige, ideale Sequenz vor dem Startcodon (Kozak, 1986).

Der Vergleich dieser beiden Sequenzen ergibt, dass der Längenunterschied auf eine unterschiedlich lange 5'-nicht-codierende Region zurückzuführen ist. Daneben sind jedoch auch Nukleotid-Austausche feststellbar, und zwar drei in der nicht-codierenden Region und vier in der codierenden Region. Diese Austausche sind in **Abb. 3.6** und **Abb. 3.7** in der kürzeren Sequenz durch Fettschreibung hervorgehoben. Aufgrund dieser Austausche ist es denkbar, dass es sich bei der einen Sequenz um den 5'-Terminus der Isoform P2 und bei der anderen Sequenz um den der Isoform P3 handeln könnte.

Abb. 3.7: Vergleich der 5'-nicht-codierenden Regionen (die längere Sequenz oben, die kürzere Sequenz unten, Nukleotid-Austausche fett geschrieben):

<p>450bp: GTTCAGGGAAACGTCTGTCTTCATAAATCGGATTCCC GTTTGAGATCGCAGCTGTTGTTTTGTTCTGTTTAAACCTACAGCCGAAAG</p> <p>430bp: GTTTGAGACTGCAGCTGTTGTTTTGTTTTGTTTAAACCTACAGCCGAAAG</p>

Das Fragment, das mit Hilfe des 3'-RACE mit den P2-spezifischen Primern GREEL und FENGL erhalten wurde, war nur etwa 250bp lang, es hybridisierte jedoch im Southern-Blot mit der P2-Sonde. Eventuell hat dort der „oligo(dT)anchor primer“ (Boehringer) falsch hybridisiert, auch wenn im Nachhinein keine Adenin-reiche Stelle gefunden werden konnte. Die Sequenzierung dieses Amplifikats erbrachte ein Fragment der P2-Sequenz, das ungefähr bis Base 680 reichte und Informationen zum Design neuer Primer brachte (MQYLQ und anti-CPQRL). Auch in der Genbibliothek sollten die Inserts bis zum poly-A-Schwanz reichen, daher wurde auch ein „3'-RACE“ mit λ -Phagen der Genbibliothek statt mit cDNA ausgeführt. Auch hierbei wurde ausschließlich das kurze, mit der Sonde hybridisierende Fragment amplifiziert. Um trotzdem das 3'-Ende der Sequenz zu erhalten, wurde in PCRs mit λ -Phagen der Genbibliothek mit mehreren ineinanderge-

schachtelten nested-PCRs mit jeweils einem sequenz- und einem für den pBluescript-Vektor spezifischen Primer der 3'-Terminus amplifiziert. Da die mit etwa 2kbp recht langen Fragmente sich nicht durch Reamplifikation verstärken ließen, wurden sie zur Sequenzierung in den pGEM-T Easy-Vektor (Invitrogen) inkloniert. Die Sequenzierung erbrachte den noch fehlenden 3'-Terminus der kodierenden Region. Kurz nach dem Stop-Codon (TAA) der kodierenden-Region brach die Sequenzierung jeweils ab, so dass keine poly(A)-Sequenz gefunden werden konnte.

Durch Kombination aller Ergebnisse der Sequenzierungen von PCR-Fragmenten konnte die gesamte Sequenz von P2 entschlüsselt werden. Das 5'-Ende, das durch Amplifikation mit T3-Primer und anti-GREEL-Primer, und das 3'-Ende, das durch Amplifikation mit MQYLQ- und T7- Primern mit Hilfe der λ -Phagen der Genbibliothek erhalten werden konnten, sind in **Abb. 3.8** durch Kursivschreibung markiert. Alle Fragmente sind mindestens zweimal sequenziert worden und werden daher als abgesichert angesehen. In Abb. 3.8 wurde das längere Fragment des 5'-Terminus eingesetzt, das das Stop-Codon im nicht-kodierenden Bereich aufweist.

Abb. 3.8: Vollständige Sequenz der zweiten Isoform des EWAM

```

GGCACGAGGTTCAGGGAAACGTCTGTCTTCATAAATCGGATTCCCGTTTGAGATCGCAGCTG
ZAP-Adaptor                               Stop!
1  TTGTTTTGTTCTGTTTAACTACAGCCGAAAGATGTCTGGTCTTGTGAAGGCAAAACGCTAC
1  M S G L V K A K R Y
31  GACTGGAAGGACTCCAACCTTGGCTATGTTTCGGCTCTGCCCTCGACAAATCCGTTAAGAAGGA
11  D W K D S N L A M F G S A L D K S V K K
93  GTCAGCCTTGAAGGAGGCAGCCTGGAAGGGAGTTGGGGAGAAAGTTGGCCTGAAAATCTGGC
31  E S A L K E A A W K G V G E K V G L K I W
155 GCATTGTGAATTTCAAAGTGACTGAATGGCCGGAGAAAGATTATGGTTTCGTTCTTCAGCGGA
52  R I V N F K V T E W P E K D Y G S F F S G
217 GACTCCTACATCATCCTCAATACGTACAAGCTGAAGGGTAGAGAGGAGCTCGCCTACGATGT
73  D S Y I I L N T Y K L K G R E E L A Y D
279 TCACTTCTGGATTGGAAGCAAAAGCACTCAGGACGAATATTGCGTGGCAGCTTACAAGACCG
93  V H F W I G S K S T Q D E Y C V A A Y K T
341 TTGAGTTGGATGCGTACCTCGACGACGCGGCCATTCAACATCGGGACGCGGAGGGCAACGAA
114 V E L D A Y L D D A A I Q H R D A E G N E
403 TCCGATCTGTTTTTAAGCTATTTTGAAAACGGATTAACCATCATGGAGGGTGGCGCCGAGAT
135 S D L F L S Y F E N G L T I M E G G A E
465 GGGATTCAATAACGTGAAACCGGAGGAATACAAAGCACGGCTGCTGCACTTCTCCGACTTA
155 S G F N N V K P E E Y K A R L L H F S G L
527 AGAAACACATCGTCGTCAAGGAGGTTCTCTTTGTCCTCAGCGCCTGAAGTCGGACGACGTC
176 K K H I V V K E V P L C P Q R L K S D D V
589 TTCATCCTTGACCTTGGCCGGACACTCTACCAGTGGAACGGAACCGGAAGCAACAAGGACGA
197 F I L D L G R T L Y Q W N G T G S N K D
651 GAGGTTCAAGGCGATGCAGTATCTGCAGAACCTCAAAGCGGAAAGAGGGGCTGCGACATCGA
217 E R F K A M Q Y L Q N L K A E R G A A T S
713 AAACCCTTGAAGAGGAACACATTGATAAATCGCATGAGTTTTATACTACTGACTGGTGAG
238 K T L E E E H I D K S H E F Y T S L T G E
775 GATGAGGACTTACCCGAAGACCAGACAGACTCAGCAGCCGTAAAGACTCTCCTGCGCGTGTGTC
259 D E D L P E D Q T D S A A V K T L L R V
837 TGATGCAGCCGGTCACTTCAAATCAACTGTTGTGAAAACGGGCCACATTGCAGCCTCCGACC

```

```

279  S D A A G H F K S T V V K T G H I A A S D
899  TCGACAGCAAAGATGTGTTTCATTTTGGATAATGGCAGTACCTGTTTCGTATGGGTTCGGAAAT
300  L D S K D V F I L D N G S T C F V W V G N
961  GGAGCTTCAGCCCAGGAAAAGCGCAACGGACTGGGATATGCGCATAGTCATCTGATGAAGAC
321  G A S A Q E K R N G L G Y A H S H L M K
1023 TCCCCATCCTCTCATCCCCATCTTACGTCATCAAAGAGGGCAGGCCAGCAAGTGTTCATG
341  T P H P L I P I L R H Q R G Q A S K C F N
1091 CAGCACTCGCCGCCTAA
362  A A L A A -
AAAGTCTATCCGTCTTCGATCCAGCTTCGCTTTCGAGATCTTTGGACGTGACTTTTCAGAGGCTTTTGGCTGAAAAGCTTNCNTTTTTT
AGACCAATTTNTAGTTTTGCAACCNNGTTTAGATCTTAANTCTTACTTNGGATTTAATGCTTGTNGNCTTTGCACATTTTNTTGCAA
CAAAAAANAATTTTGNCAANANTCTTNGTGANAATNTAAGTTTTTTGGTCCCAAACCTACNCCCNTAATTTGCAATTNTTCC
ANCNTNGGTGAGTNTATGAAAGAANTTTTGGGGTGNNAANAANTAAAANCCAATTNNGAGCCNTTCTNNGCNTTTAGNGGGCCCCCA
ACCCNATTTTNNAAAATTTAANAANTNANGGGGGAA...

```

3.1.4 Charakterisierung der beiden Isoformen aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen

Die von der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz von EWAM-P1 besteht aus 367 Aminosäuren, die von P2 aus 366. Für P1 lässt sich eine Masse von 41538,7Da und für P2 eine Masse von 40924,1Da berechnen. Die apparente Masse nach der Auftrennung im SDS-PAGE wurde hingegen mit 43 und 45kDa angegeben, wobei EWAM-P2 dem Laufverhalten nach die größere Masse besaß (D`Haese and Hinssen, 1987). Der theoretische IEP errechnet sich für EWAM-P1 zu 6,18 und für P2 zu 6,09. D`Haese und Hinssen (1987) hatten mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung IEPs von ungefähr 6,5 gefunden, wobei die erste Isoform 0,1 pH-Einheiten alkalischer als P2 war. Die berechneten IEPs stimmen also relativ gut überein.

Die Verteilung geladener Aminosäuren ist in beiden Isoformen sehr ähnlich: Die Aminosäuresequenz von P1 weist 52 und die Sequenz von P2 53 negativ geladene Aminosäuren auf, während in P1 46 und in P2 47 positiv geladene Aminosäuren zu finden sind.

Sowohl für P1 als auch für P2 lassen sich mit Hilfe der verwendeten Computerprogramme (siehe 2.6) keine amino-terminalen Signalsequenzen nachweisen, es sind keine signifikanten Transport- oder Sortierungssignale nachweisbar. Der Aufenthaltsort beider Proteine ist also am wahrscheinlichsten das Cytoplasma. Beide Proteine scheinen diesen Berechnungen nach stabil in Zellen zu sein.

Anzahl der Aminosäuren in P1: 367	Anzahl der Aminosäuren in P2: 366
Molekulargewicht von P1: 41538,7	Molekulargewicht von P2: 40924,1
Theoretischer pI von P1: 6,18	Theoretischer pI von P2: 6,09
Aminosäurezusammensetzung von P1	Aminosäurezusammensetzung von P2
Ala (A) 24 6,5%	Ala (A) 33 9,0%
Arg (R) 9 2,5%	Arg (R) 13 3,6%
Asn (N) 13 3,5%	Asn (N) 14 3,8%
Asp (D) 21 5,7%	Asp (D) 26 7,1%
Cys (C) 3 0,8%	Cys (C) 4 1,1%
Gln (Q) 19 5,2%	Gln (Q) 10 2,7%
Glu (E) 31 8,4%	Glu (E) 27 7,4%
Gly (G) 28 7,6%	Gly (G) 28 7,7%
His (H) 14 3,8%	His (H) 12 3,3%
Ile (I) 13 3,5%	Ile (I) 14 3,8%
Leu (L) 33 9,0%	Leu (L) 35 9,6%
Lys (K) 37 10,1%	Lys (K) 34 9,3%
Met (M) 4 1,1%	Met (M) 5 1,4%
Phe (F) 16 4,4%	Phe (F) 16 4,4%
Pro (P) 14 3,8%	Pro (P) 8 2,2%
Ser (S) 23 6,3%	Ser (S) 28 7,7%
Thr (T) 21 5,7%	Thr (T) 17 4,6%
Trp (W) 7 1,9%	Trp (W) 7 1,9%
Tyr (Y) 15 4,1%	Tyr (Y) 14 3,8%
Val (V) 22 6,0%	Val (V) 21 5,7%
Anzahl negativ geladener Reste (Asp + Glu): 52	Anzahl negativ geladener Reste (Asp + Glu): 52
Anzahl positiv geladener Reste (Arg + Lys): 46	Anzahl positiv geladener Reste (Arg + Lys): 47

3.1.5 Vergleiche der Aminosäuresequenzen der EWAM-Isoformen P1 und P2 untereinander und mit anderen Actin-Modulatoren

Die Sequenzierung von PCR-Produkten, die mit EWAM-P1-spezifischen Primern amplifiziert worden waren, deckten in der 5'-terminalen Hälfte mehrere falsch gelesene Nukleotide auf. Dies war von Giebing (1994) für möglich gehalten worden, da dieser Anteil der Sequenz nicht durch überlappende Klone abgesichert werden konnte. Durch mehrfaches Sequenzieren in sense- und antisense-Richtung kann folgende Sequenz nun als gesichert gelten:

```

P1 alt:           204   TGAAGATCTGGCGCATTGTGAATTTCAAGGTGACTGAATGG
Abgel. AS-Sequenz: 49   L  K  I  W  R  I  V  N  F  K  V  T  E  W
P1 korrigiert:    204   TGAAGATCTGGCGCATTGTGAATTTCAAGGTGACTGAATGG
Abgel. AS-Sequenz: 49   L  K  I  W  R  I  V  N  F  K  V  T  E  W

```

P1 alt: 245 CCACAGAACCAACACGGG AGTTCTACA CG AGATTCTTA
 Abgel. AS-Sequenz: 63 P Q N Q H G S S T R D S
 P1 korrigiert: 245 CCACAGAACCAACACGGAAAGTTCTACAACGGAGATTCTTA
 Abgel. AS-Sequenz: 63 P Q N Q H G K F Y N G D S

P1 alt: 283 CATCATTCTGAACACGTACAAGGCGGACCCGAAGAGCAA
 Abgel. AS-Sequenz: 75 Y I I L N T Y K P D P K S
 P1 korrigiert: 286 CATCATTCTAAACACGTACAAGCCGGACCCGAAGAGCAA
 Abgel. AS-Sequenz: 76 Y I I L N T Y K P D P K S

Der Vergleich der beiden von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen von EWAM-P1 (Giebing et al., 1994) und EWAM-P2 zeigt ein Mosaik von kurzen, identischen Abschnitten, unterbrochen von 1 bis maximal 5 abweichenden Aminosäuren (**Abb. 3.9**). Die Cluster der identischen Aminosäuren sind in der amino-terminalen Hälfte mit maximal 15 identischen Aminosäuren länger als in der carboxy-terminalen Hälfte mit maximal 9 identischen Aminosäuren in ununterbrochener Folge.

Abb. 3.9: Die komplette Aminosäuresequenz von EWAM-P2, abgeleitet von der Nukleotidsequenz der PCR-Fragmente, im Vergleich mit der Aminosäuresequenz von EWAM-P1 (Giebing, 1994, korrigiert). Dem Vergleich mit ClustalW 1.7 liegt die Matrix Blosum62 (Henikoff und Henikoff, 1992) zugrunde, wonach identische Aminosäuren durch Sterne gekennzeichnet, konservative Austausche durch Doppelpunkte und Punkte entsprechend der Bewertung durch die verwendete Aminosäureaustausch-Matrix gekennzeichnet sind:

EWAM-P2	-MSGLVKAKRYDWKDSNLAMFGSALDKSVKKESALKEAAWKGVGEKVGGLKIWRIVNFKVT
EWAM-P1	MATGLIKAKEYDWKDSNLALFGSDTEKQVKKDSAATEPAWKGAGQKEGLKIWRIVNFKVT : ** : *** . ***** : *** : * . *** : ** . * . ***** . * : * *****
EWAM-P2	EWPEKDYGSFFSGDSYII LN TY K L K G R E - E L A Y D V H F W I G S K S T Q D E Y C V A A Y K T V E L D A
EWAM-P1	EWPQNQHKGKFYNGDSYII LN TY K P D P K S N E L A Y D V H F W I G S Q S S Q D E Y G T A A Y K T V E L D T *** : : : : * . * . : ***** . . : . ***** : * : ***** . ***** :
EWAM-P2	Y L D D A A I Q H R D A E G N E S D L F L S Y F E N G L T I M E G G A E S G F N N V K P E E Y K A R L L H F S G L K K H
EWAM-P1	F L D D K P V Q H R E V Q G Y E S E L F R N Y F K Q G L T I L E G G A E T G F H H V K P T E Y K P R L L H F S G Q K Q Q : *** . : *** : . : * ** : ** . *** : ***** : ***** : *** : *** * * . ***** * : :
EWAM-P2	I V V K E V P L C P Q R L K S D D V F I L D L G R T L Y Q W N G T G S N K D E R F K A M Q Y L Q N L K A E R G A A T S K
EWAM-P1	I Y V H E V P L V K E R L D H K D V F I L D L G L T L Y Q W N G K E S S K E E R F K A M Q Y L G L M R S E R P K A E A E * * : *** : ** . ***** ***** . * . * : ***** : : * * * : :
EWAM-P2	T L E E E H I D K S H E F Y T S L T G E D E D L P - E D Q T D S A A V K T L L R V S D A A G H F K S T V V K T G H I A A
EWAM-P1	T L E D E S T P E S H K F Y T S L T G T D E - - P N L V K P L V K E E N Q L L K V S D A G G H L K T T E V K R G A V N S *** : * : ** : ***** ** * : . : ** : ***** . *** : * * * : :
EWAM-P2	S D L D S K D V F I L D N G S T C F V W V G N G A S A Q E K R N G L G Y A H S H L M K T P H P L I P I L R H Q R G Q A S
EWAM-P1	K D F S S N D V F I L D T G D Q C F V W V G K G A S Q S E K Q S G L G Y A H A H L M K T C H P L A P I H V I K E G Q L C . * : . * : ***** . * . ***** : *** . ** : . ***** : ***** * * * * * : . * * .
EWAM-P2	K C F N A A L A A
EWAM-P1	K A F N V A I A A * . ** . * : **

233 von 366 Aminosäuren der zweiten Isoform sind identisch mit P1, was einer Identität von 63,66% entspricht. Das erste Segment weist mit 69,42% (109 von 157 Aminosäuren) die größte Identität auf, gefolgt vom zweiten Segment mit 60,36% (67 von 111 Aminosäuren) und dem dritten Segment mit 58,16% (57 von 98 Aminosäuren) Identität. Es ist also eine starke Abnahme der Identität der beiden EWAM-Isoformen vom amino- zum carboxy-Terminus feststellbar.

Gelsolin-verwandte Proteine zeichnen sich durch den Besitz eines Satzes von konservierten Sequenzen auf, die B, A und C genannt werden (Way und Weeds, 1988), die dreifach (40kDa-Modulatoren) oder sechsfach (80kDa-Modulatoren), entsprechend der Anzahl der Segmente, wiederholt werden. Durch Sequenzvergleich mit Hilfe von ClustalW (siehe 2.5.7) lassen sich auch in den beiden EWAM-Isoformen die Motive B, A und C identifizieren, die dreifach wiederholt werden (**Abb. 3.10**).

Abb. 3.10: Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei Segmente der beiden EWAM-Isoformen. Die drei Motive B, A und C sind hierdurch identifizierbar. Die konservierten Aminosäuren der Motive B, A und C (Way und Weeds, 1988) sind fett hervorgehoben. Identische Aminosäuren sind durch Sterne, konservative Austausche durch Doppelpunkte und Punkte markiert:

EWAM-P1/S1	MATGLIKAKEYDWKDSNLALFGSDTEKQVKKDSAATEPAWKGAGQKEGLKIWRIVNFKVT
EWAM-P2/S1	MS-GLVKAKRYDWKDSNLAMFGSALDKSVKKEAALKEAWKGVGKVKGLKIWRIVNFKVT
EWAM-P1/S2	-----HHVVK-TEYKPRLLHFSGQKQ-----QIYVH
EWAM-P2/S2	-----NNVKP-EEYKARLLHFSGGLK-----HIVVK
EWAM-P1/S3	-----VKE-ENQLLKVSDAGGHLK-----TTEVK
EWAM-P2/S3	-----SAAVKT----LLRVSDAAGHFK-----STVVK
	* * * *
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> B A </div>
EWAM-P1/S1	EWPQNQHGSSTR- DSYIIL NNTYKPDPKSNELAYDVHFWIGSQSSQDEYGTAAAYKTVELD
EWAM-P2/S1	EWPEKDYGSFFSGDSYIILNTYKLGRE-ELAYDVHFWIGSKSTQDEYCVAAAYKTVELDA
EWAM-P1/S2	EVPLVKERLDHK- DVFIL -----D-----LGLTLYQWNGKESKEEGFKAMQYLGLMRS
EWAM-P2/S2	EVPLCPQRLKSD- DVFIL -----D-----LGRTLYQWNGTGSNKDERFKAMQYLQNLKA
EWAM-P1/S3	RGAVNSKDFSSN- DVFIL -----D-----TGDQCFVWVGKGRFAVGEAEWTRISHALM
EWAM-P2/S3	TGHIAASDLDSK- DVFIL -----D-----NGSTCFVWVGNGASAEKRNGLGYAHSHLM
	* : * : . . . * * :
	C
EWAM-P1/S1	FLDD-KPVQHREV QGYES - -ELFRNY- FK -QGLTILEGGAETGF
EWAM-P2/S1	YLDD-AAIQHRDA EGNES - -DLFLSY- FE -NGLTIMEGGAESGF
EWAM-P1/S2	ERPKAEAETLED- ESTPESH - KFYT - - SL TGTDEPNLVKPL---
EWAM-P2/S2	ERGAATSKTLE- EHI DKSH- EFYT - - SL TGEDEDLPEDQTD--
EWAM-P1/S3	KTCHPLAPI- - HVIKEGQLCKAFNVAIAA -----
EWAM-P2/S3	KTPHPLIPILRHQR GTGQASKCFNAALAA -----

Abb. 3.11: Gegenüberstellung der EWAM-Isoformen mit Severin aus *Dictyostelium discoideum* (André et al., 1988), Fragmin aus *Physarum polycephalum* (Ampe and Vandekerckhove, 1987, T Jampens et al., 1997) und der amino-terminalen Hälfte von humanem Plasmagelsolin (Kwiatkowski et al., 1986). Legende wie oben. Erläuterungen im Text.

EWAM-P2	1	-MSGLVKAKRYDWKDSNLAMFGSALDKSVKKESALKE-AAWKGVGEKVGLKIWRIVNFKV	58
EWAM-P1	1	MATGLIKAKEYDWKDSNLALFGSDTEKQVKKDSAATE-PAWKVAGQKEGLKIWRIVNFKV	59
severin	1	----MIKNRKLDTSTNVAGIGTDLDDKKCRLLDAASTE-AQWKVGVQAPGLKIWRIVENFKV	55
fragmin	1	----MQKQKEYNIADSNIANLGTLELEKVKLEASQHE-DAWKVAGKQVGVETIWRIQQFKV	55
gelsolin	1	-ATAS-----RGASQAGAPQGRVPEARNPNSMVVEHPEFLKAGKEPGLQIWRVEKFDL	51
		: . * . . : : * : . * : * : * * : * . :	
		G-Actin bindende α-Helix	
EWAM-P2	59	TEWPEKDYGSFFSGDSYIILNNTYKLGREELAYDVHFWIGSKSTQDEYCVAAAYKTVELD	117
EWAM-P1	60	TEWPQNQHGSSTR-DSYIILNNTYKPDPKSNELAYDVHFWIGSQSSQDEYGTAAAYKTVELD	118
Severin	56	VPVPESYKGFYDGDYSYIILHTFK--EGNSLKHDTHFFLGTFTTQDEAGTAAYKTVELD	112
Fragmin	56	VPVPPKHHGSHFYTGDSYIVLSTYHPKTNPDKLAYDVHFWLGAFTTQDEAGTAAYKTVELD	115
Gelsolin	52	VPVPTNLYGDFFTGDAYVILKTVQLR-NGN-LQYDLHYWLGNECSQDESGAAAIFTVQLD	109
		. * . : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
		PIP₂-Bindung F-Actin-Bindung PIP₂-Bindung	
EWAM-P2	118	AYLDDAIIQHRDAEGNESDLFLSYF-ENGLTIMEGGAESGFNNVKPEEYKA-RLHFHFSGL	175
EWAM-P1	119	TFLDDKPVQHREVQGYESELFRNYF-KQGLTILEGGAETGFHHVKPTEYKP-RLHFHFSGQ	176
Severin	113	DFLGGAPIQYRQCQSYESPSFLSLFPK--FYFILSGGVESGFNHVKPTEYKP-RLHHISG-	169
Fragmin	116	DYLGGLPVQYREVQGYESERFLSLFPKGGRLILDGGVETGFHHVEADKYRT-RLHHLGK-	173
Gelsolin	110	DYLNGRAVQHREVQGFESATFLGYF-KSGLKYGKGGVASGFKHVVPNEVVQ-RLFQVKG-	167
		: * . . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
		F-Actin-Bindung F-Actin-Bindung	
EWAM-P2	175	KKHIVVKEVPLCPQRLKSDDVFIIDLGRITLYQWNGTGSNKDERFKAMQYLQNLK-AER-	233
EWAM-P1	176	KQQIYVHEVPLVKERLDHKDVFILDLGLTLYQWNGKESKKEEGFKAMQYLGLMR-SER-	234
Severin	170	DKNKVAEVPLATSSLNSGDCFLLDAGLTIYQFNGSKSSPQEKNAEVARAID-AERKQ	228
Fragmin	174	KKHIRVHEVPKTYKSLNSGDVFLDAGKTVIQWNGAKAGLLEKVKAAELLQAIE-GERE-	231
Gelsolin	168	RRVVRATEVPVSWESFNNGDCFIIDLGNLHQWCGSNSNRYERLKATQVSKGIRDNERS-	226
		. * * * . : . * * : * * * . : : * : * : . * * * : : * * :	
EWAM-P2	234	-GAATSKTLEEEHIDKSHEFYTSLT-----GEDEDLPEDQTDAAVK-----TLLRVSDA	281
EWAM-P1	235	-PKAEAETLEDESTPESHKFYTSLT-----GTDE-PNLVKPLVKEEN-----QLLKVSDA	282
Severin	229	LPKVEVFCETDSIPAEFWKLLGGK-----GAIA-AKHETAPTKEK-----VLYKLSDA	276
Fragmin	232	-GIASGRVVAEADNDTEFFTLLGDK-----GPIADAAAGGSDLEADKKDQPAVLLRLSDA	285
Gelsolin	227	-GRARVHVSEEGTEPEAMLQVLGPKPALPAGTEDTAKEDAANRKLAK-----LYKVSNG	279
		. : : * . . : . * : * * * . : : * : * : . * * * : : * * : * : *	
EWAM-P2	282	AGHFKSTVVKTG-HIAASDLDSKDVFIIDNG--STCFVWVGNGASAEKRNGLGYAHS--	336
EWAM-P1	283	GGHLKTTEVVRG-AVNSKDFSSNDVFIIDTG--DQCFVWVGKGRFAVGEAEWTRISHA--	337
Severin	277	SGSLKFSEVSRG-KINKSSLKSEDFIIDLG--NEIYTWIG-SKSSPNEKK-TAFSHATQ	331
Fragmin	286	SGKFEFTEVARGLKVKRNLDSNDVFLVLTG--AEVFAWVGKHASVGEKKKALSFAQE--	341
Gelsolin	280	AGTMSVSLVADENPFAQALKSEDCFIIDHKGDKIFVWVGKQANTEERKAALKTASD--	337
		. * : . : * . . : . * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
EWAM-P2	337	HLM--KTPHPLIPILRHQRGQASKCFNAALAA---	366
EWAM-P1	338	HLM--KTCHPLAPIHVIKEGQLCKAFNVAIAA---	367
Severin	334	YLVNKRCEYTPIVRVLENGTNQSFETLLSA---	362
Fragmin	344	YVQKAGLPIHTPVARILEGGENEVFEFFD-----	371
Gelsolin	338	FITKMDYPKQTQVSVLPEGGE-TPLFKQFFKNWRD	371
		. : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Die zwei bekannten Sequenzen für Actin-Modulatoren des Regenwurmes werden im Folgenden mit den Sequenzen anderer Modulatoren verglichen. Diese Vergleiche machen es unter Umständen möglich, Aussagen über die dreidimensionale Gestalt des EWAM sowie über die Lokalisierung funktionell wichtiger Sequenzen zu machen.

Vergleicht man die Sequenzen der EWAM-Isoformen mit denen der Modulatoren Severin, Fragmin und der N-terminalen Hälfte von humanem Gelsolin, dann weist das erste Segment die größte Ähnlichkeit in allen Modulatoren auf. Es besitzt die meisten konservierten Aminosäuren, da es wichtige Funktionen im kompletten Protein zu erfüllen hat (McLaughlin et al., 1993, Burtnick et al., 1997), was dazu führt, dass Mutationen nicht tolerierbar sind (Mannherz et al., 1992). Das erste Segment ist an der G-Actin-Bindung, am Schneiden, Cappen und der Bindung von ein bis zwei Ca^{2+} beteiligt.

Das erste Segment von Gelsolin ist globulär gebaut. Es besteht aus zentralen viersträngigen β -Faltblättern. Diese werden eingerahmt von einer vier Umdrehungen umfassenden α -Helix und einer zu ihr parallel verlaufenden kürzeren, beinahe rechtwinkelig zu den Faltblättern angeordneten α -Helix (Burtnick et al., 1997, McLaughlin et al., 1993). Die anderen Segmente des Vertebraten-Gelsolins enthalten entweder ebenfalls vier oder auch drei β -Faltblätter, die wichtig sind bei der Ausbildung eines hydrophoben Kerns der Segmente (Burtnick et al., 1997). In **Abb. 3.11** sind die hydrophoben Aminosäuren des ersten Segments, die die Ausbildung des hydrophoben Kerns möglich machen (Matsudaira und Janmey, 1988, McLaughlin et al., 1993), und die korrespondierenden Aminosäuren in den anderen Modulatoren fett hervorgehoben. Auch in den 40kDa-Proteinen zeigen diese Aminosäuren einen hohen Grad an Konservierung, was auf eine ähnliche dreidimensionale Struktur der Segmente dieser Proteine hindeutet. McLaughlin et al. (1993) postulieren, dass die Faltung des Segments 1 von Gelsolin Gültigkeit für alle Segmente der Proteine der Gelsolin-Familie besitzt. Schnuchel et al. (1995) konnten durch NMR-Spektroskopie eine ähnliche dreidimensionale Faltung des zweiten Segments von Severin nachweisen. Auch Profilin (Vinson et al., 1993) und das erste Segment von Villin (Markus et al., 1994) besitzen die apolare Kernregion, eine identische Topologie und ähnliche Dimensionen (Burtnick et al., 1997).

Mit Hilfe der gewonnenen Sequenzinformationen wird nun versucht, bestimmte Funktionen des EWAM, für deren Ausführung die Bindung bestimmter Liganden notwendig ist, im Protein zu lokalisieren. Weiterhin können möglicherweise durch den Vergleich mit dem N-Terminus von Gelsolin und Gelsolin-verwandten Proteinen des 40kDa-Typs, für die z. T. detaillierte Kenntnisse der funktionellen Domänen vorliegen, Unterschiede zwi-

schen P1 und P2/P3 herausgestellt werden, die von struktureller oder funktioneller Bedeutung sein könnten.

Allen Actin-Modulatoren sind folgende Eigenschaften gemeinsam:

- Sie sind nur aktiv in der Gegenwart von mikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen.
- Sie üben einen nukleationsfördernden Effekt auf G-Actin aus.
- Sie fragmentieren Actin und binden an das schnellwachsende Ende von Actin.
- Für Vertebraten-Gelsolin, für Fragmin und Severin konnte eine Inhibierung der Bindung an Actin durch PIP_2 gezeigt werden (Yin und Stossel, 1979 und 1980, Gettemans et al., 1995), für EWAM ist sie sehr wahrscheinlich.
- Die Actin-Bindung von Gelsolin ist nicht vollständig reversibel in EGTA, da ein Ca^{2+} unerreichbar zwischen Actin und Gelsolin gefangen ist (McLaughlin et al., 1993). Auch bei Fragmin bleibt ein Actin auch in Gegenwart von EGTA gebunden (T`Jampens et al., 1997 und 1999). Ebenso ist beim EWAM die Actin-Bindung in EGTA nicht vollständig reversibel (D`Haese und Hinssen, 1987).

Daneben unterscheiden sich die Actin-Modulatoren aber in einigen Eigenschaften des Gesamtproteins oder der durch Proteolyse oder durch Deletionsmutanten hergestellten Proteinfragmente. Zum Beispiel enthält Severin drei Actin-Bindungsstellen, eine in jedem Segment (Eichinger und Schleicher, 1992), anders als die anderen beiden kleinen Modulatoren Fragmin und EWAM, die nur zwei Actin-Bindungsstellen besitzen.

Im Folgenden werden ausgehend von den genauer bekannten Bindungsstellen des Gelsolins für die Liganden Actin, PIP_2 und Ca^{2+} die entsprechenden Aminosäuresequenzen des EWAM betrachtet. Die bindenden Domänen des Gelsolins und die entsprechenden, durch das Sequenzvergleichsprogramm gegenübergestellten, Aminosäuresequenzen von EWAM-P1 und -P2, Fragmin und Severin sind in **Abb. 3.11** eingezeichnet. Ein Vergleich dieser Sequenzen mit den Sequenzen der EWAM-Isoformen wird durchgeführt und die Gegenüberstellung bewertet. Eine deutliche Übereinstimmung in den für die Bindung verantwortlichen Domänen wird als Hinweis auf eine funktionelle Ähnlichkeit gewertet.

Vergleicht man die Actin-bindende α -Helix des ersten Segments von humanem Plasmapgelsolin (McLaughlin et al., 1993) mit den korrespondierenden Sequenzen in anderen Mitgliedern der Gelsolin-Familie, dann fällt die große Ähnlichkeit der Sequenzen sofort auf (**Abb. 3.11 und 3.12**). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit kann diese Stelle auch als relevant für EWAM gehalten werden (siehe auch Giebing et al., 1994). Vier von sieben

Aminosäuren, die an der Bindung von G-Actin beteiligt sind (McLaughlin et al., 1993), sind identisch und eine ist konservativ ersetzt (**Abb. 3.11**).

Abb. 3.12: Erste G-Actin-Bindungsstelle (McLaughlin et al., 1993), HGS= humanes Plasmagelsolin. Die apolaren Aminosäuren, die an der Ausbildung der α -Helix beteiligt sind, sind durch Fettschreibung hervorgehoben. Die Aminosäuren, die an der Bindung von G-Actin beteiligt sind, sind durch Sterne gekennzeichnet:

			!	
HGS	86	HYWLGNECSQDESGAAAI	F TVQLDDY L NGRAV	117
EWAM-P1	92	H F WIGSQSSQDEYGT A AAYKTVELDT F LDDKP V		123
EWAM-P2	90	H F WIGSKSTQDEYCV A AAYKTVELDAYLDDAAI		121
			** ** ** *	

Bemerkenswerterweise findet jedoch in beiden EWAM-Isoformen und ebenfalls in den anderen 40k-Modulatoren Severin und Fragmin ein Austausch des Phenylalanins in Position 104 des humanen Gelsolins durch Lysin, eine geladene Aminosäure, statt (markiert durch ein Ausrufezeichen in **Abb. 3.12**). Das Phenylalanin ist als unpolare Aminosäure an der Ausbildung der α -Helix beteiligt, deren Struktur in den kleinen Actin-Modulatoren also möglicherweise gestört ist.

Durch die Untersuchung proteolytischer Spaltprodukte erhielt Bryan (1988) die Information, dass zwei Actin-Bindungsstellen in der N-terminalen und eine in der C-terminalen Hälfte von Gelsolin liegen. Später konnten diese Bindungsstellen durch die Untersuchung von Deletionsmutanten genauer lokalisiert werden: Aminosäuren, die F-Actin binden und die am Schneiden von F-Actin beteiligt sind, liegen zwischen Aminosäure 161 und 172 (Sun et al., 1994) und zwischen Aminosäure 197 und 226 (Van Troys et al., 1996) im zweiten Segment von humanem Gelsolin. Weiterhin wurden die Aminosäuren 150 bis 160 im zweiten Segment aufgrund von Untersuchungen an proteolytischen Spaltprodukten mit dem Schneiden in Verbindung gebracht (Kwiatkowski et al., 1989). Die Kristallisation von Gelsolin in Abwesenheit von Ca^{2+} schließlich zeigte, dass alle diese Stellen zusammen eine exponierte Bindungsstelle im Protein bilden (Burtnick et al., 1997). Vergleicht man die Sequenzen der N-terminalen Hälfte von Gelsolin mit denen von EWAM-P1, EWAM-P2, Severin und Fragmin miteinander, dann erscheint der erste Teil der F-Actin-Bindungsstelle nicht sehr konserviert zu sein. In dieser Bindungsstelle mit 10/11 Aminosäuren Länge, die direkt am N-Terminus des zweiten Segments lokalisiert ist, ist nur eine Aminosäure identisch bei allen verglichenen Modulatoren, und vier sind konservativ ersetzt (**Abb. 3.11**). Für Fragmin konnte eine Actin-Bindung erst C-terminal von AS 169 gezeigt werden (T`Jampens et al., 1997), so dass diese Stelle eventuell auch für EWAM

nicht bei der Bindung von Actin wichtig ist. Nur 2 von 12/13 Aminosäuren sind identisch zwischen dem zweiten Teil der F-Actin-Bindungsstelle und den korrespondierenden Aminosäuren in den anderen Modulatoren. Diese Stelle wird auch mit einer PIP₂-Bindung in Zusammenhang gebracht (s. u.) (**Abb. 3.11**). Vergleicht man nur die entsprechenden Aminosäuren der 40kDa Proteine untereinander, so ist die Ähnlichkeit größer, die Abfolge der Aminosäuren z. B. RLLH tritt bei allen auf, so dass eine, allerdings unbekannte, Funktion dieser Stelle vermutet werden kann. Im EWAM, Severin und Fragmin bindet diese Stelle wahrscheinlich kein Actin aufgrund der fehlenden Sequenzähnlichkeiten zum Gelsolin. Allerdings muss dann die PIP₂-Sensitivität der Actin-Bindung anders zustande kommen als durch Konkurrenz der beiden Liganden um die gleiche Bindungsstelle, wie es beim Gelsolin diskutiert wird. Der dritte Teil der F-Actin-Bindungsstelle scheint stärker konserviert zu sein. 7 Aminosäuren von 30 sind identisch und 5 zeigen einen konservativen Austausch. Für diese Stelle wird die Doppelfunktion der F- und G-Actin-Bindung bei EWAM vorgeschlagen (s. u.).

Zum Nukleieren und zum Schneiden ist jeweils die Kooperation von zwei Actin-Bindungsstellen notwendig. Die Aufgaben des Schneidens und Nukleierens sind also mit minimal zwei Actin-Bindungsstellen insgesamt erfüllbar, denn F-Actin-Bindungsstellen sind in der Lage, alternativ auch G-Actin zu binden. Nur die Bindungsstelle im zweiten Segment von Severin soll ausschließlich F-Actin binden können (Schnuchel et al., 1995). Für die zweite Actin-Bindungsstelle von EWAM, der ja sowohl nukleieren als auch fragmentieren kann, dabei aber mit zwei Bindungsstellen auskommt, muss eine solche Doppelfunktion gefordert werden.

Für Gelsolin konnte die Bindung eines zweiten G-Actin-Moleküls im vierten Segment durch die Untersuchung von Deletionsmutanten gezeigt werden (Pope et al., 1995). Wegen der Sequenzhomologien zwischen S1 und S4 und ähnlicher Oberflächencharakteristiken dieser Segmente ist eine ähnliche Art der Bindung von G-Actin mit S1 und S4 angenommen worden (Burtnick et al., 1997). Für die korrespondierenden Aminosäuren in S4 im Vergleich mit jenen, die G-Actin in S1 binden, konnte eine Ähnlichkeit gezeigt werden. Sie sind zwischen Gln473 and Arg498 lokalisiert (Burtnick et al., 1997).

Fragmin besitzt, wie EWAM, insgesamt nur zwei Actin-Bindungsstellen. Die zweite, Ca²⁺-abhängige Bindungsstelle wird C-terminal von Leu169 angenommen (T`Jampens et al., 1997).

In Severin, das drei Actin-Bindungsstellen besitzt, wird die zweite G-Actin-Bindungsstelle aufgrund von NMR-spektroskopischen Untersuchungen des zweiten Segments nahe dem N-Terminus im zweiten Segment zwischen Asn152 und Lys160 vermutet (Schnuchel et al., 1995).

Für EWAM-P1 konnte durch die Untersuchung von Deletionsmutanten gezeigt werden, dass die zweite G-Actin-Bindungsstelle im zweiten Segment lokalisiert ist (Giebing et al., 1997). Die ersten 27 Aminosäuren von S2 (also bis Aminosäure 185 des Gesamtproteins) reichen jedoch, anders als bei Severin, nicht aus, um das zweite G-Actin-Molekül zu binden.

Um die zweite Bindungsstelle zu lokalisieren, erschien es also sinnvoll, das zweite Segment von 40kDa-Modulatoren (ohne das offensichtlich abweichende Severin) mit dem vierten Segment von Gelsolin zu vergleichen. Bei dem Alignment des zweiten Segments von EWAM-P1 und -P2 und Fragmin mit dem vierten Segment von Gelsolin wird ein Cluster von ähnlichen Aminosäuren erkennbar (**Abb. 3.13, links**), der vielleicht an der Bindung des zweiten G-Actins bei der Nukleation beteiligt ist. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Stelle C-terminal von AS 185 von P1 und AS 169 von Fragmin lokalisiert sind, wie es von T`Jampens et al. (1997) gefordert wird. Ohne Berücksichtigung von Fragmin ist die Ähnlichkeit sogar noch größer (**Abb. 3.13, rechts**). Die größere Ähnlichkeit zum Gelsolin als zum Fragmin könnte die relativ große nukleationsfördernde Wirkung von EWAM im Vergleich zu anderen 40kDa-Modulatoren (Giebing et al., 1994) bewirken. Die Tatsache, dass die gefundene Stelle in der F-Actin-Bindungsstelle (s. o. und **Abb. 3.11**) liegt, erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es sich tatsächlich um die zweite G-Actin-Bindungsstelle handelt, die während des Schneidens auch F-Actin binden kann.

Abb. 3.13: Potentielle zweite G-Actin-Bindungsstelle, mit und ohne Berücksichtigung von Fragmin. Legende wie Abb. 3.11:

HGS	461	GQIIYNWQGAQSTQDE	476	HGS	461	GQIIYNWQGAQSTQDE	476
EWAM-P1	202	GLTLYQWNGKESSKEE	217	EWAM-P1	202	GLTLYQWNGKESSKEE	217
EWAM-P2	201	GRTLQWNGTGSNKDE	216	EWAM-P2	201	GRTLQWNGTGSNKDE	216
Fragmin	200	GKTVIQWNGAKAGLLE	215			* : * : * : *	
		* : * : * : *				* : * : * : *	

Zwei PIP₂-Bindungsstellen sind im Gelsolin identifiziert worden (Yu et al., 1992), die den auf der flachen, Lösungsmittel-exponierten Oberfläche von S2 lokalisierten Arginin- und

Lysinresten zugeordnet werden konnten (Burtnick et al., 1997). Nach Yu et al. (1992) zeichnet sich eine PIP₂-Bindungsstelle durch das Auftreten von Aminosäuren mit basischem Charakter aus, die mit den Phosphatresten des PIP₂ interagieren. In **Abb. 3.11** sind die Arginine und Lysine rot hervorgehoben. Besonders bezüglich der ersten PIP₂-Bindungsstelle finden sich aber bei EWAM, Fragmin und Severin nur wenige Arginine und Lysine an der korrespondierenden Stelle: EWAM-P2 besitzt hier gar kein Lysin oder Arginin, Fragmin weist mit zwei basischen Aminosäuren die meisten auf, während Gelsolin hier vier besitzt. T`Jampens et al. (1997) halten diese Bindungsstelle auch für das Fragmin für wenig konserviert und bezweifeln daher hier eine PIP₂-Bindung. Die vorliegenden Vergleichsergebnisse lassen es fraglich erscheinen, ob eine PIP₂-Bindung an dieser Stelle bei EWAM stattfindet. Fragmin weist dagegen hinsichtlich der korrespondierenden Aminosäuren der zweiten PIP₂-Bindungsdomäne eine große Ähnlichkeit mit Gelsolin auf (T`Jampens et al., 1997). Da die zweite PIP₂-Bindungsstelle des Gelsolins identisch ist mit einem Teil der ersten F-Actin-Bindungsstelle (Aminosäuren 161-172), könnte die Beobachtung, dass die F-Actin-Bindung von Fragmin durch PIP₂ gehemmt wird (Gettemans et al., 1995), durch eine Verdrängung des Actins durch das PIP₂ erfolgen. Für EWAM wurde die Hemmung der Actin-Bindung durch PIP₂ bis jetzt noch nicht gezeigt, ist aber anzunehmen ist. Die potentielle zweite PIP₂-Bindungsstelle ist auch im EWAM stärker konserviert, obwohl die PIP₂-Bindungs-Konsensussequenz nicht klar zu erkennen ist (**Abb. 3.11**) (T`Jampens et al., 1997) (K/RX₄K/RXK/RK/R, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt). Vermutlich ist also bei EWAM nur diese PIP₂-Bindungsstelle funktionell aktiv. Ein anderer auffälliger Cluster basischer Aminosäuren lässt sich in den Sequenzen der EWAM-Isoformen nicht identifizieren.

Hinsichtlich der Ca²⁺-Bindung sind die vorliegenden Ergebnisse etwas uneinheitlich. Fragmente des Gelsolins können evtl. Ca²⁺ binden, ohne dass dies Relevanz im Gesamtprotein hat. Dies wird von Sun et al. (1999) bezüglich der von Pope et al. (1995) beobachteten Fähigkeit von isolierten Segmenten, jeweils mindestens drei Ca²⁺-Bindungsstellen zu besitzen, angemerkt. Die Kristallisation von G-Actin/S1 (McLaughlin et al., 1993) zeigte die Bindung von zwei Ca²⁺-Ionen, wobei ein Ion von Liganden gebunden wird, die sowohl von Gelsolin als auch vom Actin gestellt werden (intermolekulare Bindung). Diese Bindungsstelle weist nur eine niedrige Affinität auf und ist möglicherweise physiologisch nicht von Bedeutung (Weeds et al., 1995). Andererseits wird die Bindung dieses Ca²⁺-Ions in einer Art Falle zwischen den beiden Proteinen dafür verantwortlich ge-

macht, dass ein Actin auch durch Zugabe von EGTA nicht vom Gelsolin getrennt werden kann (McLaughlin et al., 1993). Die andere Bindungsstelle wird durch Liganden gebildet, die allein vom Gelsolin gestellt werden (intramolekulare Bindung). In **Abb. 3.11** sind die intermolekulare Ca^{2+} -Bindungsstelle und die korrespondierenden Aminosäuren der anderen Proteine grün hervorgehoben, während die Aminosäuren der intramolekularen Bindungsstelle blau markiert sind. Das Gly114 des Gelsolins der intermolekularen Ca^{2+} -Bindungsstelle ist durch ein Asp in allen anderen aufgeführten Modulatoren ersetzt, das Ala116 ist nur in EWAM-P2 erhalten, während die anderen 40kDa-Proteine hier ein Pro besitzen. Die intramolekulare Bindungsstelle ist hingegen ähnlicher in allen betrachteten Proteinen. Nur in EWAM-P1 fehlt eine Aminosäure, die mit Gly65 in Gelsolin korrespondiert.

Die Ca^{2+} -Bindungsstelle, die für die eine Aktivierung des Modulators im millimolaren Bereich verantwortlich ist, lässt sich durch Sequenzvergleich nicht identifizieren. Sie muss auf jeden Fall an einer anderen Stelle zu finden sein als bei Gelsolin, denn dort wird eine Ca^{2+} -Bindung im Segment 6 für die Regulation verantwortlich gemacht (Pope et al., 1995, Sun et al., 1999). Wahrscheinlich befindet sich die regulatorische Ca^{2+} -Bindungsstelle im dritten Segment des EWAM, da das erste und zweite Segment Ca^{2+} -insensitiv mit Actin interagieren (Giebing et al., 1997). Die Konformation des Gesamtmoleküls bei Abwesenheit von Ca^{2+} bewirkt nach dem Pseudosubstrat- oder der Tail-Latch-Hypothese eine Bindung des Segments 6 an die Actin-Bindungsstelle von Segment 2. Für Severin ist aufgrund der Untersuchung von Deletionsmutanten bekannt, dass das Protein mindestens zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen besitzt, wovon sich eine im ersten Segment befindet (Eichinger und Schleicher, 1992). Die regulatorische Stelle befindet sich wahrscheinlich innerhalb der letzten 85 Aminosäuren, die andere, im ersten Segment lokalisierte, innerhalb der ersten 111 Aminosäuren (Eichinger et al., 1991). Die Untersuchung des zweiten Segments von Severin mit NMR-Spektroskopie dagegen identifizierte zwei Stellen im zweiten Segment, eine weiter N-terminal gelegen (Ser168, Asp170, Ser208, Glu211), die andere weiter C-terminal gelegen (Asp223, Lys227, Gly228, Leu229). Auch hier gilt wieder, wie bei der Betrachtung von isolierten Segmenten des Gelsolins, dass eine physiologische Relevanz dieser Stellen nicht sicher ist. Die genannten Aminosäuren sind nicht konserviert in den anderen 40kDa-Proteinen, wie eine Gegenüberstellung der entsprechenden Aminosäuren zeigt. Häufig sind saure Aminosäuren durch basische Aminosäuren ersetzt (Asp gegen Arg), die mit ihrer positiv geladenen Seitenkette kein Ca^{2+} komplexie-

ren können. In der zweiten Bindungsstelle werden drei von vier Aminosäuren beim Alignment keine Partner gegenübergestellt:

Severin	Ser168	Asp170	Ser208	Glu211	Asp223	Lys227	Gly228	Leu229
P1	Ser174	Lys176	Ser214	Glu217	Arg229	-----	-----	-----
P2	Ser173	Lys175	Asn213	Glu216	Lys228	-----	-----	-----
Fragmin	Gly172	Lys174	Gly212	Glu215	Glu227	Glu231	-----	-----

3.2 Gelsolin-verwandte Proteine im Kaumagen

Hinsichtlich der Enzymausstattung und der Mengenverteilung der Proteine des kontraktiven Apparates unterscheidet sich der Kaumagen vom Hautmuskelschlauch (Carlhoff, 1988). Im folgenden Kapitel wird untersucht, inwieweit auch die Expression der EWAM-Isoformen in den beiden muskulösen Organen Hautmuskelschlauch und Kaumagen voneinander abweicht.

3.2.1 Aufreinigung der EWAM-Fractionen aus dem Kaumagen

Zunächst wurde der Rohextrakt des Kaumagens nach Dialyse und Ultrazentrifugation chromatographisch aufgetrennt, um die potentiell verschiedenen EWAM-Isoformen voneinander zu trennen. Exemplarisch wird in **Abb. 3.14** eine chromatographische Auftrennung dargestellt. Der Extrakt der Kaumagen von 100 Würmern wies 66mg Protein auf und besaß eine Aktivität von 79% mit 0,9mg Protein. Aus dieser Aktivität und der eingesetzten Proteinmenge lässt sich abschätzen, dass der Gehalt an Gelsolin-verwandten Proteinen im Kaumagen in einem vergleichbaren Bereich liegt wie der des Hautmuskelschlauchs (dort z. B.: 89% Aktivität mit 2mg Protein). Zunächst wurde mit 4 Säulenvolumen bei 40mM KCl eluiert, anschließend mit einem Gradienten bis 250mM KCl innerhalb von 10 Säulenvolumen. Auf diese Weise konnten zwei Aktivitätspeaks vollständig getrennt werden, wobei der erste mit etwa 90mM KCl und der zweite mit etwa 200mM KCl eluierte (**Abb. 3.14**). Die Peaks besaßen eine maximale Aktivität von etwa 40 bzw. 30% mit 0,44 bzw. 0,48mg Protein. Diese beiden EWAM-Varianten scheinen in etwa der gleichen Menge im Kaumagen vorzuliegen, da die Flächen der beiden Aktivitätspeaks ungefähr die gleiche Größe besitzen.

Beide Proteinfractionen weisen im SDS-Gel das gleiche Laufverhalten wie EWAM-P2 und EWAM-P3 des Hautmuskelschlauchs auf. Auch immunologisch verhalten sie sich gleich: Beide lassen sich mit anti-Fragmin- und monoklonalem anti-P2-Antikörper anfärben (**Abb. 3.15**).

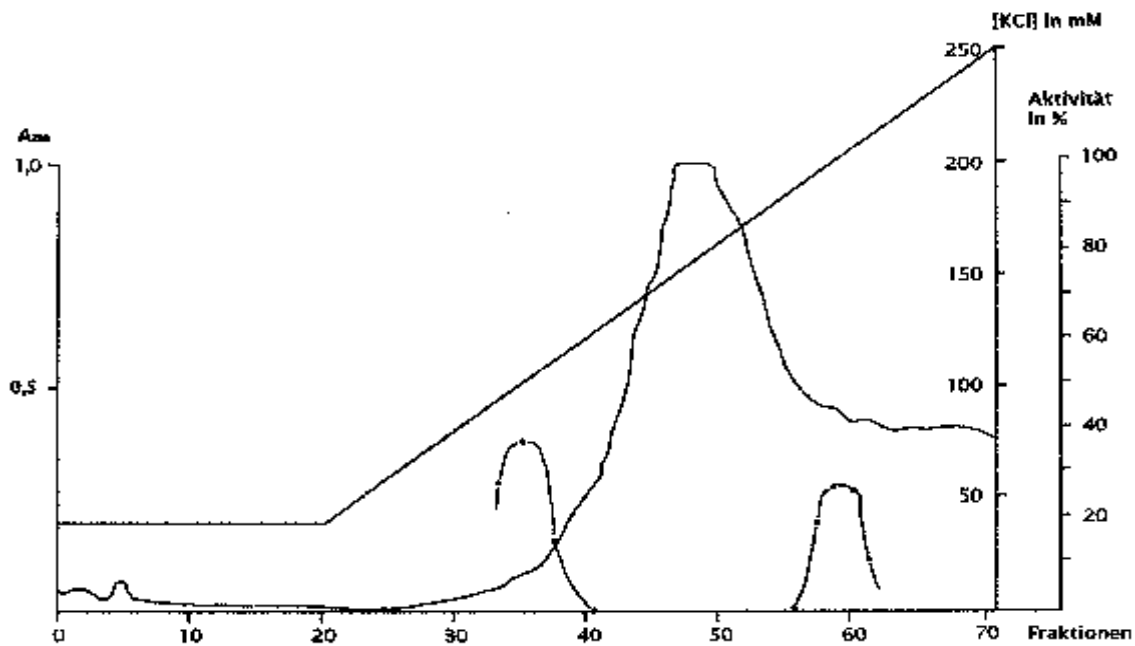


Abb. 3.14: Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sepharose CI-6B (Säule: $5,3\text{cm}^2 \times 5,8\text{cm}$) des Extrakts aus den Kaumägen von 100 Regenwürmern zur Isolierung der Isoformen des Gelsolin-artigen Proteins. Zwei unterschiedliche Modulatorfraktionen konnten eluiert werden mit ca. 400ml eines KCl-Gradienten von 40 bis 250mM bei einer Durchflußrate von 0,5ml/min. Je 200 μl der Fraktionen wurden auf ihre Aktivität, d. h. auf ihre Fähigkeit, die Viskosität von F-Actin zu erniedrigen, getestet. Die aktiven Fraktionen (Fraktionsgröße 5ml) wurden vereinigt.

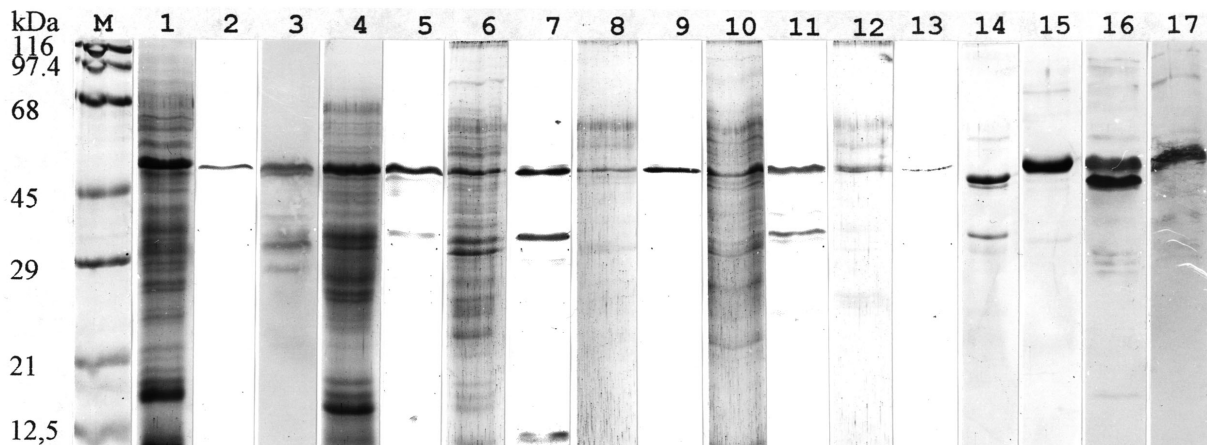


Abb. 3.15: SDS-PAGE und immunologische Charakterisierung der beiden Aktivitätspeaks des Kaumagens. (M): Molekulargewichtsstandard, (1): Kaumagen-Extrakt, Coomassie-Färbung, (2): Blot von (1), anti-Fragmin-gefärbt, (3): Blot von (1), anti-P2-gefärbt, (4): 80%-AMS-Pellet des Kaumagen-Extrakts, Coomassie-Färbung, (5): Blot von (4), anti-Fragmin-gefärbt, (6): erster Peak der DEAE-Elution (Kaumagen), Coomassie-Färbung, (7): Blot von (6), anti-Fragmin-gefärbt, (8): erster Peak der DEAE-Elution (Kaumagen) nach Gelfiltration, Coomassie-Färbung, (9): Blot von (8), anti-Fragmin-gefärbt, (10): zweiter Peak der DEAE-Elution (Kaumagen), Coomassie-Färbung, (11): Blot von (10), anti-Fragmin-gefärbt, (12): zweiter Peak der DEAE-Elution (Kaumagen) nach Gelfiltration, Coomassie-Färbung, (13): Blot von (12), anti-Fragmin-gefärbt, (14): P1 (Hautmuskelschlauch), Coomassie-Färbung, (15): P2 (Hautmuskelschlauch), Coomassie-Färbung, (16): Blot einer Mischung von P1 und P2, anti-Fragmin-gefärbt, (17): Blot wie (16), anti-P2-gefärbt

3.2.2 Zuordnung der isolierten EWAM-Fraktion zu den Aktivitätspeaks des Hautmuskelschlauchs

Die Modulator-Isoformen im Kaumagen lassen sich, wie dargestellt, weder im SDS-Gel noch immunologisch von EWAM-P2 und P3 des Hautmuskelschlauches unterscheiden. Die einzige Unterscheidungsmöglichkeit mit den vorhandenen Untersuchungsmethoden ist also das verschiedene Elutionsverhalten in der Ionenaustauscher-Chromatographie. Aus diesem Grunde wurden DEAE Cl-6B-Säulen mit nur 3ml Volumen nacheinander unter Einhaltung identischer Versuchsbedingungen und derselben Elutionsbedingungen mit gereinigtem EWAM-P2 und -P3 aus Hautmuskelschlauch und den gesammelten Fraktionen der Kaumagen-Aktivitätspeaks aus der ersten DEAE-Chromatographie beladen (**Abb. 3.16**). Der erste Kaumagen-Peak entspricht dem dritten Hautmuskelschlauch-Aktivitätspeak, also EWAM-P3: Sie eluieren beide zwischen 80-90mM KCl (**Abb. 3.16 (a) und (b)**), während P2 sehr viel früher, bei etwa 40mM KCl eluiert (**Abb. 3.16 (a)**). Wenn, in einem anderen Versuch, der P2 des Hautmuskelschlauches mit dem Extrakt aus dem Kaumagen gemischt wird, eluieren die Aktivitätsspeaks voneinander getrennt (**Abb. 3.16 (c)**). **Abb. 3.16 (c)** zeigt, dass der zweite Kaumagen-Aktivitätspeak eine bis jetzt unbekannte Variante des EWAM darstellt, die EWAM-P4 genannt werden soll. Sie eluiert klar getrennt von den anderen erst sehr spät, bei hohen KCl-Konzentrationen.

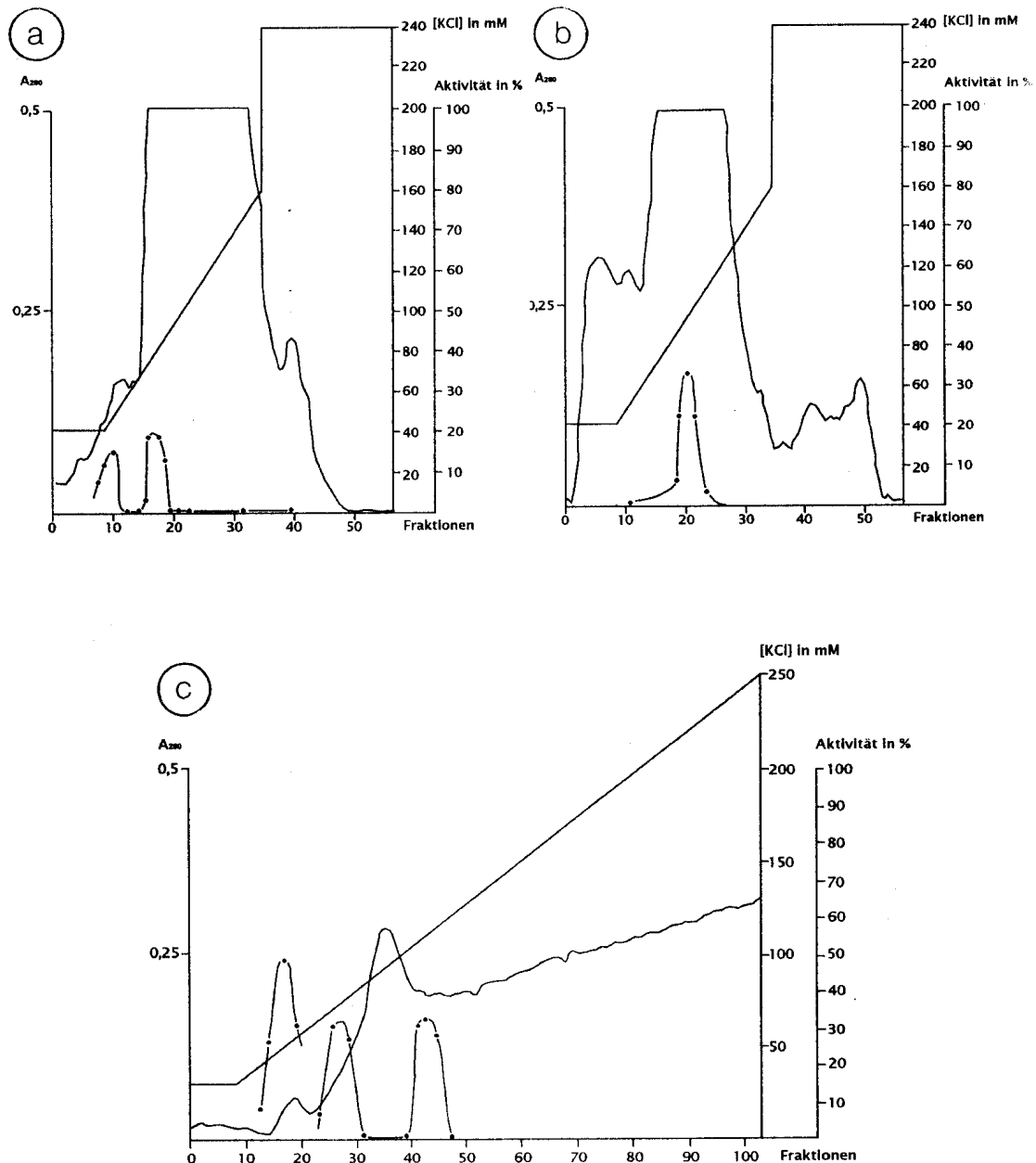


Abb. 3.16: Zuordnung der Kaumagen-EWAM-Fractionen zu den Isoformen des Hautmuskelschlauchs EWAM-P2 und EWAM-P3 durch Verwendung einer 3ml DEAE-Sepharose CI-6B-Säule und Einhaltung identischer Versuchsbedingungen. Gradient: 3 Säulenvolumen (incl. Probenvolumen) konstant 40mM KCl, 10 Säulenvolumen bis 160mM, 5 Säulenvolumen mit 400mM, dann Spülen mit 5 Säulenvolumen 40mM KCl als Vorbereitung für den nächsten Lauf; Durchfluss: 0,4ml/min, Fraktionsgröße: 1,2ml. (a): Eich-Lauf mit einer Mischung aus je 150µg EWAM-P2 und EWAM-P3. (b): 0,5mg des ersten Aktivitätspeaks des Kaumagens: Das Elutionsverhalten entspricht EWAM-P3. (c) Mischung aus je 0,5mg EWAM-P2 des Hautmuskelschlauchs, des ersten und des zweiten Kaumagen-Aktivitätspeaks: Alle drei Isoformen eluieren getrennt voneinander.

3.2.3 RT-PCR mit Kaumagen-RNA

Mit Hilfe der RT-PCR können Aussagen darüber gemacht werden, welche RNA in einem Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribiert wird und in begrenztem Maße auch

über die Menge dieser RNA. Die auf Proteinebene gewonnenen Ergebnisse lassen sich also auf Nukleotidebene kontrollieren. Durch das Design von Primern, die ausschließlich an cDNA, die für P1 oder P2 codiert, hybridisieren kann, aber nicht an die der jeweils anderen Isoform, sollte also eine getrennte Amplifikation von P1- oder P2-Fragmenten möglich sein. Bei der RT-PCR mit Kaumagen-cDNA mit Primern, die eigentlich für die zweite Isoform des EWAM hergestellt worden waren, konnten jeweils Fragmente mit Längen amplifiziert werden, die für P2-Produkte zu erwarten gewesen wären (**Abb. 3.17, Spuren (1) bis (10)**). RNA für P2 ist aber im Kaumagen gar nicht zu erwarten, wie die Versuche auf Proteinebene gezeigt haben. Es ist also anzunehmen, dass alle Primer mit der cDNA von P3 hybridisieren können. Das bedeutet, dass EWAM-P2 und die Modulatoren des Kaumagens neben ihrer immunologischen Ähnlichkeit auch auf der Nukleotidebene sehr ähnlich sein müssen, worauf auch die Hybridisierung der P2-Sonde im Northern-Blot hinweist (s. u.). Die RT-PCR mit P1-spezifischen Primern hingegen liefert kein Amplifikat (**Abb. 3.17, Spur (11)**).

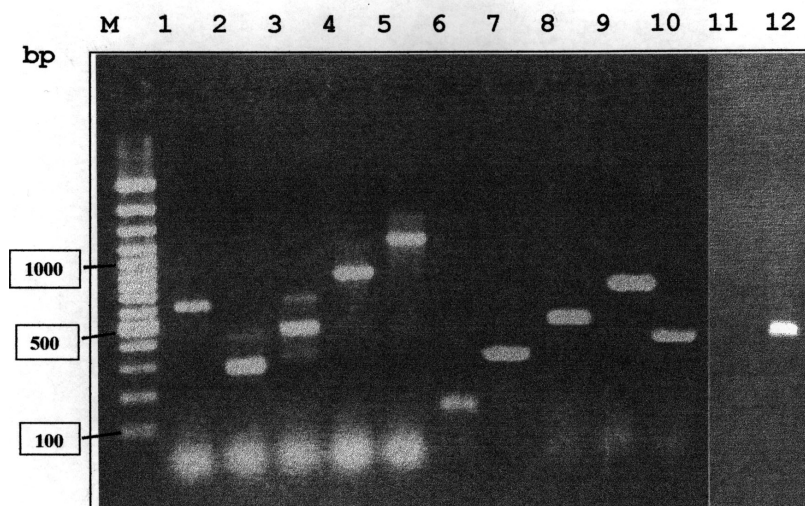


Abb. 3.17: RT-PCR mit Kaumagen-cDNA, (1) bis (10) mit P2-spezifischen Primern. M = 100bp-Leiter. Amplifikation mit folgenden Primern: (1): SenseP2S1- und anti-FILD-Primer; (2): SenseP2S1- und anti-GREEL-Primer; (3): SenseP2S1- und anti-FENGL-Primer; (4): SenseP2S1- und RevP2S2-Primer; (5): SenseP2S1- und RevP2S3-Primer; (6): KIWRI- und anti-GREEL-Primer; (7): KIWRI- und anti-FENGL-Primer; (8): KIWRI- und anti-FILD-Primer; (9): KIWRI- und REVP2S2-Primer; (10): GREEL- und anti-FILD-Primer; (11): P1-spezifische Primer 40p und 43p; (12): Actin-spezifische Primer ACT U235 und ACT L 667 (Sequenzen der Primer: siehe Kapitel 2.4.3).

3.2.4 Gelsolin-verwandte Proteine in Spermienstadien

Um Nicht-Muskelzellen hinsichtlich ihrer Isoformen zu untersuchen, wurden Spermienstadien ausgewählt. Spermienstadien wurden eingesetzt, da sie zum einen recht leicht aus dem Wurm zu isolieren sind, besser als beispielsweise Bauchmark oder Chloragog. Zum anderen sind die Stadien der Spermatogenese interessant, da sie im Laufe ihrer Entwicklung einen starken Formenwechsel durchmachen. Wie in amöboid beweglichen Zellen ist auch hier eine wichtige Funktion des Actin-Cytoskeletts zu erwarten und damit eine Beteiligung des Actin-bindenden Proteins EWAM.

3.2.5 Aufreinigung von EWAM aus den Samenblasen des Regenwurms

Wie bei der Präparation des Hautmuskelschlauchs und des Kaumagens wird zunächst ein Überblick über die Vielfalt der EWAM-Isoformen mit Hilfe einer chromatographischen Auftrennung erreicht.

Es wurden jeweils die Samenblasen von 100 Tieren präpariert. Die Organe besaßen ein Nassgewicht von ca. 6g. Das Protein des Rohextrakts wurde wie üblich gefällt, indem die Lösung durch Zugabe von Ammoniumsulfat auf eine Sättigung von 80% gebracht wurde. Dies gelang stets nur unzureichend, da der Überstand stark getrübt blieb. **Abb. 3.18** gibt das Elutionsprofil der Chromatographie einer Präparation sowie überlagert die Aktivitäten der Fraktionen exemplarisch wieder. Nach der Dialyse und Ultrazentrifugation konnten 34mg Protein gewonnen werden, die auf eine DEAE Cl-6B-Säule mit 10ml Volumen aufgetragen wurden. Der Extrakt besaß eine Aktivität von 10,8% mit 0,95mg Protein.

Eine einzige Isoform des EWAM eluierte mit ca. 40mM KCl. Die maximale Aktivität dieses Peaks betrug 11,7% mit 45µg Protein. Es konnten aus den aktiven Fraktionen ca. 0,9mg Protein nach Fällung mit Ammoniumsulfat gewonnen werden.

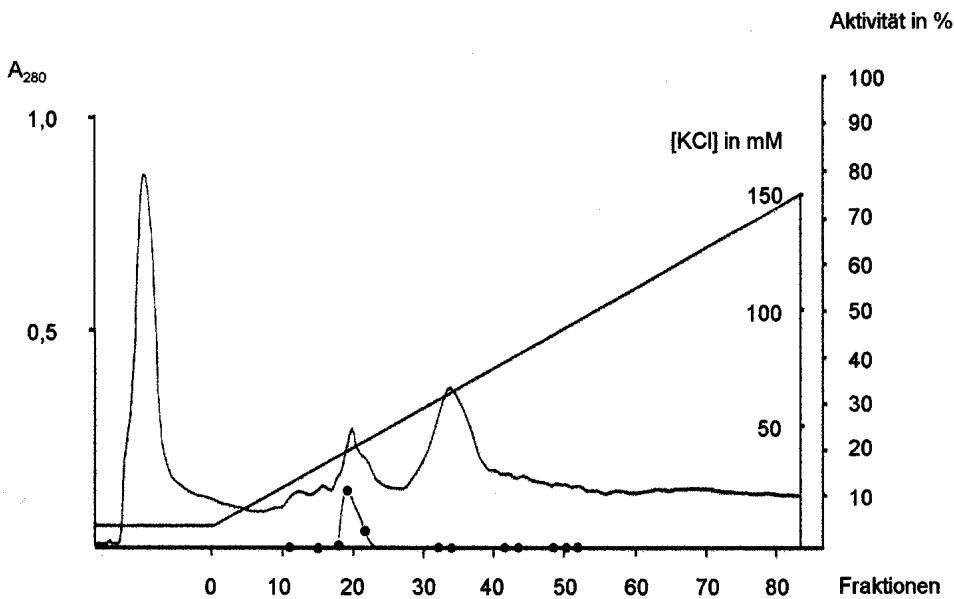


Abb. 3.18: Elutionsprofil der Anionenaustauscher-chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B ($5,3\text{cm}^2 \times 2\text{cm}$) des Extrakts aus den Samenblasen von 100 Regenwürmern zur Isolierung des Gelsolin-artigen Proteins. Ein Aktivitätspeak konnte eluiert werden mit ca. 200ml eines KCl-Gradienten von 10 bis 150mM bei einer Durchflussrate von 0,4ml/min.

Je 200 μl der Fraktionen wurden auf ihre Aktivität, d. h. auf ihre Fähigkeit, die Viskosität von F-Actin zu erniedrigen, getestet. Aktive Fraktionen (Fraktionsgröße 2,4ml) wurden vereinigt.

3.2.6 Die hauptsächlich in den Samenblasen vorkommende EWAM-Isoform ist EWAM-P1

Zur weiteren Charakterisierung wurden verschiedene Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und ihr Laufverhalten und ihre Anfärbbarkeit mit Antikörpern mit denen der EWAM-Isoformen des Hautmuskelschlauchs verglichen. In Immunoblots des Rohextrakts der Samenblasen und der aktiven Fraktionen der Ionenaustauscher-Chromatographie lässt sich mit dem anti-Fragmin-Antikörper eine Bande anfärben, die auf der gleichen Höhe läuft wie EWAM-P1 des Hautmuskelschlauchs (**Abb. 3.19, Spur (2), (5)**). Der anti-P2-Antikörper färbt diese Bande nicht an (**Abb. 3.19, Spur (3), (6)**). In einer Fraktion ohne messbare Aktivität lässt sich hingegen mit dem anti-P2-Antikörper, wenn auch nur sehr schwach, eine Bande auf Höhe des EWAM-P2 des Hautmuskelschlauchs anfärben (**Abb. 3.19, Spur (9)**).

Wie schon bei der Untersuchung der EWAM-Isoformen des Kaumagens wird durch Vergleich des Elutionsverhaltens eine Aussage über die Identität der isolierten EWAM-Isoform ermöglicht. Als Eichung wurden 0,5mg P1 aus dem Hautmuskelschlauch über die kleine DEAE-Säule eluiert. Diese Proteinfraction war gemeinsam mit dem Samenblasen-EWAM dialysiert worden und wurde in dem selben Volumen aufgenommen (0,7ml Startpuffer). Anschließend wurden auf die gleiche Säule 0,9mg des Samenblasen-EWAM aufgetragen. Der Modulator der Samenblasen zeigte hierbei das gleiche Elutionsverhalten wie P1 des Hautmuskelschlauchs (**Abb. 3.20**). Der eigenartige Verlauf der Aktivitätskurve ist wahrscheinlich auf Messungenauigkeiten zurückzuführen.

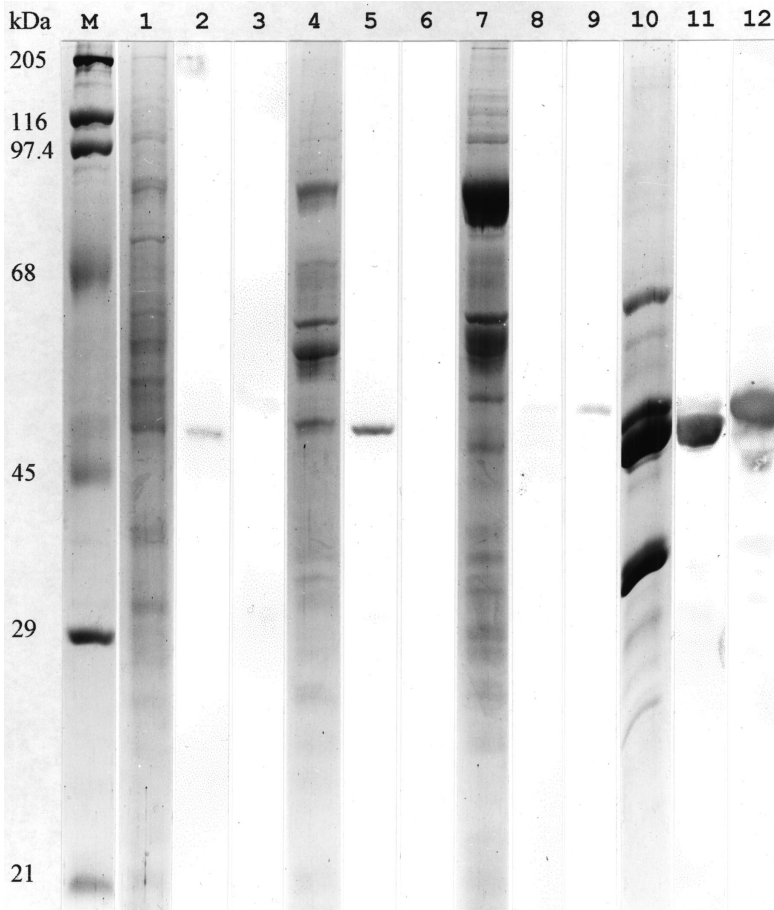


Abb. 3.19: SDS-PAGE und immunologische Charakterisierung des Aktivitätspeaks der Samenblasen. (M): Molekulargewichtsstandard, (1): dialysierter und ultrazentrifugierter Extrakt, Coomassie-Färbung, (2): Blot von (1), anti-Fragmin-gefärbt, (3): Blot von (1), anti-P2-gefärbt, (4): aktive Fraktion der Anionenaustauscher-Chromatographie, Coomassie-Färbung, (5): Blot von (4), anti-Fragmin-gefärbt, (6): Blot von (4), anti-P2-gefärbt, (7): nicht-aktive Fraktion, Coomassie-Färbung, (8): Blot von (7), anti-Fragmin-gefärbt, (9): Blot von (7), anti-P2-gefärbt, (10): Mischung aus P1 und P2 (Hautmuskelschlauch), Coomassie-Färbung, (11): Blot von (10), anti-Fragmin-gefärbt, (12): Blot von (10), anti-P2-gefärbt

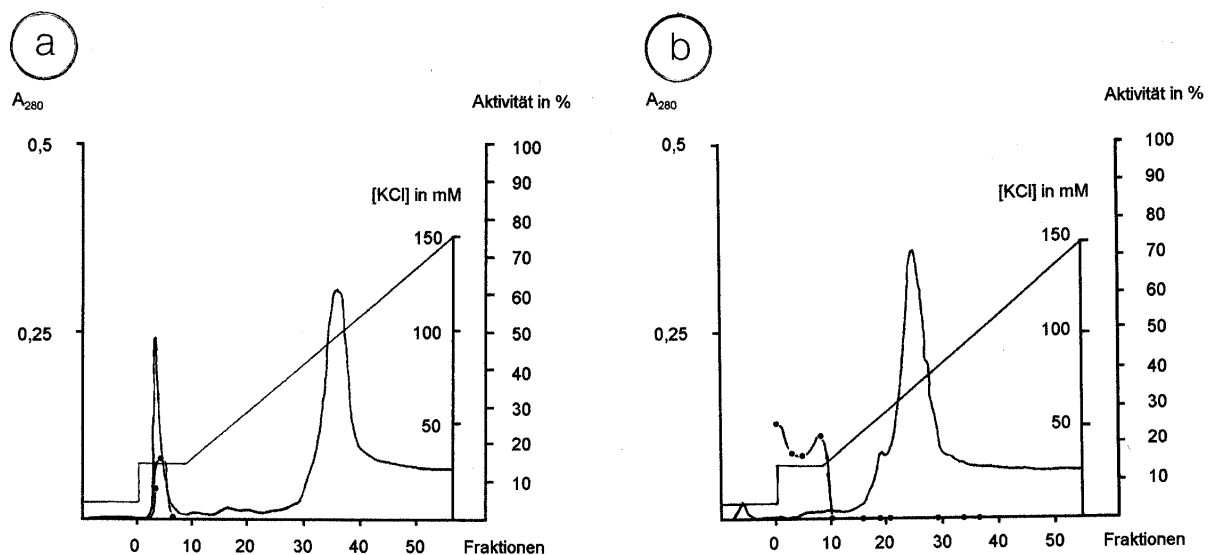


Abb. 3.20: Zuordnung der Samenblasen-EWAM-Fraktion zu der Isoform des Hautmuskelschlauchs EWAM-P1 durch Verwendung einer 3ml DEAE-Sepharose-Cl-6B-Säule und Einhaltung identischer Versuchsbedingungen. Gradient: 3 Säulenvolumen (incl. Probenvolumen) konstant 30mM KCl, 10 Säulenvolumen bis 150mM, dann Spülen mit 5 Säulenvolumen 10mM KCl als Vorbereitung für den nächsten Lauf; Durchfluss: 0,4ml/min, Fraktionsgröße: 1,2ml. (a): Eich-Lauf mit 0,5mg EWAM-P1 aus dem Hautmuskelschlauch. (b): 0,9mg des Aktivitätspeaks der Samenblasen: Das Elutionsverhalten entspricht EWAM-P1.

3.2.7 RT-PCR mit Samenblasen-RNA

Analog zu den Versuchen mit Kaumagen-RNA wurden auch mit RNA der Samenblasen RT-PCRs durchgeführt, um Aussagen über die Expression der RNA, die für P1 oder P2 (und P3, P4) codiert, machen zu können. Aus Samenblasen isolierte RNA diente in RT-PCRs mit P1- und P2-spezifischen Primern als Template. Mit den P1-spezifischen Primern ließ sich ein starkes Amplifikat produzieren, wogegen die PCR-Produkte der P2-spezifischen Primer nur sehr schwach im Agarosegel sichtbar ist (**Abb. 3.21**). Es entstehen jeweils Doppelbanden, da der anti-FILD-Primer zweimal in beiden Sequenzen hybridisiert.

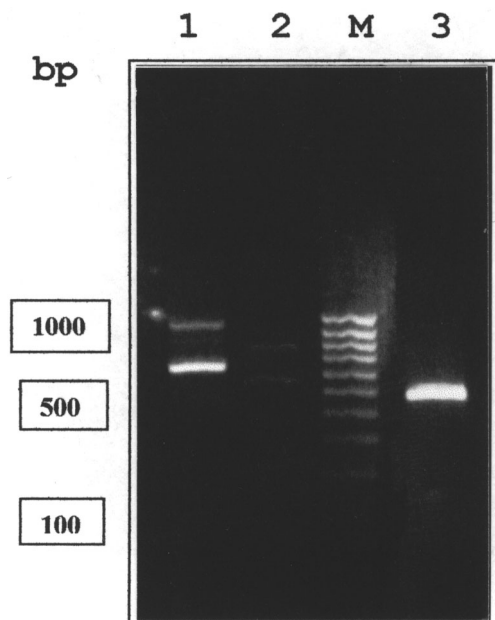


Abb. 3.21: RT-PCR mit Samenblasen-cDNA. (1) mit P1-spezifischen Primern 40p und anti-FILD, (2) mit P2-spezifischen Primern GREEL und anti-FILD, (3) mit Actin-spezifischen Primern ACT U235 und ACT L 667, (M) 100bp-Leiter.

3.2.8 Die Sequenzierung eines RT-PCR-Fragments bestätigt die Identität des Samenblasen-EWAM mit P1

Die Identität des isolierten Proteins lässt sich durch die Sequenzierung des vorherrschenden Actin-Modulators oder der vorherrschenden mRNA absichern. Ein DNA-Fragment, das durch RT-PCR mit den P1-spezifischen Primern 40p und anti-FILD amplifiziert worden war, wurde daher sequenziert. Das sequenzierte Fragment war vollkommen identisch mit der Sequenz, die für EWAM-P1 des Hautmuskelschlauchs bekannt ist und entsprach dort Base 163 bis Base 504.

3.2.9 Northern-Blots der Gesamt-RNA der untersuchten Gewebe

Ähnlich wie mit Hilfe der RT-PCR lässt sich durch Hybridisierung eines Northern-Blots mit spezifischen Sonden eine Aussage über die Menge der transkribierten mRNA zu einem Zeitpunkt in einem Gewebe machen. Von der Stärke der Reaktion kann jedoch nicht direkt auf die Menge an zu erwartendem Protein geschlossen werden, denn die Proteinmenge wird durch weitere Faktoren, wie z. B. der Stabilität der mRNA, beeinflusst. Eine Untersuchung der RNA-Verteilung in den drei untersuchten Geweben stellt also eine Ergänzung der biochemischen Ergebnisse dar. Weiterhin können Hinweise erhalten werden, ob das Auftreten von zwei Proteinvarianten artifiziell zustande kam, denn dann ist nur die Anfärbung einer mRNA zu erwarten. Werden allerdings zwei mRNA-Populationen markiert, dann kann auch mit zwei unterscheidbaren Proteinvarianten gerechnet werden.

Für die Untersuchung der Gewebe-spezifischen Expression der EWAM-Isoformen auf RNA-Ebene wurde die Gesamt-RNA von Hautmuskelschlauch, Kaumagen und Samenblasen wie in Material und Methoden beschrieben isoliert. Es wurden jeweils 20µg Gesamt-RNA pro Spur aufgetrennt und nach dem Transfer auf der Nylon-Membran fixiert. Die Northern Blots wurden mit ³²P-Cytosin-markierten DNA-Sonden, die durch PCRs mit entweder EWAM-P1- oder EWAM-P2-spezifischen Primern hergestellt worden waren, hybridisiert. Die resultierenden Amplifikate waren für P1 ca. 1050bp und für P2 ca. 600bp lang und wurden im random-primed-Verfahren markiert. Die **Abb. 3.22** zeigt die Ethidiumbromid-Färbung des Gels und die Autoradiographie. Das Ethidiumbromidgefärbte Gel zeigt deutlich die 18S Bande der ribosomalen RNA und lässt daher auf die Integrität der RNA schließen. Wie für viele Wirbellose beschrieben (Herlan et al., 1981, Khandjian und Meric, 1986) ist offenbar auch beim Regenwurm die 28S rRNA im zentralen Bereich entweder bereits *in vivo* oder erst durch die Präparation verursacht in zwei Teile zerbrochen. Bei der Denaturierung der RNA werden die Teilstücke voneinander getrennt, und ihr Laufverhalten gleicht dann der der 18S rRNA so sehr, dass nur eine Bande im Gel erkennbar ist. Ebenfalls lässt sich eine ungefähr mengengleiche Auftragung der drei Gesamt-RNA-Fractionen erkennen. Die Sonden sind sehr Isoform-spezifisch, denn sie zeigen kaum Kreuzreaktionen mit der jeweils anderen Isoform. Sie sind daher als Sonden zur Detektion der Expression der verschiedenen Isoformen geeignet. Es zeigt sich, dass auch auf mRNA-Ebene eine deutliche gewebespezifische Expression der EWAM-Isoformen stattfindet.

Bei der Hybridisierung der RNA des Hautmuskelschlauchs mit der P1-Sonde färbte sich in der Spur der Gesamt-RNA des Hautmuskelschlauchs eine starke Bande an, die etwas über

der 2027 Nukleotid-Bande des Markers liegt (**Abb. 3.22**). Mit der Sonde, die durch Amplifikation mit für EWAM-P2 spezifischen Primern erhalten worden war, färben sich in der Spur der Hautmuskelschlauch-RNA zwei Banden an. Die im Agarosegel weiter laufende und stärker gefärbte RNA-Bande ist etwa 1300 Nukleotide lang, die größere mRNA ist etwa 1500 Nukleotide lang. Es ist zu beachten, dass diese Größenangaben relativ ungenau sind, da die rRNA an ähnlicher Stelle im Gel zu finden ist, wie ein Vergleich mit dem Ethidiumbromid-gefärbten RNA-Gel in **Abb. 3.22** zeigt. Die in weitaus größerer Menge vorkommende rRNA verdrängt und verschiebt die mRNA.

Bei der Hybridisierung des Northern-Blots der RNA des Kaumagens mit der EWAM-P1-Sonde färbte sich keine RNA-Bande an (**Abb. 3.22**). Mit der EWAM-P2-spezifischen Sonde konnten jedoch zwei Banden angefärbt werden, wobei eine auf der gleichen Höhe wie die untere auf die gleiche Weise angefärbte Hautmuskelschlauch-Bande läuft (mit ca. 1300 Nukleotiden Länge), während die zweite eine nicht im Hautmuskelschlauch zu findende Bande darstellt mit etwa 1700 Nukleotiden Länge. Es läßt sich also bei gemeinsamer Betrachtung der Ergebnisse auf Protein- und RNA-Ebene schließen, dass die unterste angefärbte Bande des Northern-Blots (1300 Nukleotide) die mRNA für EWAM-P3 darstellt, da beide, sowohl Protein als auch mRNA, sowohl im Hautmuskelschlauch als auch im Kaumagen vorkommen. Die mRNA von EWAM-P2 müsste dann folglich in der mittleren Bande der mit der P2-Sonde anfärbbaren RNA zu finden sein (1500 Nukleotide), während EWAM-P4 die längste mRNA besitzt (1700 Nukleotide).

Diese Folgerung setzt wiederum voraus, dass die P2-Sonde nicht zwischen den mRNAs für EWAM-P2, -P3 und -P4 unterscheiden kann sondern mit allen reagiert. Das ist plausibel, da bereits eine große Ähnlichkeit der Proteine und mRNAs gezeigt werden konnte: Es konnten 1.) immunologisch keine Unterschiede zwischen den Proteinen festgestellt werden und 2.) konnten die eigentlich für P2 hergestellten spezifischen Primer mit der cDNA des Kaumagens, der ja nur P3 und P4 enthält, hybridisieren.

Merkwürdig und nicht mit den auf Proteinebene und durch RT-PCR erhaltenen Ergebnissen in Einklang zu bringen sind die Ergebnisse der Hybridisierung der RNA aus den Samenblasen, die allerdings, im Gegensatz zu den anderen Hybridisierungen, nur einmal vorgenommen worden ist. Im Northern-Blot mit Samenblasen-Gesamt-RNA (**Abb. 3.22**) lässt sich durch Hybridisierung mit der anti-P1-Sonde nur eine schwache, mit der anti-P2-Sonde jedoch eine starke Markierung erreichen. Das bedeutet, dass mehr P2(-P3, -P4)-mRNA gegenüber P1-mRNA in den Spermienstadien vorhanden war. Dies widerspricht den Ergebnissen auf Proteinebene und auch den Ergebnissen der RT-PCR, bei der auch,

wie bei der Hybridisierung des Northern-Blots, die Mengenverhältnisse der RNA-Populationen untersucht werden. Etwas scheint also bei der Isolierung der RNA, bei der Trennung im Gel oder bei der Hybridisierung nicht ordnungsgemäß verlaufen zu sein. Ein Hinweis hierauf könnte die starke Färbung der Geltasche des Ethidiumbromid-gefärbten Gels sein. Es ist jedoch nicht einzusehen, warum ausgerechnet bevorzugt die mRNA, die für P1 codiert, in der Tasche zurückgeblieben sein sollte. Die Hybridisierung mit der EWAM-P2-Sonde lässt sich so interpretieren, dass mehr EWAM-P3- als EWAM-P2-mRNA in den Samenblasen vorkommt und die mRNA für EWAM-P4 beinahe überhaupt nicht exprimiert wird.

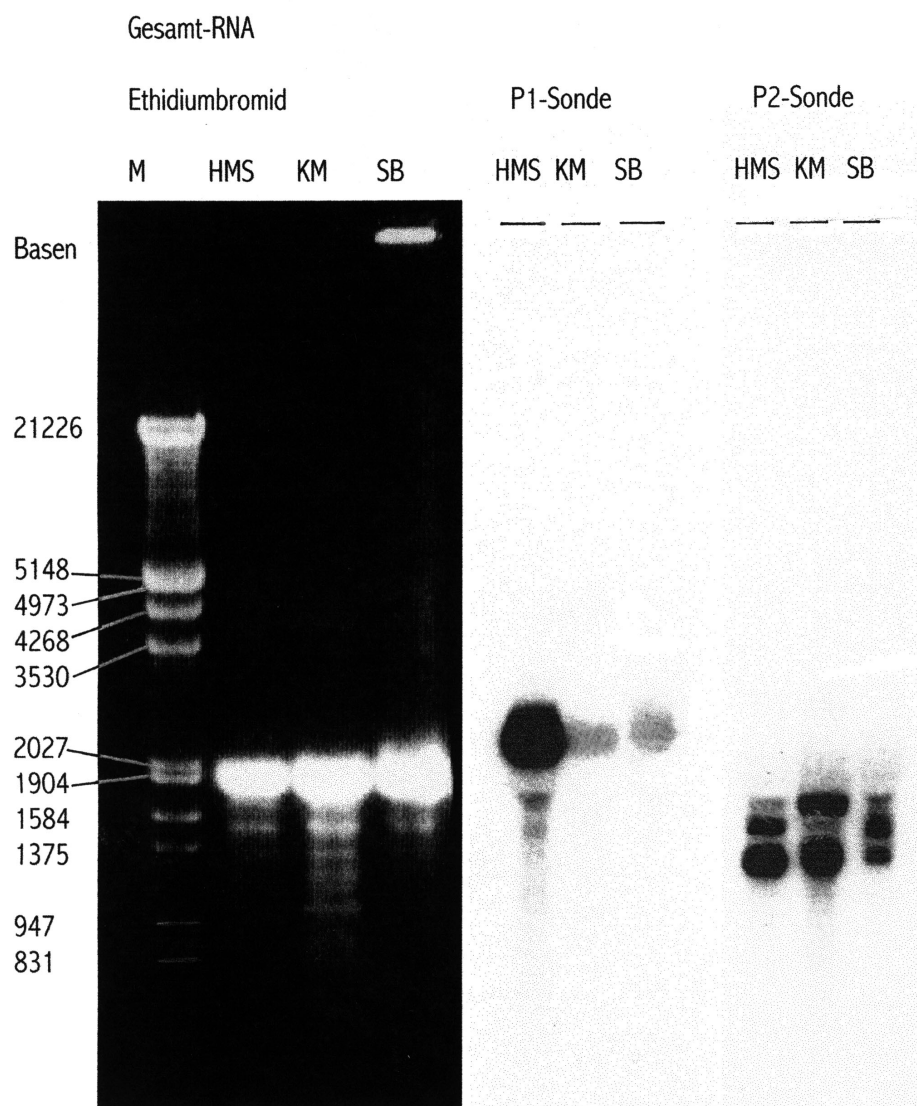


Abb. 3.22: Hybridisierung des Northern Blots der Gesamt-RNA von Hautmuskelschlauch (HMS), Kaumagen (KM) und Samenblase (SB) mit EWAM-P1- (mittlere drei Spuren) und -P2-spezifischen (rechte drei Spuren), ^{32}P -Cytosin-markierten Sonden. M = Marker, λ -DNA (gedaut mit EcoRI und HindIII)

3.3 Untersuchungen mit genomischer DNA:

P1 und P2 werden von verschiedenen Genen codiert

Die bishen bekannten Varianten der Vertebraten-Gelsoline (Kwiatkowski et al., 1986, Vouyiouklis und Brophy, 1997) und des Gelsolins aus *Drosophila* (Heintzelman et al., 1993, Stella et al., 1994) werden von einem einzigen Gen codiert, die jeweilige mRNA wird durch die Benutzung unterschiedlicher Transkriptions-Initiations-Stellen und Spleißen hergestellt. Nur für Fragmin, das in den Isoformen FragminA und FragminP entwicklungsabhängig exprimiert wird, ist die Existenz von zwei verschiedenen Genen bekannt, die dann eine Gen-Familie darstellen (T`Jampens et al., 1997). Bereits aufgrund der sehr kleinräumigen Verteilung der identischen und nicht identischen Aminosäuren der beiden EWAM-Isoformen ist ihre Entstehung durch Spleißen einer mRNA, die von einem einzigen Gen abgelesen wird, sehr unwahrscheinlich. Eine Bestätigung der Vermutung, dass P1 von einem anderen Gen codiert wird als P2, wurde mit Hilfe der PCR mit genomischer DNA erbracht.

Ist das Produkt der PCR mit genomischer DNA ebenso so lang, als wenn cDNA als Template eingesetzt worden wäre, dann kann die DNA des Gens kein Intron enthalten. Es war jedoch zu erwarten, dass das Gen oder die Gene Introns enthalten, denn auch das Gen des Vertebraten-Gelsolins ist in Exons und Introns aufgebaut (Kwiatkowski et al., 1988).

Durch PCR mit genomischer DNA des Regenwurms mit P1- und P2-spezifischen Primern konnte ermittelt werden, dass die Gesamtlänge der codierenden Region auf DNA-Ebene von P1 ca. 2,1 kbp beträgt, während man eine Bande mit den P2-Primern erhält, die nur etwas länger als 1 kbp ist (**Abb. 3.23, Spuren (4) und (8)**). Das bedeutet, dass der für P1 codierende DNA-Abschnitt mindestens ein längeres Intron enthält, während ein DNA-Abschnitt, der für P2 (oder P3, oder P4) codiert, kein Intron enthält. Dies ist nur möglich, wenn P1 und P2 von verschiedenen Genen codiert werden. Mit semi-nested PCRs mit dem Voll-Längen-DNA-Abschnitt von P1 als Template und einem antisense-Primer, der 3`-seitig näher hybridisiert (anti-TEYK), ließ sich ein ebenso langes Fragment amplifizieren, als wenn cDNA als Template verwendet worden wäre (**Abb. 3.23, Spur (1)**). Wurde als Antisense-Primer jedoch anti-FILD verwendet, der 100bp 3`-seitig von anti-TEYK hybridisiert, ergaben sich Amplifikate (zwei, da anti-FILD zweimal hybridisiert), die jeweils etwa 550bp länger als erwartet waren (**Abb. 3.23, Spur (2)**). Ein Intron oder Introns müssen sich also zwischen Base 560 und 660 der cDNA befinden.

Neben den erwarteten Banden lassen mit den P2-Primern noch mehrere weitere, längere Banden amplifizieren (**Abb. 3.23, Spur (5)**). Es handelt sich hierbei vermutlich um PCR-Produkte der DNA-Abschnitte, die für die anderen P2-ähnlichen EWAM-Isoformen codieren. Eine Verstärkung durch Reamplifikation oder durch Einklonieren und eine anschließende Sequenzierung wären sehr lohnenswert, denn auf diese Weise ließen sich Informationen über die P2-ähnlichen Isoformen des EWAM gewinnen.

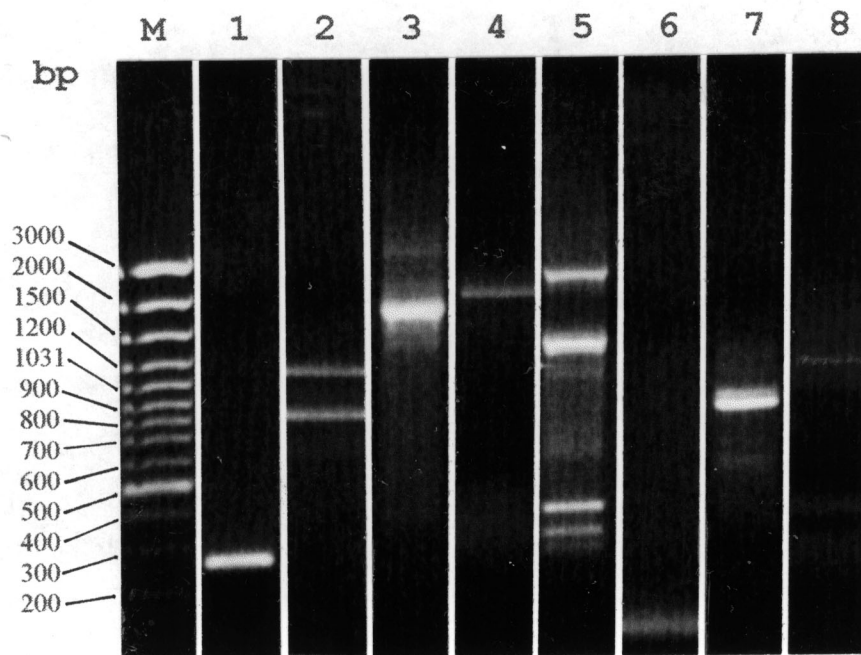


Abb. 3.23: PCR mit genomischer DNA. Spuren 1-4: P1-spezifische Primer, Spuren 5-8: P2-spezifische Primer. Angegeben werden jeweils die zur Amplifikation verwendeten Primer. In Klammern: erwartete Bande für DNA ohne Intron/tatsächlich Länge der Bande. M: 100bp-Marker, (1): P1(340Bp) und anti-TEYK (250bp/250bp), (2): P1(340Bp) und anti-FILD (FILD bindet zweimal, ca. 350bp und 680bp/900bp und 1250bp), (3): P1(340Bp) und 43p (850bp/1800bp), (4): 40p und 43p (1200bp/2100bp), (5): GREEL und anti-CPQRL als Beispiel für multiple Banden (330bp/ unterste Bande: 330bp), (6): FENGL und anti-CPQRL (160bp/160bp), (7): GREEL und RevP2S3 (900bp/900bp), (8): SenseP2S1 und RevP2S3 (1200bp/1200bp)

3.4 Lokalisation Gelsolin-verwandter Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz

Um Informationen über die Funktion von EWAM zu erhalten, wurden Gefrierschnitte oder auch Ausstriche mit Antikörpern gegen EWAM-P2 und Fragmin gefärbt. Eine Gegenfärbung mit anti-P1-Antikörpern war leider aufgrund starker Kreuzreaktionen auch des affinitätsgereinigten Antikörpers mit anderen Zellproteinen am Schnitt nicht möglich.

Die Fixierung des Gewebes nach der Kryomikrotomie oder der Samenblasen-Ausstriche mit 4% Formaldehyd oder 2% Glutaraldehyd führte zum Verlust der Antigenität des Modulators. Die Färbung mit dem anti-P2-Antikörper ergab in solchen Fällen eine ganz gleichmäßige Färbung des ganzen Gewebes oder der Spermienstadien. Eine Fixierung mit eiskaltem Aceton/Methanol hingegen führte zu einer besseren Haftung an den Objektträgern bei gleichzeitiger Erhaltung der Antigenität und damit der Anfärbungsmuster.

Bei einigen Präparaten wurde durch die zusätzliche Darstellung des Actins versucht zu prüfen, ob eine Kolokalisation von Modulator und Actin lichtmikroskopisch möglich ist, um eventuell Rückschlüsse auf die Funktionen des Modulators ziehen zu können. An den Anfang jedes Kapitels wird zunächst eine kurze histologische Übersicht über das Untersuchungsobjekt gegeben, um eine Beurteilung der Bilder zu vereinfachen.

3.4.1 Lokalisation von P2/P3 im Hautmuskelschlauch

Der Hautmuskelschlauch des Regenwurms besteht aus zwei Lagen von konzentrisch angeordneten Muskelschichten, denen nach außen eine Epidermis und die von ihr produzierte Kutikula aufgelagert ist. Die äußere Muskellage, die Ringmuskelschicht, ist dünn und besteht aus Muskelzellen, die tangential zur Längsachse des Wurms verlaufen. In der inneren, dickeren Muskelschicht, der Längsmuskelschicht, sind die Muskelzellen in Längsrichtung angeordnet. Nach innen schließt sich der Cölomraum an (Peters und Walldorf, 1986a, D'Haese, 1992). Die Muskelzellen sind mit ihrer Längsseite an bindegewebigen Septen fixiert, so dass im Querschnitt Bindegewebe-umgebene Rechtecke oder Kästchen sichtbar werden mit federartig angeordneten Muskelzellen. Antagonisten der Muskulatur des Hautmuskelschlauchs sind als Hydroskelett die Cölomflüssigkeit und die Kutikula. Peristaltische Bewegungen in Zusammenarbeit mit den Borsten ermöglichen die Fortbewegung und das Eingraben des Tieres.

Gefrierschnitte des Hautmuskelschlauchs wurden mit anti-P2-Antikörpern eine Stunde oder über Nacht inkubiert. Es ergab sich stets ein charakteristisches Färbungsmuster: Monoklonale anti-P2-Antikörper färben bei Gefrierschnitten des Hautmuskelschlauchs

bevorzugt die peripheren Bereiche des Ring- und Längsmuskels (**Abb. 3.24, (a)-(d)**). Bei einer stärkeren Vergrößerung der stark angefärbten Bereiche zeigt sich, dass die peripheren Muskelzellen nicht gleichmäßig stark angefärbt werden, sondern es ergibt sich ein Mosaik von unterschiedlich stark angefärbten Zellen. Einige Zellen bleiben sogar vollkommen ungefärbt (**Abb. 3.24, (c) und (d)**). Eine Inkubation mit anti-Fragmin-Antikörpern führte zu einer homogenen Färbung des gesamten Hautmuskelschlauchs ohne Bevorzugung spezieller Regionen. P2 ist aber nicht auf die peripheren Bereiche beschränkt. Immer ist auch eine, allerdings schwächere, Anfärbung der anderen Partien zu beobachten. Weiterhin ließen sich in RT-PCR-Experimenten mit P2-spezifischen Primern und mit der RNA der Muskelzellen aus dem proximalen Bereich Amplifikate produzieren (nicht abgebildet).

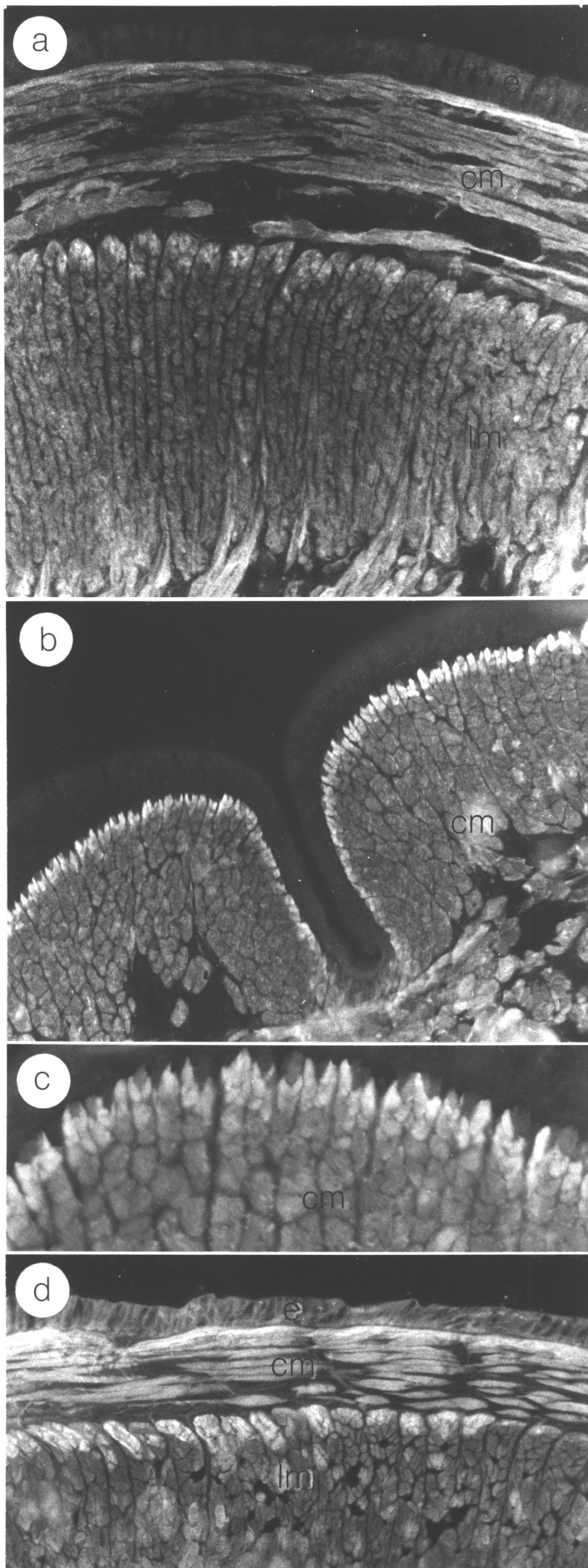


Abb. 3.24: Immunologische Färbung von Gefrierschnitten des Hautmuskelschlauchs mit anti-P2-Antikörpern. (a) Querschnitt des Hautmuskelschlauchs, 200x (b) Längsschnitt des Ringmuskels, 300x (c) stärkere Vergrößerung eines längs geschnittenen Ringmuskels, die mosaikartige stärkere Färbung einzelner Zellen wird sichtbar, 900x (d) Querschnitt des Längsmuskels mit mosaikartiger Färbung der peripheren Zellen, 350x. cm = Ringmuskel, e = Epidermis, lm = Längsmuskel

3.6.2 Enzymhistochemische Färbung von Gefrierschnitten des Hautmuskelschlauchs

Bereits D`Haese und Carlhoff (1987) konnten zeigen, dass die Inkubation der Gefrierschnitte des Hautmuskelschlauchs zum Nachweis der Succinatdehydrogenase eine Färbung besonders der peripheren oder distalen Zellen sowohl der Ring- als auch der Längsmuskelzellen (**Abb. 3.25 (a)**) bewirkt. Diese Zellen zeichnen sich folglich durch einen höheren Mitochondriengehalt aus, sie decken ihren Energiehaushalt also überwiegend über den Weg des Citratcyclus. Ein histochemischer Nachweis der Myosin- und Actomyosin-ATPase zeigte außerdem, dass diese Zellen vergleichsweise deutlich geringere Aktivitäten aufweisen. Sie sind daher sehr wahrscheinlich langsam kontrahierenden Zellen. Die zweite Isoform des EWAM ist also –zumindest im Hautmuskelschlauch- bevorzugt in langsam kontrahierenden Muskelzellen vorhanden (**Abb. 3.25 (b)**).

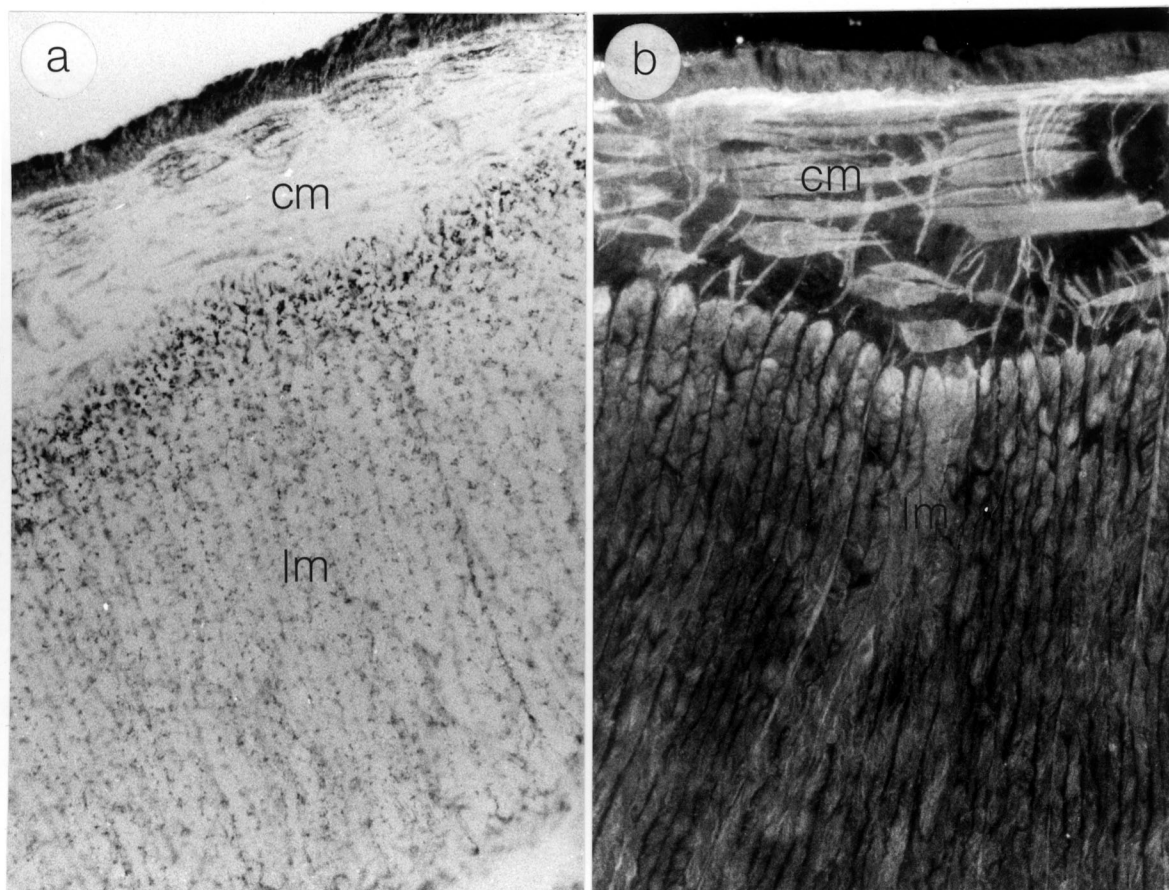


Abb. 3.25: Vergleich der immunologischen Färbung (a) des Hautmuskelschlauchs mit monoklonalen anti-P2-Antikörpern (ca. 150x) und (b) der enzymhistochemischen Färbung der Succinatdehydrogenase (ca. 200x)

3.6.3 Anfärbung von Gefrierschnitten des Kaumagens mit anti-P2-Antikörpern

Der Muskel- oder Kaumagen besteht aus einer dünnen äußeren Längsmuskelschicht, einer mächtigeren Ringmuskelschicht und einem Epithel, das zum Darmlumen hin von einer Kutikula begrenzt wird, die ständig vom Epithel sezerniert wird (Carlhoff, 1988, Peters und Walldorf, 1986 b). Der Kaumagen folgt als Sonderbildung des Darms auf den Kropf, der nächste Darmabschnitt ist der Mitteldarm. Mit der kräftigen Muskulatur wird die Nahrung durchmischt und zerrieben (Peters und Walldorf, 1986 a).

Bereits Carlhoff und D'Haese (1987) zeigten eine ähnliche Enzymausstattung und das Vorkommen der gleichen leichten Kette des Myosins im Kaumagen und in den peripheren Bereichen des Hautmuskelschlauchs. Da die Zuordnung der isolierten Gelsolin-verwandten Proteine zur Gruppe der P2-ähnlichen Isoformen bereits erfolgt war, sollte sich der gesamte Kaumagen mit anti-P2-Antikörpern stark anfärben lassen und wäre eine Bestätigung dafür, dass der Kaumagen auch hinsichtlich der Expression der EWAM-Isoformen den peripheren Bereichen des Hautmuskelschlauchs ähnlich ist.

Auf Gefrierschnitten, auf denen sowohl der Kaumagen als auch der Hautmuskelschlauch zu sehen ist, wird bei der Markierung mit dem monoklonalen anti-P2-Antikörper erkennbar, dass die Färbungsintensität des Kaumagens vergleichbar ist mit den peripheren Bereichen des Hautmuskelschlauchs (**Abb. 3.26 (a), (b)**). Auf manchen Schnitten war die gesamte äußere Längsmuskulatur sogar noch stärker angefärbt als die Ringmuskulatur des Kaumagens. Auch die Ring- und Längsmuskulatur des Mitteldarms, die weitaus schwächer ausgeprägt ist als die des Kaumagens, ist stark mit dem anti-P2-Antikörper anfärbbar (**Abb. 3.26 (d)**).

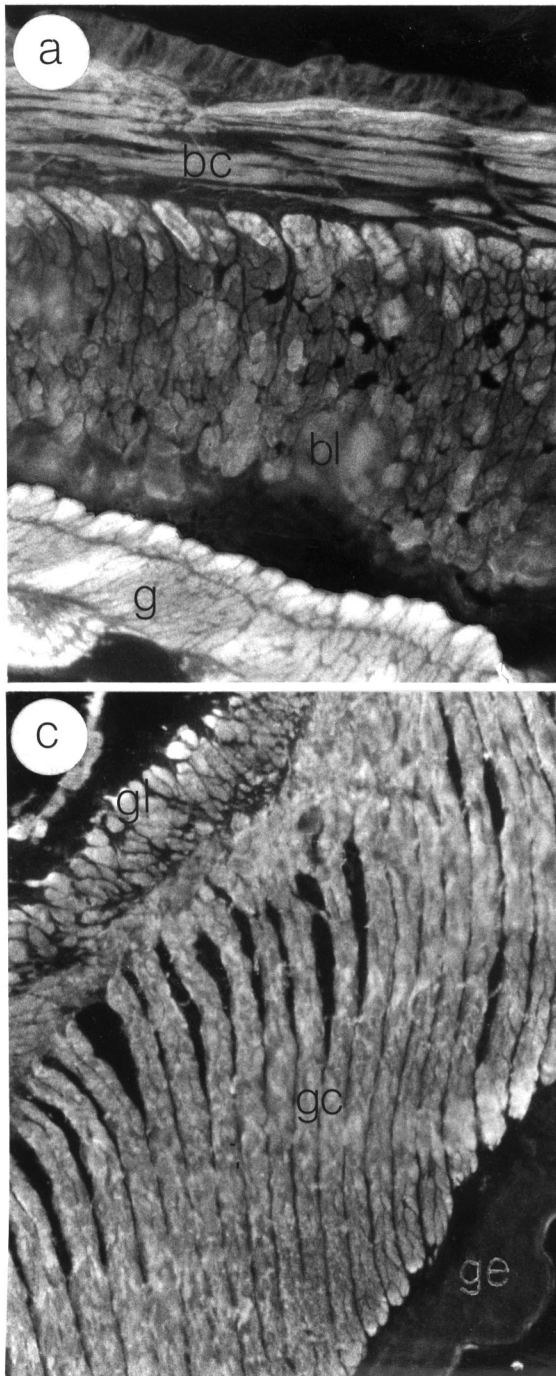


Abb. 3.26: Färbung von Gefrierschnitten des Kaumagens mit monoklonalen anti-P2-Antikörpern; (a): Vergleich der Färbung des Kaumagens mit der des Hautmuskelschlauchs (200x); (b): Längs- und Ringmuskelschicht des Kaumagens (400x); bc= Ringmuskelschicht des Hautmuskelschlauchs (für circular muscle of the body wall), bl= Längsmuskelschicht des Hautmuskelschlauchs (für longitudinal muscle of the body wall), g= Kaumagen (für gizzard), gc= Ringmuskelschicht (für circular muscle of the gizzard), gl= Längsmuskelschicht (für longitudinal muscle of the gizzard), ge= Epithel des Kaumagens mit aufgelagerter Kutikula (für epithel of the gizzard)

3.6.4 EWAM in anderen Geweben des Regenwurms

Die Inkubation von Gefrierschnitten des Regenwurmquerschnitts mit anti-P2-Antikörpern (Abb. 3.27) ergab für die Ring- und Längsmuskulatur des Darms, die Dissepimente und die muskelzellhaltige Hülle des Bauchmarks eine ebenso starke Färbung wie für die peripheren Bereiche des Längs- und Ringmuskels des Hautmuskelschlauchs und den Kaumagen.

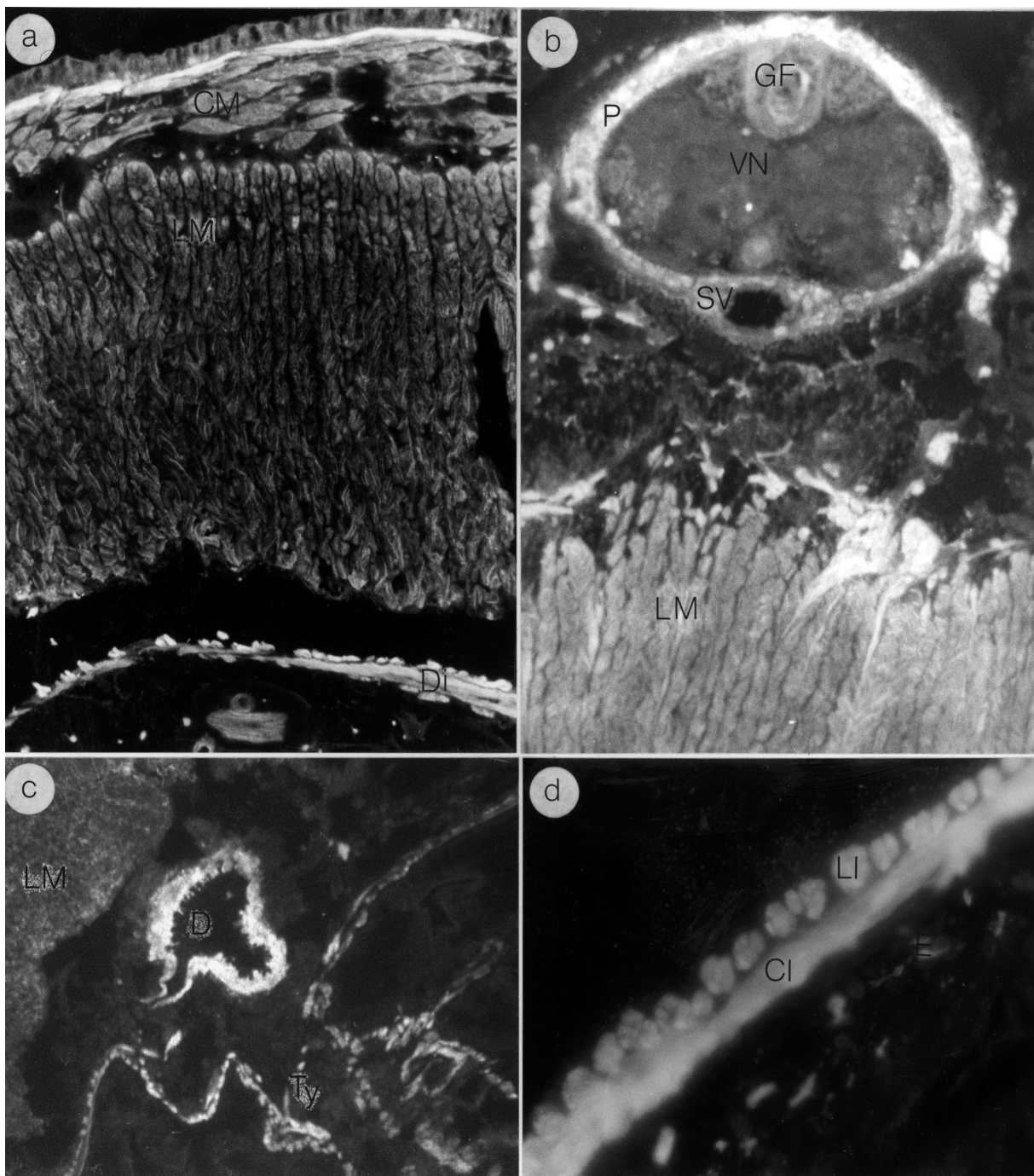


Abb. 3.27: Inkubation von Gefrierschnitten unterschiedlicher Gewebe mit anti-P2-Antikörpern: (a) Anschnitt einer Falte des Dissepiments, 200x; (b): Bauchmark, 350x; (c): Dorsalgefäß mit ableitendem Blutgefäß, 200x; (d): äußere Längs- und innere Ringmuskelschicht des Darms, 950x;

CI= Ringmuskel des Darms (für circular muscle of intestine), CM= Ringmuskelschicht des Hautmuskelschlauchs, D= Dorsalgefäß, Di= Dissepiment, E= Darmepithel, GF= Riesenfasern (für giant fibres), LI= Längsmuskel des Darms (für longitudinal muscle of intestine), LM= Längsmuskelschicht des Hautmuskelschlauchs, P= dreischichtige perineurale Hülle, SV= Subneuralgefäß (für subneural vessel), Ty= Typhlostolis, VN= Bauchmark (für ventral nerve cord),

3.6.5 Lokalisierung von P2 innerhalb der Muskelzellen des Kaumagens

Wie auch bei anderen Tieren mit Hydroskelett gehören die Muskelzellen des Regenwurmes zur Klasse der schräggestreiften Muskulatur. Die Muskulatur des Regenwurmes zeichnet sich dabei durch einen besonders hohen Ordnungsgrad aus (D`Haese, 1992). Die Sarcomere weisen Z-Elemente auf, die keine Z-Scheiben, sondern Z-Stäbe darstellen (Paniagua et al., 1996). Die Schrägstreifung kommt dadurch zustande, dass die übereinander liegenden Myofilamente gestaffelt angeordnet sind, so dass insgesamt schräg zur Zellachse verlaufende A- und I-Banden entstehen, die die funktionelle, Sarkomer-ähnlichen Einheiten darstellen (Abb. 3.28 (b)). Die Muskelzellen sind einkernig und nahezu bandförmig mit einer Breite von ca. 30µm und einer Dicke von nur 5µm. Sie erreichen meist eine Länge zwischen 200 und 600µm, die Längsmuskelzellen des Hautmuskelschlauchs sogar eine Länge von bis zu 3mm.

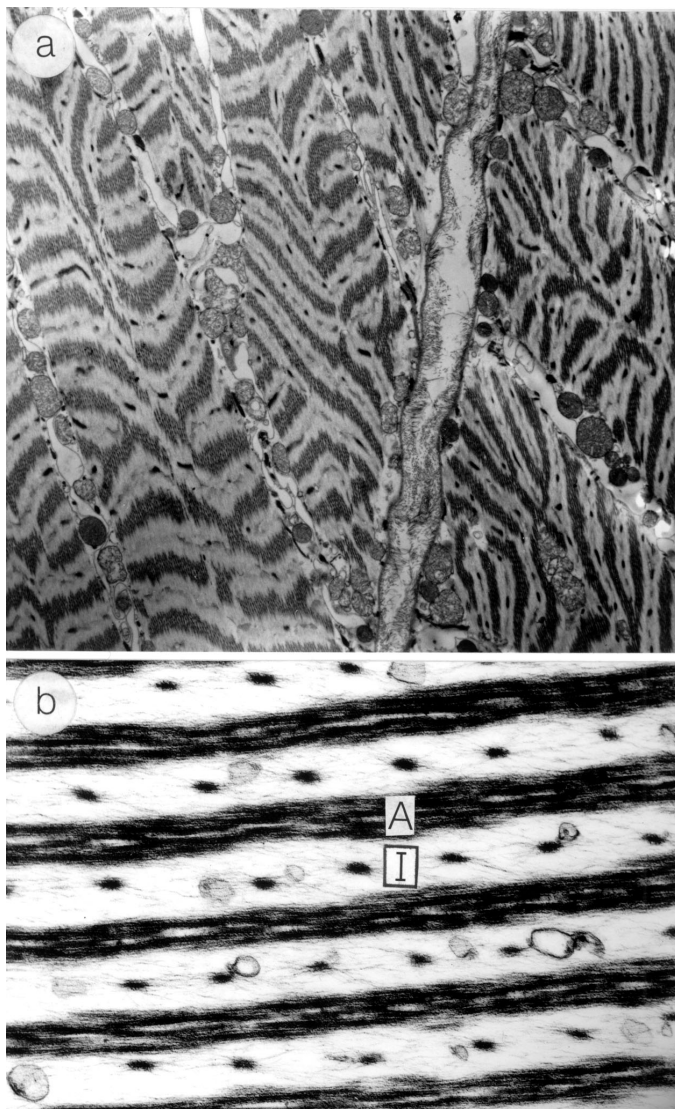


Abb. 3.28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Muskelzellen des Kaumagens, Einbettung in Araldit. (a) Übersicht, Muskelzellen quer geschnitten, 5000x (b) Detailansicht mit Z-Stäben (dunkle Strukturen in der hellen I-Zone) und tubulären Elementen (mehr oder weniger kreisförmige Strukturen in der I-Zone), Muskelzelle längs geschnitten, 17000x. I= I-Zone, A= A-Zone.

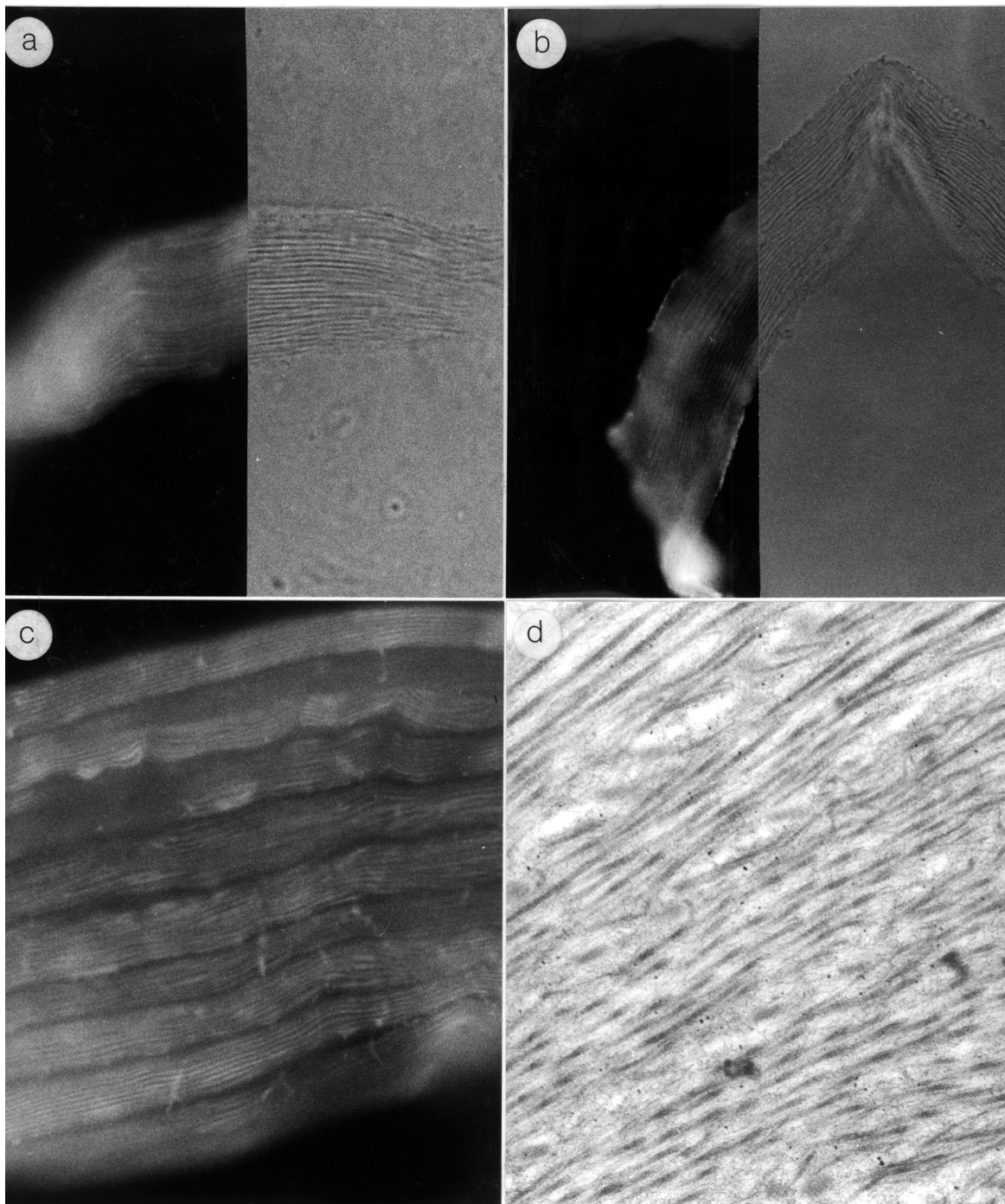


Abb. 3.29: Lokalisation von EWAM innerhalb der Muskelzelle. (a) bis (c): Indirekte Immunfluoreszenz mit Einzelzellen des Kaumagens mit anti-P2-Antikörpern. (a) und (b): Vergleich von Fluoreszenz (jeweils links mit schwarzem Untergrund) und Phasenkontrast (jeweils rechts mit grauem Hintergrund) (1100x); (c) Bündel von Zellen (900x) ; an einigen Stellen ist die Schrägstreifung und eine Doppelstreifung durch die auf der Rückseite der Zelle gegensätzlich verlaufende Streifung deutlich sichtbar; (d): Inkubation eines in LR-Gold eingebetteten Kaumagen-Präparates mit anti-P2-Antikörpern und Gold-markiertem Zweit-Antikörper (36000x).

Durch Anlösen der Muskelzellen des auf Holzstäbchen aufgenähten Kaumagens mit Kollagenase und anschließendes vorsichtiges Abzupfen lassen sich Einzelzellen oder kleinere Bündel von Zellen gewinnen. Nach Inkubation der Zellen mit anti-P2-Antikörpern und TRITC-markierten Zweitantikörpern wurden sie fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es wird eine hell angefärbte Streifung sichtbar, die leicht schräg zur Längsachse der Zelle verläuft (**Abb. 3.29 (c)**). Im Phasenkontrast wird deutlich, dass nicht das Myosin angefärbt wurde. Die nun dunkel erscheinenden, anisotropen Strukturen sind, wie im direkten Vergleich beider Bilder deutlich wird (**Abb. 3.29 (a), (b)**), auch bei der Fluoreszenzanregung die dunklen, also unmarkierten Bereiche der Zelle. Markiert wurden folglich die I-Banden. Die schräg verlaufenden hellen Banden stellen also die versetzt zueinander verlaufen I-Banden vieler übereinander liegender Sarcomere dar, die neben den dünnen Filamenten auch die Z-Stäbe und die Tubuli des sarcoplasmatischen Reticulums enthalten. Der Streifenabstand beträgt ca. $0,9\mu\text{m}$.

Die Markierung von Ultradünnschnitten LR-Gold-eingebetteter Kaumagen-Präparaten unterstützt die lichtmikroskopischen Befunde: Die Gold-gekoppelten Zweit-Antikörper finden sich bevorzugt auf den dünnen Filamenten, während die dunkler erscheinenden Myosin-Filamente weitgehend unmarkiert bleiben (**Abb. 3.29 (d)**). Die relativ schlechte Erhaltung des Gewebes in dem Einbettungsmittel läßt keine Entscheidung darüber zu, ob auch die Z-Stäbe oder das sarcoplasmatische Reticulum markiert sind.

3.6.6 Färbung von Spermienstadien des Regenwurms

Die Spermatogenese wird im Folgenden nach der Originalarbeit von Troyer (1980) und Troyer und Cameron (1980) und nach eigenen Beobachtungen zusammengefasst.

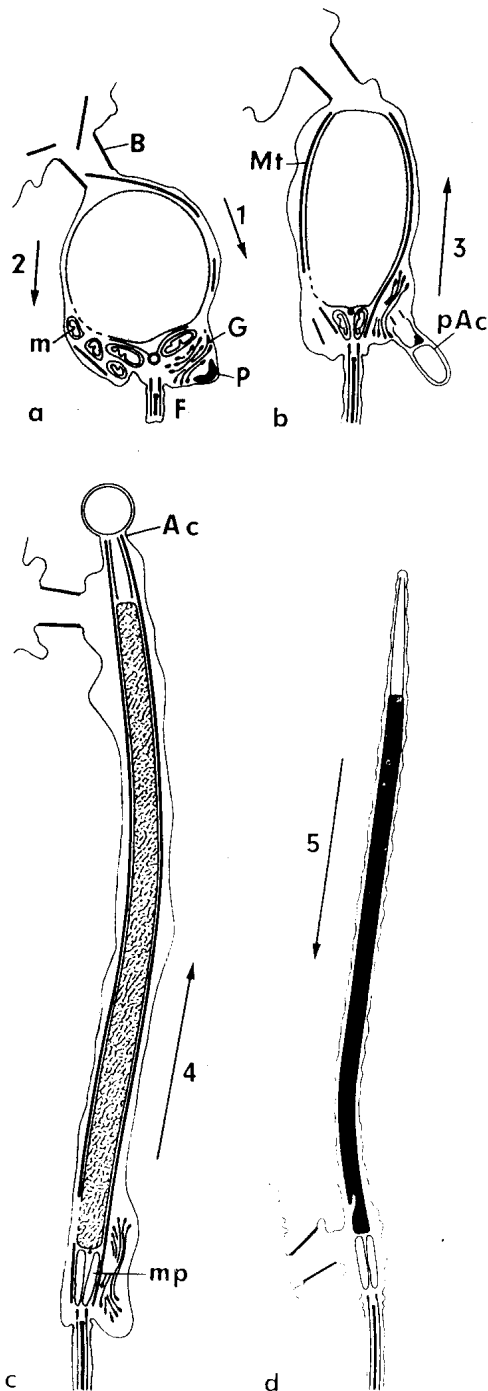


Abb. 3.30: **B:** cytoplasmatische Brücke, **F:** Flagellum, **G:** Golgi-Vesikel, **m:** Mitochondrien, die zum Nebenkern aggregieren, **mp:** Mittelstück, **Mt:** Mikrotubuli der Manschette, **Ac, pAc** oder **P:** Proacrosom. **Pfeile:** (1) und (2): Wanderung der Golgi-Vesikel und der Mitochondrien in der späten Telo- phase der zweiten meiotischen Teilung; (3): Wanderung des Proacrosoms; (4): Wanderung der Golgi-Vesikel vom Mittel- stück in die Region der Brücke und anschließend in die Cytophore; (5): Wanderung der Brücke vom anterioren Ende des elongierten Kerns in die Region des Mittelstücks.

(aus: Troyer und Cameron, 1980)

Alle Stadien der Spermatogenese (ab dem 8-Zellstadium) findet man ohne Ordnung in den Samenblasen (**Abb. 3.31 (1)**, Peters und Walldorf, 1986a). Die Produkte der mitotischen und meiotischen Zellteilungen einer individuellen Gonocyte bleiben über schlauchförmige Plasmabrücken während der gesamten Spermatogenese verbunden (**Abb. 3.32 (d)**). Bei beiden meiotischen Teilungen wird jeweils ein Teil des Cytoplasmas zentripetal durch die Brücken abgegeben, wodurch eine zentrale, kernlose Masse entsteht, die Cytophore (Hesse, 1909) (gut sichtbar in **Abb. 3.31 (2d)**). Das Auftreten von Cytophoren und die Verbindung der Spermatiden über Brücken sowie Acrosomenwanderung sind typisch für alle Anneliden. Die schlauchförmigen Plasmabrücken weisen bei Osmiumfixierung des Präparates eine elektronendichte cytoplasmatische Schicht und eine extrazelluläre faserige Schicht auf (**Abb. 3.32 (d)**). Die cytoplasmatischen Brücken verhindern die Passage von essentiellen Organellen in die Cytophore: Fehlentwickelte Cytophoren, die Kerne und Mittelstücke enthalten, sind über unnormale Brücken, die erweitert sind und kein elektronendichtes cytoplasmatisches Material an der Membran besitzen, mit den Zellen verbunden (Troyer und Cameron, 1980 a).

Im 32- (**Abb. 3.31 (2b)**) und 64-Zellstadium (**Abb. 3.31 (2c)**) werden die Golgi-Vesikel während des Pachytän geteilt (im Lichtmikroskop manchmal als zwei dunkle Pünktchen am distalen Pol zu erkennen). Im 64-Zellstadium wandern die Golgi-Vesikel während der nachfolgenden Telophase II um den Kern herum zum Centriolen-Paar am distalen Pol. Die Mitochondrien folgen und vervollständigen damit den Bauplan der frühesten Spermatide. Während der nun folgenden Spermio-genese findet die Bildung von Acrosom und Flagellum statt. Der Kern verlängert sich, das Chromatin kondensiert und überflüssiges Cytoplasma wird entfernt. Die 6 Mitochondrien der jungen Spermatide aggregieren und bilden den sogenannten Nebenkern und später das Mittelstück des Spermiums (**Abb. 3.32 (b), (c)**). Von der distalen Centriole, dem Basalkörper, strahlen in der jungen Spermatide Mikrotubuli aus, die den Kern und die Mitochondrien umgeben (**Abb. 3.32 (c)**), zur Plasmamembran reichen und das Axonem bilden. Das Proacrosom erscheint als leichter Vorsprung vor dem Golgi-Apparat nahe der Plasmamembran, liegt also zunächst caudal. Es nimmt schnell an Größe zu, erhält eine aufgeblasene Spitze (= Acrosomenvesikel), die schließlich auf einem Stiel zu sitzen kommt (**Abb. 3.32 (a), (b)**). Dann wird das gesamte Proacrosom den (bereits elongierten) Kern entlang in die Gegend der Brücke transportiert (Strecke: ca. 20µm). Auch der Stiel wird von Mikrotubuli der nukleären Manschette umgeben. Die Golgi-Vesikel bleiben noch einige Zeit nach dem Abwandern des Proacrosoms im Bereich des Mittelstückes. Dann werden sie nach cranial (ca. 15µm weit) transportiert in die Region des Acrosoms. Dort zerfallen sie und werden wahrscheinlich durch die Brücke transportiert. Anschließend wandert die

schlauchförmige Plasmabrücke in entgegengesetzter Richtung, aber den gleichen Weg wie die Golgi-Vesikel, in Richtung Mittelstück. Zur gleichen Zeit verschwinden die nukleäre Manschette und die letzten Reste von überschüssigem Cytoplasma aus den Spermatiden. Die Cytophore, zu Anfang der Spermiogenese noch recht homogen, enthält nun eine große Anzahl von Einschlüssen, Mikrotubuli, Degenerationsprodukte des Golgi-Apparats etc..

Wandernde Proacrosome, Golgi-Apparate und Brücken werden nur selten angetroffen, die Wanderungen sind also wahrscheinlich recht schnell ablaufende Prozesse.

Die Schema-Zeichnungen, **Abb. 3.30**, verdeutlicht die Wanderungsbewegungen der Zellbestandteile während der Spermiogenese, dargestellt durch Pfeile.

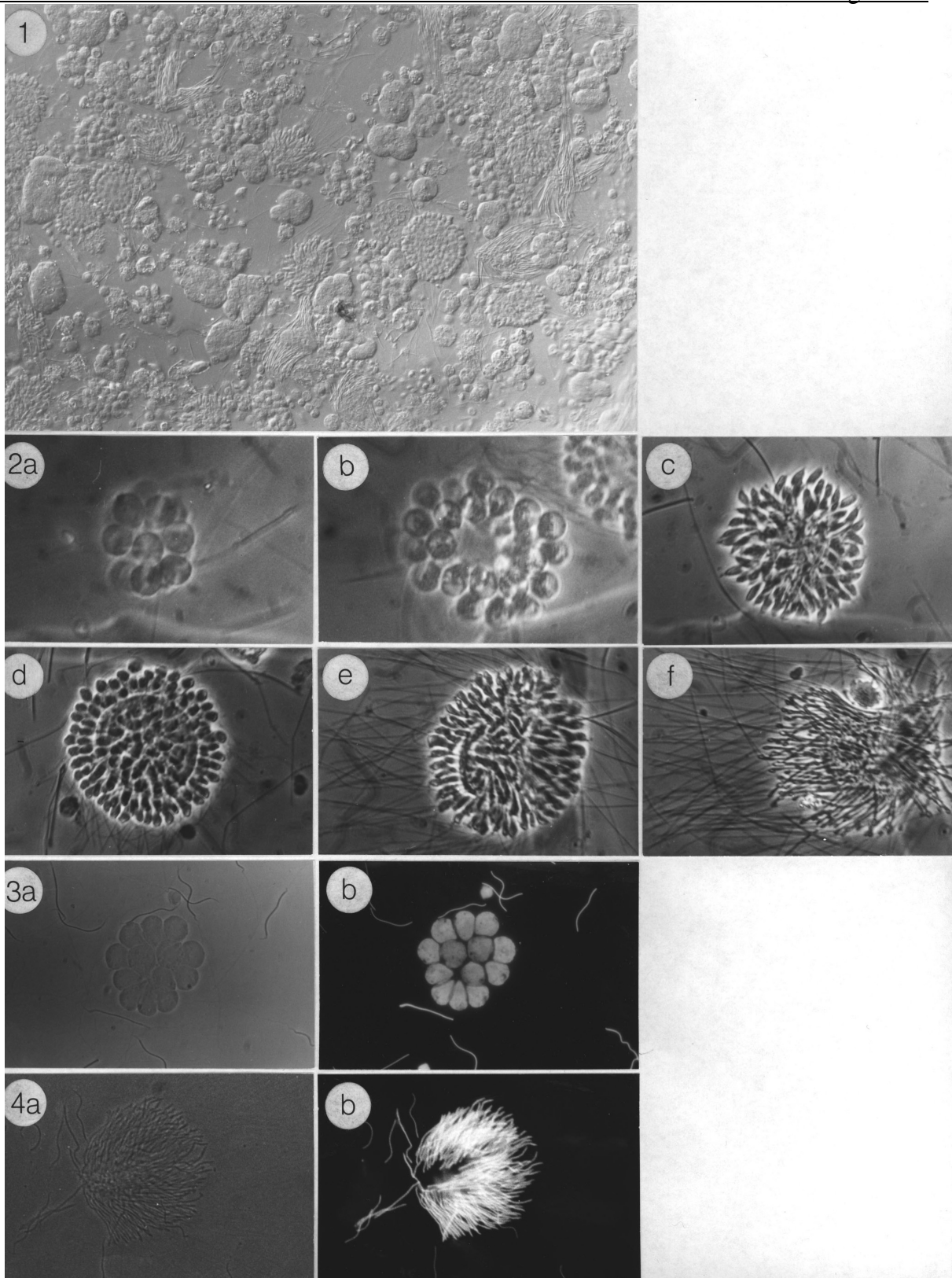


Abb. 3.31: Lichtmikroskopische Darstellung von Spermienstadien. (1): In Ausstrichen von Samenblasen finden sich ungeordnet alle Stadien ab dem 8-Zellstadium. Unbehandelte, frische Stadien. Vergrößerung ca. 150x; (2): verschiedene Stadien der Spermatogenese, Vergrößerung ca. 400x: (a): 16-Zell-Stadium = Spermatogonien, (b): 32-Zell-Stadium = Spermatocyten I. Ordnung, (c): 64-Zell-Stadium = Spermatocyten II. Ordnung, (d)-(e): 128-Zell-Stadium = Spermatiden während der Spermiogenese. (3) und (4): Darstellung des Kerns durch Anfärbung mit DAPI (jeweils (b)) im Vergleich zum Phasenkontrastbild (jeweils a). Beachte in (4a) die Lage der Geißeln in der rechten Bildhälfte.

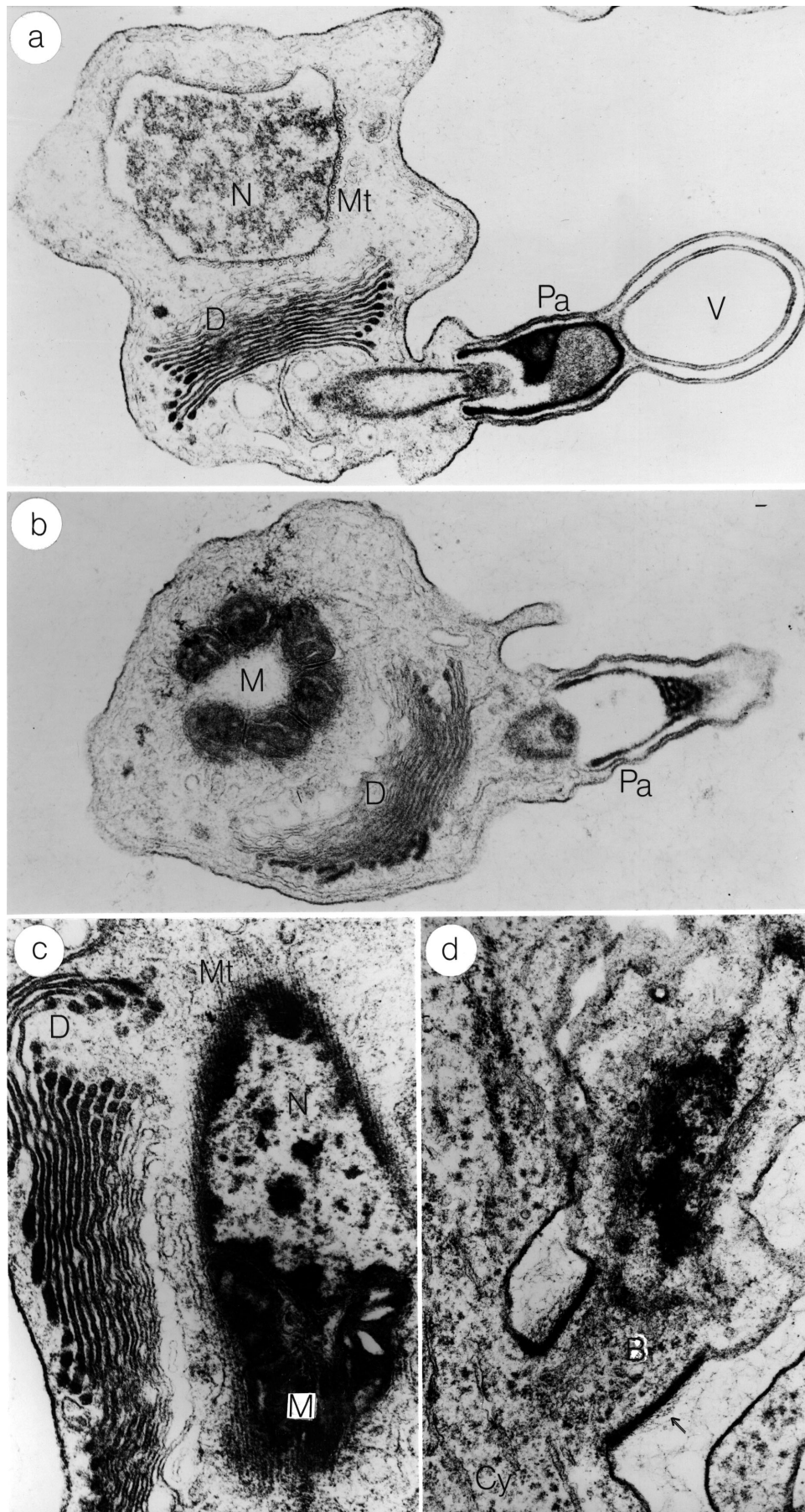


Abb. 3.32: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Spermatiden. (a): Vor der Wanderung des Proacrosoms (Pa) in Richtung Brücke. Der Kern (N) ist von Mikrotubuli (Mt) umgeben (41.000x) (b): Schnitt in Höhe des Mittelstücks (31.000x) (c): Kern und Mitochondrien (M) des Mittelstücks sind von Mikrotubuli (Mt) umgeben (42.000x) (d): Die Spermatiden sind über cytoplasmatische Brücken (B) mit der Cytophore (Cy) verbunden. Die schlauchförmige Plasmabrücke weist eine extrazelluläre und cytoplasmatische faserige elektrodichte Schicht auf (Pfeil) (25.000x) D: Golgi-Vesikel

3.6.7 Lokalisation von F-Actin in den Spermienstadien

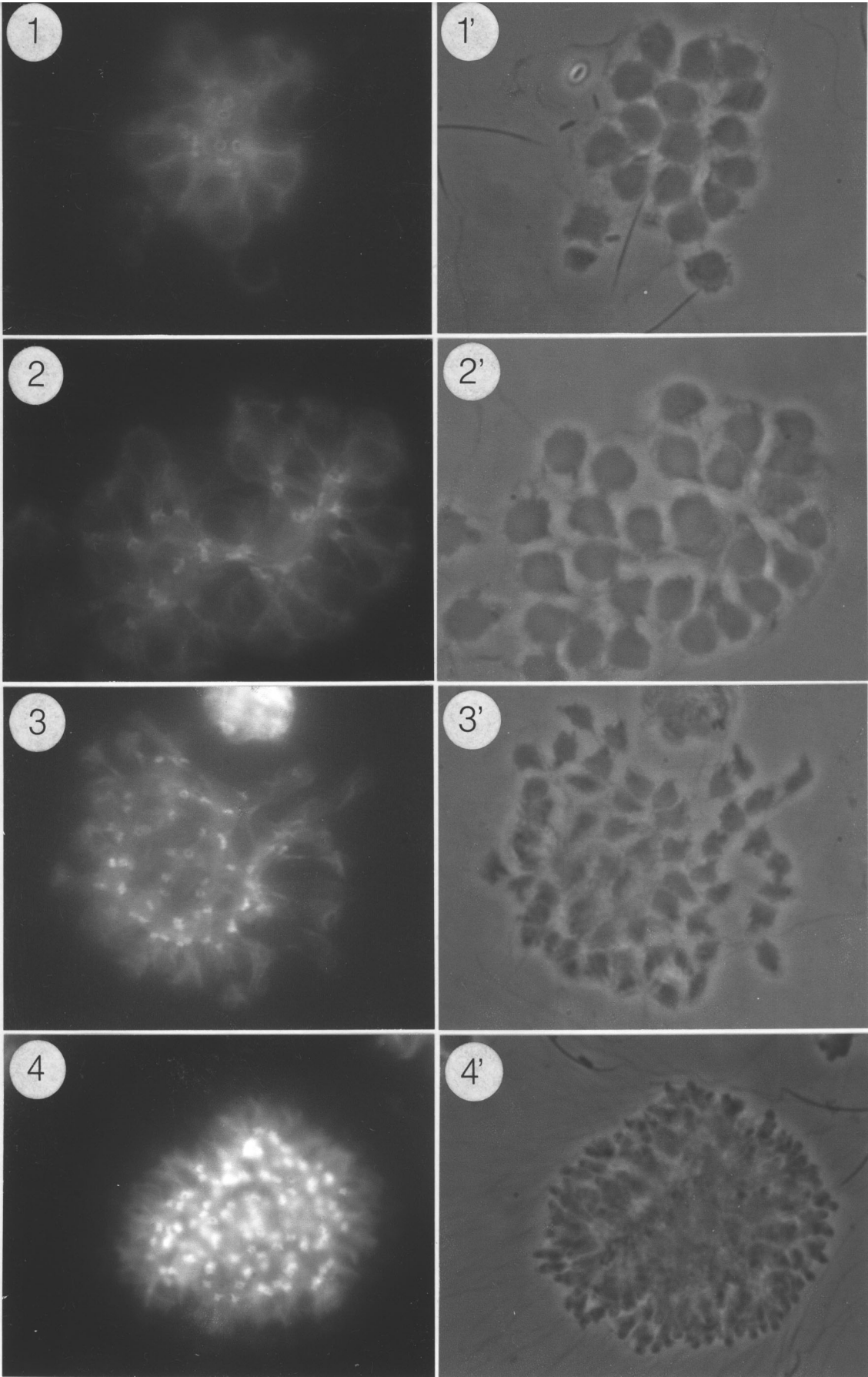
Phalloidin, ein Pilzgift, ist ein bitykisches Heptapeptid. Phalloidin wird aus dem Pilz *Amanita phalloides*, dem Knollenblätterpilz, isoliert. Es bindet sowohl an lange als auch kurze Actin-Filamente und stabilisiert sie dabei (Wieland, 1986). Nicht-spezifische Bindung ist vernachlässigbar, wobei Phalloidin nicht in der Lage ist, G-Actin zu binden (Wieland, 1986).

Die Färbung mit Rhodamin-Phalloidin macht in allen Stadien der Spermatogenese eine Struktur sichtbar: Am proximalen Pol der Zellen, der zur Cytophore hin orientiert ist, werden Strukturen kreisförmig oder zylindrisch angefärbt (**Abb. 3.33 und Abb. 3.34**). Diese F-Actin-haltigen Strukturen sind vermutlich aufgrund ihrer Lage identisch mit den cytoplasmatischen Brücken. Die Brücken weisen im elektronenmikroskopischen Bild spezielle, faserige Strukturen auf der Membraninnen- und Membranaußenseite auf, die zusammen als Zonula Collaris bezeichnet werden (Jamieson, 1978). In Spermatogonien im 16- und 32-Zell-Stadium erscheinen die Strukturen kreisförmig mit etwa 3µm Durchmesser bei einer Höhe von nur etwa 1µm (**Abb. 3.33 (1) und (2)**), während sie mit zunehmender Zellzahl der Morula an Durchmesser verlieren, aber an Höhe zunehmen, so dass sie schließlich, ab dem 64-Zell-Stadium (**Abb. 3.33 (3) und (4)**), zylinderförmig aussehen mit einem Durchmesser und einer Höhe von etwa 1 bis 2µm.

Darüber hinaus ist die Cytophore mehr oder weniger stark angefärbt, am stärksten im 64-Zell-Stadium der sekundären Spermatocyten. Das Cytoplasma der Zellen aller Stadien zeigt eine diffuse Färbung, der Kern bleibt ausgespart (**Abb. 3.33**). Kurz bevor sich die reifen Spermien voneinander trennen, ist eine schwache Färbung entlang des stark verlängerten Kerns erkennbar. Die reifen Spermien bleiben vollständig ungefärbt.

nächste Seite:

Abb. 3.33: Färbung von F-Actin in Spermienstadien mit Rhodamin-Phalloidin. Jeweils links Fluoreszenz, rechts das zugehörige Bild im Phasenkontrast. (1): Spermatogonien im 16-Zell-Stadium, (2): Spermatocyten I. Ordnung im 32-Zell-Stadium, (3) Spermatocyten II. Ordnung im 64-Zell-Stadium, (4): Spermatoziden im 128-Zell-Stadium. Vergrößerung ca. 500x



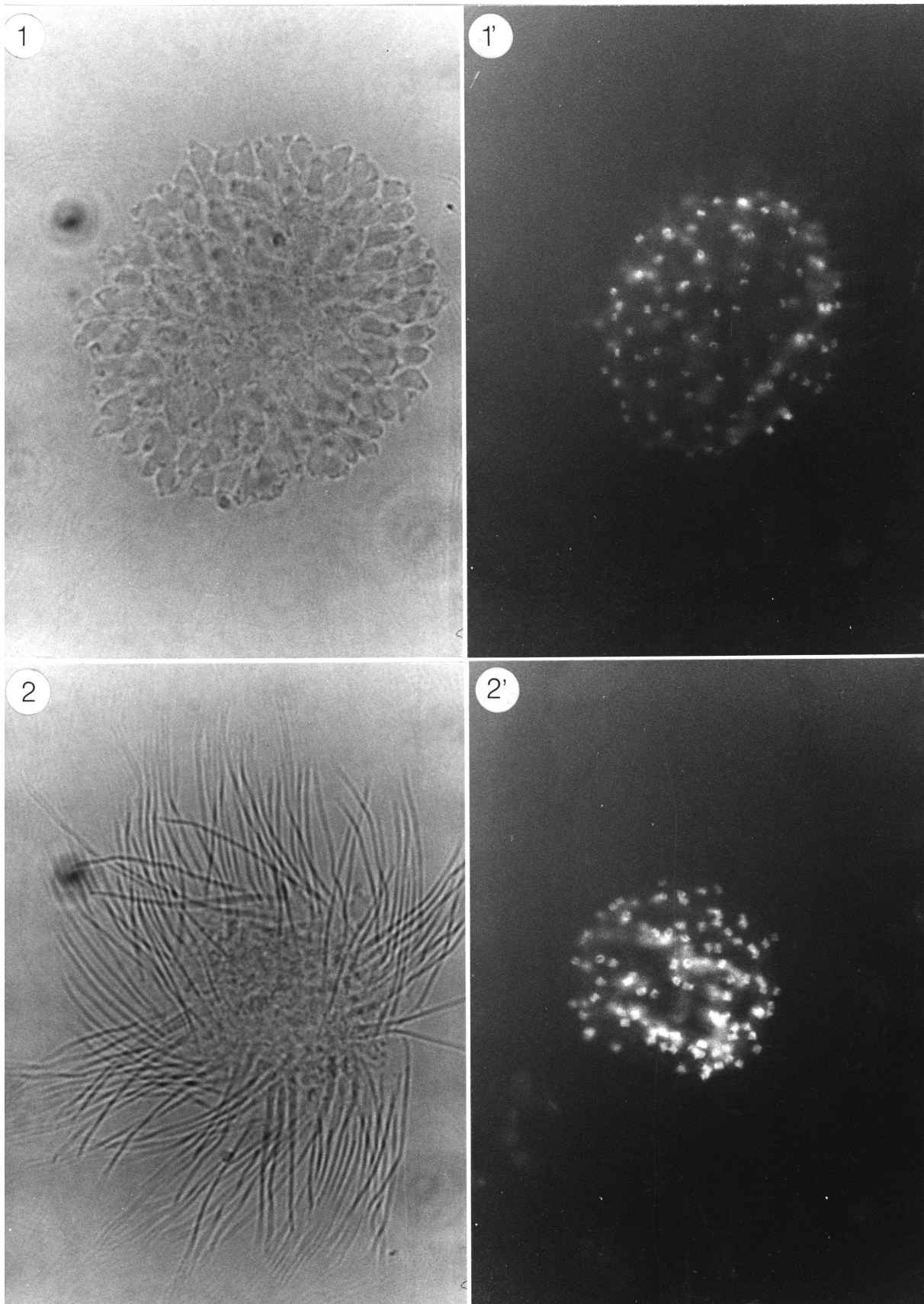


Abb. 3.34: Färbung von F-Actin in Spermienstadien mit Rhodamin-Phalloidin. (1) und (2): Phasenkontrast, (1') und (2'): Fluoreszenz der jeweiligen Morula bei Grünanregung. In (2) sind die Spermatisden stärker elongiert als in (1). Vergrößerung jeweils ca. 900x

3.6.8 Die Färbung von Spermienstadien mit anti-Fragmin-Antikörpern ermöglicht eine distinkte Markierung in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium

Es wurde zum Anfärben des EWAM der anti-Fragmin-Antikörper gewählt, da besonders EWAM-P1 in Spermienstadien zu erwarten ist. Der anti-Fragmin-Antikörper kreuzreagiert, wie auch die Experimente mit Hautmuskelschlauch-Modulator gezeigt haben, sowohl mit EWAM-P1 als auch mit den immunologisch wie EWAM-P2 reagierenden Modulatoren des Regenwurms, sonst jedoch mit keinen Zellbestandteilen. Der polyklonale anti-P1-Antikörper weist dagegen den Nachteil auf, dass er mit einigen Zellproteinen kreuzreagiert.

Besonders gute Ergebnisse ließen sich erzielen, wenn die in Regenwurm-Ringer gesammelten Spermienstadien mit lauwarmer 0,7%iger Agarose in 0,5x PBS vermischt, auf vorgewärmten Objektträgern ausgestrichen und sofort auf Eis abgekühlt wurden.

Mit dem anti-Fragmin-Antikörper lässt sich eine Markierung des Actin-Filament-Rings bzw. -Zylinders erreichen: Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wird manchmal die Markierung des proximalen, der Cytophore zugewandten Teils der Zellen erkennbar, besonders im 16-Zellstadium und bei jungen, noch birnenförmigen Spermatischen (**Abb. 3.36 (c)**). Beim 64-Zellstadium ist die Cytophore so stark markiert, dass ihre Fluoreszenz die nahegelegenen Strukturen überstrahlt (**Abb. 3.35 (2)**). Nur eine granulär erscheinende Markierung ist hier sichtbar. Die Cytophore ist mehr oder weniger in allen Phasen der Spermato-genese markiert, besonders stark jedoch im 64-Zell-Stadium. Das Cytoplasma zeigt eine diffuse Färbung in allen Stadien, wobei der Kern ausgespart bleibt (z. B. **Abb. 3.35 (1)**). Beinahe reife Spermien zeigen kurz vor dem Auseinanderfallen eine Färbung entlang des elongierten Kerns (**Abb. 3.36 (f) und Abb. 3.37 (1) bis (1'')**). Reife Spermien werden nicht angefärbt. Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops kann der proximale Pol der Zellen besser untersucht werden, denn in den virtuellen Schnitten durch die Morulae überstrahlt die Cytophore nicht die Fluoreszenz benachbarter Strukturen. Manchmal sind dabei kreisförmige Strukturen erkennbar, die wahrscheinlich die cytoplasmatischen Brücken darstellen, ähnlich wie bei der Färbung mit Phalloidin (**Abb. 3.37 (1'), (1''), (2'')**). Ebenfalls in der Nähe der Cytophore sind zu bestimmten Zeitpunkten jedoch auch der Golgi-Apparat und das Proacrosom zu erwarten. In **Abb. 3.37 (2')** aber kann es sich bei der markierten Struktur auf der Oberfläche der Cytophore weder um Golgi-Vesikel noch um das Proacrosom handeln, da die Zellen offensichtlich bereits die Wanderung der Brücke vollzogen haben. Die Proacrosome zeigen zu diesem Zeitpunkt von der Cytophore fort, während der Golgi-Apparat bereits in die Cytophore eingewandert ist.

Eine zusätzliche Fluoreszenz im Vergleich zu der Markierung mit Rhodamin-Phalloidin ist im Mittelstück der Spermienstadien zu beobachten. Im 32-Zell-Stadium ist die Peripherie und dort besonders der distale Pol etwas stärker gefärbt als der zentraler gelegene Anteil der Zellen. Im 64-Zell-Stadium ist manchmal eine Kappe aus zwei länglichen Strukturen markiert, die als der sich teilenden Golgi-Apparat interpretiert werden (**Abb. 3.35 (2)**). Eine ähnliche Anfärbung ist in elongierten Spermatischen zu beobachten. Die eher längliche, pfeilkopfförmige Struktur repräsentiert vermutlich (- die Organellen sind auf lichtmikroskopischer Ebene nicht differenzierbar -) das Proacrosom (**Abb. 3.36 (d)**), die globuläre Struktur die Golgi-Vesikel (**Abb. 3.37 (e)**), die nach der Wanderung des Proacrosoms zunächst am Mittelstück zurückbleiben.

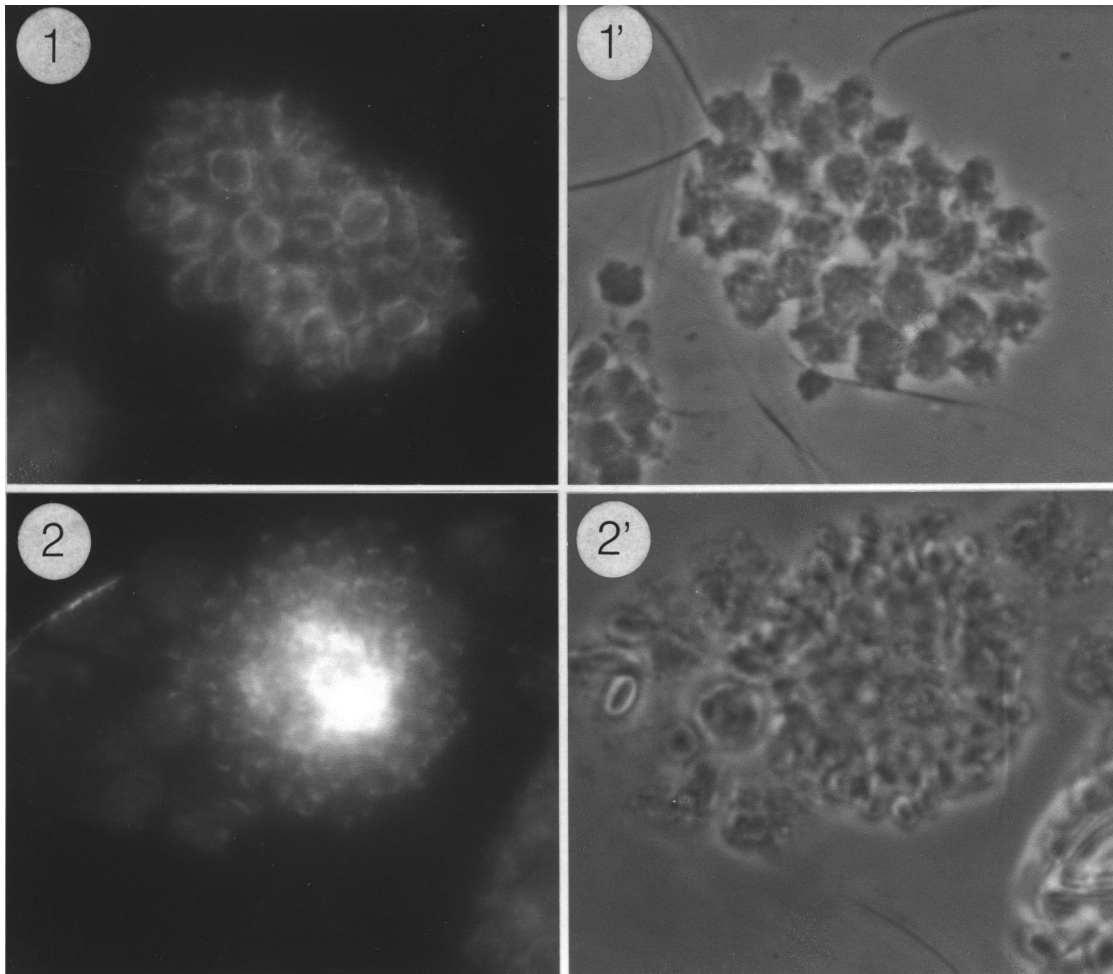


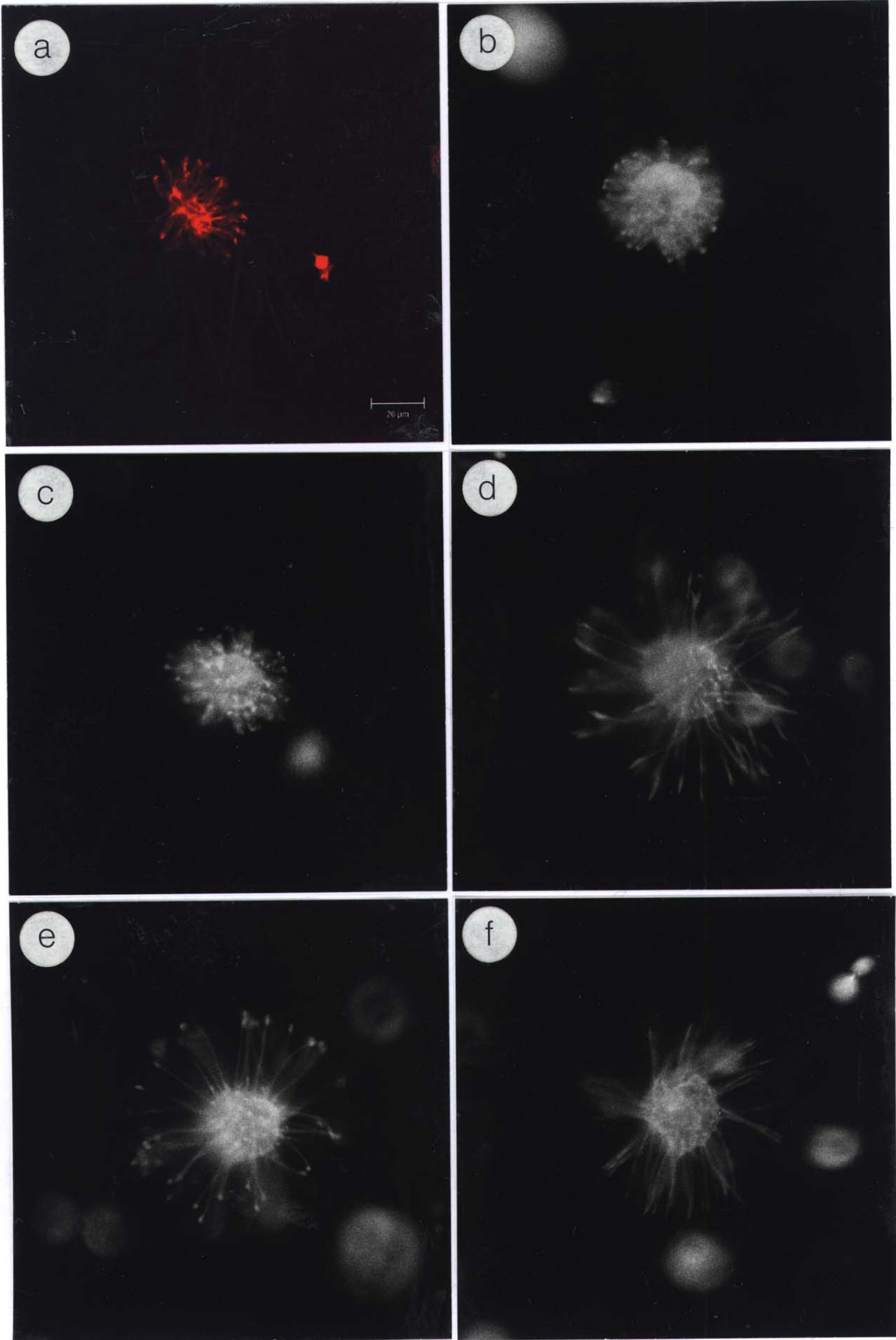
Abb. 3.35: Inkubation verschiedener Stadien der Spermiogenese mit anti-Fragmin-Antikörpern, links Fluoreszenz, rechts Phasenkontrast. (1) und (1'): Spermatocyt I. Ordnung im 32-Zell-Stadium, (2) und (2'): Spermatocyt II. Ordnung im 64-Zell-Stadium. ca. 500x

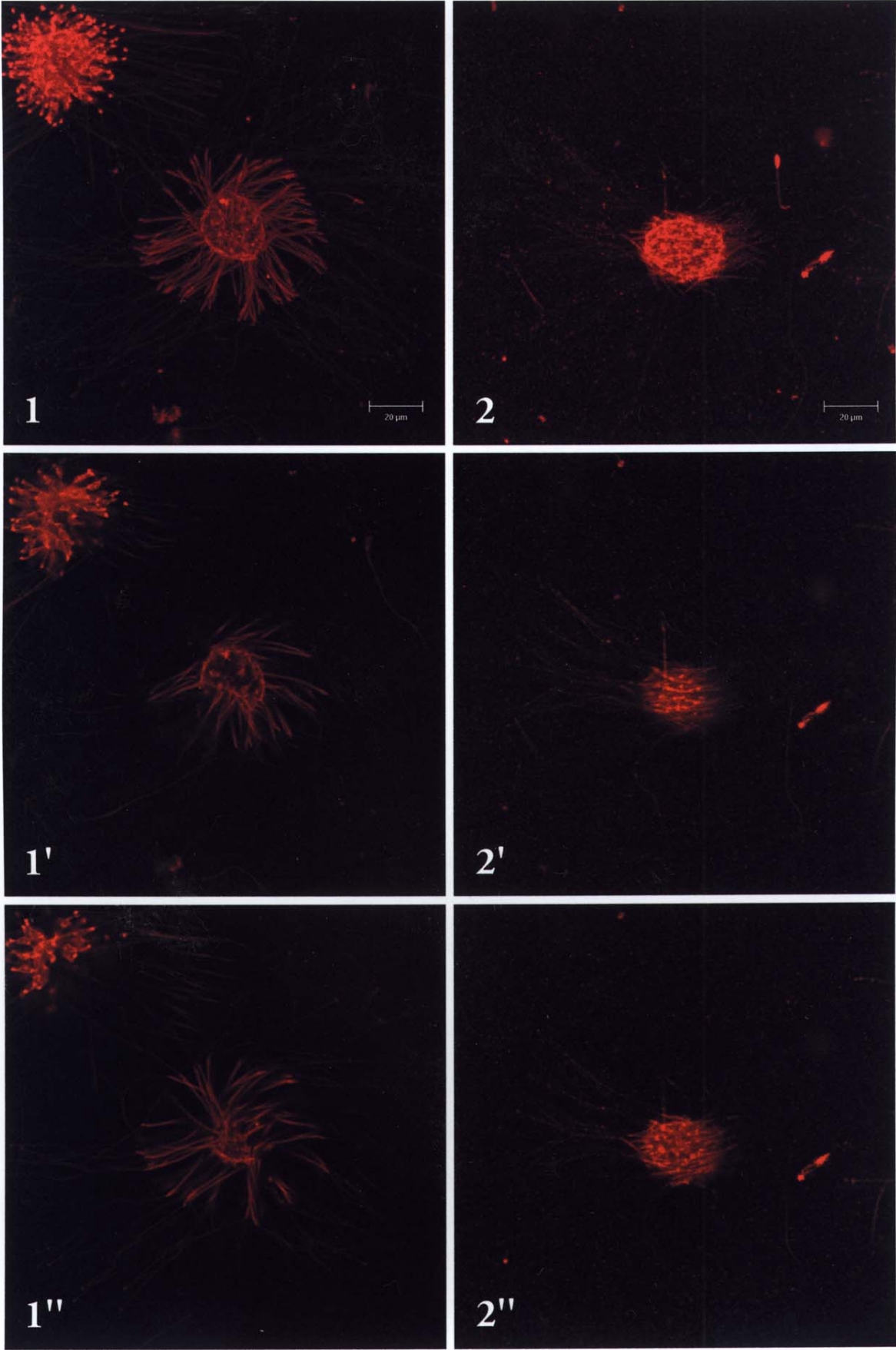
nächste Seite:

Abb. 3.36: Inkubation verschiedener Stadien der Spermiogenese mit anti-Fragmin-Antikörpern. Vergrößerung ca. 450x. (a): addiertes Bild aus Schnitten des konfokalen Mikroskops. Junge, birnenförmige Spermatiden. Anfärbung besonders der Cytophore und des distalen, dem Mittelstück zugewandten Pols (b)-(f): lichtmikroskopische Aufnahmen. (b): birnenförmige Spermatiden, Markierung der Cytophore und des distalen Pols der Zellen. (c): birnenförmige Spermatiden, Markierung auch des proximalen Zellpols. (d): elongierte Spermatiden, Markierung des distalen Pols (evtl. des Proacrosoms) und granuläre Markierung der Cytophoren-Oberfläche wahrscheinlich durch Anfärbung der cytoplasmatischen Brücken. (e): elongierte Spermatiden, Markierung des distalen Pols (evtl. der Golgi-Vesikel) und granuläre Markierung der Cytophoren-Oberfläche wahrscheinlich durch Anfärbung der cytoplasmatischen Brücken. (f): elongierte Spermatiden nach der Wanderung der Brücke, Markierung entlang des elongierten Kerns.

übernächste Seite:

Abb. 3.37: Inkubation von Spermienstadien mit anti-Fragmin-Antikörpern, Untersuchungen mit dem konfokalen Mikroskop. Vergrößerung ca. 450x. (1) und (2): Addition aller Schnittaufnahmen, (1', 1'', 2', 2''): virtuelle Schnitte durch die Morulae. In den Schnitten werden kreisförmige Strukturen auf den Cytophoren sichtbar.





4. Diskussion

Die Isolierung von Gelsolin-verwandtem Protein aus Muskelzellen

Aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms *Lumbricus terrestris* konnten D`Haese und Hinssen (1987) etwa 50mg Gelsolin-verwandtes Protein pro kg Nassgewicht isolieren. Aus der Aktivität des Rohextraktes schlossen sie jedoch auf einen Gehalt von 500mg pro kg Hautmuskelschlauch zurück.

In der vorliegenden Arbeit konnten aus den Kaumägen von 50 Tieren (Nassgewicht der isolierten Organe 7g) ca. 2mg Modulator-haltige Fraktionen (je 1mg pro EWAM-Isoform) gewonnen werden, was 286mg pro kg Kaumagen entspricht. Wie die elektrophoretische Auftrennung zeigte, befindet sich in diesen Fraktionen noch ein großer Anteil an anderen Proteinen. Dies wird auch durch die Tatsache deutlich, dass etwa 450µg Protein eingesetzt werden mussten, um eine Aktivität von etwa 35% zu erhalten. Anhand der elektrophoretischen Auftrennung kann der Gehalt der aktiven Fraktionen an Modulator auf maximal 10% geschätzt werden. Es konnte also etwa 30mg Actin-Modulator pro kg Kaumagen isoliert werden. Wären die präparationsbedingten Verluste ebenso groß wie bei der Hautmuskelschlauch-Präparation (D`Haese und Hinssen, 1987), so sind im Kaumagen ungefähr 300mg EWAM pro kg Muskel zu erwarten, was dem Wert des Hautmuskelschlauchs ähnelt.

Gelsolin-verwandte Proteine können aus Muskeln in relativ großen Mengen isoliert werden (Yin et al., 1981, Hinssen, 1985 a und b, D`Haese und Hinssen, 1987, D`Haese und Fey, 1989, Giebing, 1989). Der Gehalt an Modulator richtet sich bei Vertebraten nach dem Organisationsgrad der Muskeln, wobei aus glatter Muskulatur am meisten Gelsolin isoliert wird und aus quergestreifter Skelettmuskulatur am wenigsten. Bei Wirbellosen dagegen enthalten auch Muskeln von hohem Organisationsgrad – etwa die schräggestreifte Muskulatur des Regenwurmes oder die quegestreifte Muskulatur des Flusskrebse – eine große Menge an Gelsolin-verwandten Proteinen. EWAM war der erste Actin-Modulator, der aus der Muskulatur eines Wirbellosen isoliert wurde (D`Haese und Hinssen, 1987).

Aus dem Schwanzmuskel des Flusskrebse *Astacus* konnten 50mg gereinigter Actin-Modulator pro kg Nassgewicht isoliert werden (Bock et al., 1994). Aus dem Schwanzmuskel des Hummers *Homarus* lag die Ausbeute von elektrophoretisch reinem Protein bei 30 bis 40mg pro kg Muskelgewebe (Lück, 1994). Aus dem Schließmuskel der Jakobsmuschel *Pecten* (glatter und quergestreifter Anteil gemeinsam) wurden etwa 15mg/kg Gelsolin-artiges Protein gewonnen, wobei der Gehalt im glatten Anteil höher ist (Remmert und Hinssen, 1996, Remmert, 1999). Für das Gelsolin des Schweinemagens werden Werte von ca.

120mg Modulator pro kg Muskel angegeben, die isoliert werden konnten. Der tatsächliche Gehalt scheint höher zu sein und bei etwa 0,1% des Gesamtproteins des Muskels zu liegen (Hinssen et al., 1985 b). Aus quergestreifter Vertebraten-Muskulatur kann etwa 30-50fach weniger Gelsolin isoliert werden (Teubner et al., 1994). Der Wert von etwa 50mg zu 95% reines Gelsolin pro kg Gewebe aus dem Herzmuskel des Kaninchens (Rouayrenc et al., 1984) liegt daher wahrscheinlich zu hoch, eventuell ist das Protein nach der Chromatographie unreiner als angenommen.

Es ist fraglich, ob die hier genannten Werte tatsächlich direkt miteinander vergleichbar sind, da die genauen Bedingungen bei der Aufreinigung nicht in Betracht gezogen werden. Extraktionspuffer ohne EGTA z. B. führen bei der plötzlichen Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration während der Homogenisierung des Gewebes zu einer Bindung von zusätzlichem Gelsolin an die dünnen Filamente, so dass ein Teil des Modulators mit den sedimentierbaren Anteilen abzentrifugiert und nicht isoliert wird. Die Tatsache, dass aus der Skelettmuskulatur nur relativ wenig Gelsolin isoliert werden kann, kann beispielsweise auch damit zusammenhängen, wieviel Gelsolin löslich im Cytosol und welcher Anteil an die dünnen Filamente EGTA-resistent gebunden vorliegt. Zudem führt jeder zusätzliche Aufreinigungsschritt, wenn etwa nach der Ionenaustauscher-Chromatographie noch eine Gelfiltration angeschlossen wurde, zu weiteren Verlusten. Mit aller Vorsicht kann daher lediglich festgestellt werden, dass die Muskulatur des Regenwurmes eine relativ große Menge an Gelsolin-verwandtem Protein aufweist, die ungefähr im Bereich von der Menge liegt, die die glatte Vertebraten-Muskulatur enthält.

Die Diversität des Gelsolin-verwandten Proteins aus Muskelzellen

Bei der Isolierung des Gelsolin-verwandten Proteins EWAM aus Muskelzellen des Regenwurmes konnten Varianten aufgetrennt werden. Es zeigte sich dabei, dass die beiden untersuchten Organe Hautmuskelschlauch und Kaumagen ein unterschiedliches Expressionsmuster dieser Varianten aufweisen. Während im Hautmuskelschlauch die Isoformen P1, P2 und P3 in nahezu gleicher Menge, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, nachgewiesen wurden, fanden sich im Kaumagen die Isoformen P3 und P4 in etwa gleichen Mengen. Die Bezeichnung der Varianten als P1 bis P4 beruht dabei auf ihrer zeitlich versetzten Elution als Aktivitäts-Peaks in der Anionen-Austauscherchromatographie.

Aufgrund ihrer *in vitro* nicht unterscheidbaren Eigenschaften vermuteten D`Haese und Hinssen (1987), dass die Varianten Isoformen darstellen. Unter Isoformen versteht man Protein-Varianten eines Mitglieds einer Protein-Familie, die entweder durch das Ablesen verschiedener Gene oder durch unterschiedlich prozessierte RNA-Transkripte des glei-

chen Gens entstehen (Schiaffino und Reggiani, 1996). In vielen Fällen ist die physiologische Bedeutung dieser Heterogenität unklar. In anderen Fällen lassen sich Unterschiede zwischen den Isoformen bezüglich ihrer Aktivität, Expression im Laufe der Entwicklung und ihrer intrazellulären oder spezifischen Lokalisation feststellen, was auf unterschiedliche Funktionen der Isoformen hindeutet.

Es ist jedoch auch denkbar, dass die bei der Isolierung von Gelsolin-verwandtem Protein aus Hautmuskelschläuchen in der Chromatographie und Gelelektrophorese voneinander trennbaren Proteine keine Isoformen darstellen. Eine artifizielle Aufspaltung in mehrere Modulator-Fractionen ist z. B. durch präparationsbedingte Modifikationen wie Oxidation oder partielle proteolytische Degradation möglich. Weitere molekulare Unterschiede, die von der Isoform-Heterogenität unterschieden werden müssen, aber zu distinkten Proteinfraktionen führen, sind genetischer Polymorphismus, der durch variante Allele, z. B. durch Punktmutationen eines Gens innerhalb einer Anzahl von Individuen einer Art entsteht, und posttranslationale Veränderungen, z. B. unterschiedliche Phosphorylierung oder Methylierung von Aminosäuren nach der Protein-Synthese (Schiaffino und Reggiani, 1996).

Ein erster Hinweis auf die Existenz von zwei unterschiedlichen Protein-Isoformen ergab sich durch die Untersuchung des immunologischen Verhaltens der in der Gelelektrophorese voneinander trennbaren Varianten. Die beiden Banden lassen sich im Western-Blot mit verschiedenen Antikörpern unterschiedlich gut anfärben: Die 43kDa-Bande lässt sich nicht mit dem monoklonalen anti-P2-Antikörper anfärben, der jedoch die 45kDa-Bande anfärbt. Beide Banden werden dagegen vom anti-Fragmin-Antikörper angefärbt, der eigentlich gegen den Actin-Modulator aus dem Schleimpilz *Physarum* gerichtet ist.

Von allen drei chromatographisch trennbaren Varianten wurden anschließend die Spaltmuster untersucht. Die limitierte Proteolyse zeigte, dass die zwei hinsichtlich ihres apparenten Molekulargewichts unterscheidbaren Protein-Varianten unterschiedliche Proteine darstellen, denn die Proteolyse ergab zwei stark voneinander abweichende Spaltmuster. Dieses unterschiedliche Verhalten des ersten Peaks im Gegensatz zum zweiten/dritten Peak ist nicht denkbar, wenn die Proteinen nur aufgrund artifizieller oder posttranslatiöner Veränderungen des gleichen Proteins chromatographisch und gelelektrophoretisch trennbar wären. Der zweite und dritte Aktivitätspeak dagegen waren anhand ihres Spaltmusters jedoch nicht zu unterscheiden und könnten auch als artifiziell entstandene oder posttranslationale Varianten angesehen werden.

Die Proteolysen lieferten noch weitere interessante Ergebnisse: Erst bei einer Mischung der EWAM-Varianten mit Actin und anschließender Proteolyse treten Fragmente der Größe 15 und 30kDa auf. Diese Banden sind bei dem aus drei Segmenten bestehenden Modulator eigentlich zu erwarten, denn zwischen den Segmenten sind Gelsolin-ähnliche Proteine durch eine proteolytisch leicht angreifbare exponierte Verbindungsregion verbunden (Chaponnier et al., 1987, Way und Weeds, 1988). Die Bindung von Actin führt also zu einer Konformationsänderung des Proteins. Hinweise für eine solche Konformationsänderung während der Actin-Gelsolin-Bindung haben auch Weber et al. (1991) und McGough et al. (1998) durch dreidimensionale Rekonstruktion mit Hilfe von Kryo-Elektronenmikroskopie gefunden. Auch die Konformation des Actins wird offensichtlich durch die Bindung des Modulators verändert, denn erst nach der Bindung ist Actin durch die Protease V8 proteolytisch angreifbar. Eine Konformationsänderung des Actins durch die Bindung von Gelsolin konnten auch Khaitlina und Hinssen (1997) durch die Untersuchung von enzymatisch N-terminal verkürztem Actin zeigen. Das verkürzte Actin kann, wenn es Ca^{2+} gebunden hat, selbst nicht polymerisieren, jedoch als 2:1 Komplex mit Gelsolin als Nukleus zur Polymerisation mit intaktem Actin dienen. Die Bindung mit Gelsolin führt also zu einer Konformationsänderung des verkürzten Actins, die eine Bindung mit weiteren Actin-Monomeren möglich macht.

Interessanterweise tritt in der Mischung von Actin und der 43kDa-Variante eine 15kDa-Bande auf, die mit dem anti-P2-Antikörper anfärbbar ist, während sonst kein Fragment dieser Variante von diesem Antikörper erkannt wird. Da neben den intakten Proteinen auch eine Reihe von proteolytischen Fragmenten des zweiten und dritten Aktivitätspeaks mit dem monoklonalen anti-P2-Antikörper anfärbbar sind, wird dieses Epitop eventuell mehrfach innerhalb der Proteine wiederholt.

Ein Hinweis, dass die Aufspaltung in P2 und P3 kein Artefakt ist, stellt die Isolierung einer anderen Kombination von Varianten des Gelsolin-verwandten Proteins aus dem Kaugen dar. Ob die Varianten P2, P3 und P4, die alle ein identisches Laufverhalten in der Gelelektrophorese zeigen, jedoch chromatographisch voneinander trennbar sind, Isoformen darstellen, ist damit noch nicht wirklich nachgewiesen. Erst die gemeinsame Betrachtung der Ergebnisse auf der Proteinebene und auf RNA-Ebene macht es wahrscheinlich, dass es sich tatsächlich um drei weitere Isoformen und nicht nur um eine und ihre posttranslationalen Modifikationen handelt. Es wird dabei davon ausgegangen, dass die sogenannte P2-Sonde auf dem Northern-Blot neben der mRNA von P2 auch mit der von P3 und P4 hybridisiert, da die Anfärbung gut mit den Befunden auf der Protein-Ebene

übereinstimmt: Im Hautmuskelschlauch findet man durch Ionenaustauscher-Chromatographie P2 und P3 und im Kaumagen P3 und P4 - und auf RNA-Ebene wird ebenfalls eine mRNA-Bande von gleicher Länge bei beiden Organen angefärbt, bei der es sich deshalb wahrscheinlich um die mRNA von P3 handelt. Eine solche Kreuzreaktion ist denkbar, denn auch in PCRs konnte gezeigt werden, dass eigentlich P2-spezifische Primer mit cDNA, die für P3 oder P4 codiert, hybridisieren: In der RT-PCR mit Kaumagen-cDNA ließen sich mit den P2-Primern eine Reihe von Fragmenten mit Größen, die für P2 zu erwarten gewesen wären, amplifizieren, obwohl die Modulator-mRNAs im Kaumagen für EWAM-P3 und -P4 codieren sollten. Diese Gruppe von Proteinen scheinen also auf der Nukleotidebene sehr ähnlich zu sein.

Allgemein müssen Längenunterschiede auf RNA-Ebene nicht zwangsläufig zur Translation von unterschiedlichen Proteinen führen, sie können auch durch verschieden lange poly-A-Schwänze entstehen. So sind multiple mRNA-Banden im Skelettmuskel des Hühnchens (Babcock und Fowler, 1994) oder im Herzmuskel der Ratte (Sussman et al., 1994) auf multiple Polyadenylierungssignale in der 3'-nicht-codierenden Region zurückzuführen. In der vorliegenden Untersuchung sind aber im entsprechenden Organ in gleicher Anzahl sowohl auf der Proteinebene Varianten mit unterschiedlichem Elutionsverhalten auszumachen, als auch angefärbte mRNA-Banden. Wahrscheinlich führen daher die drei mRNA-Populationen zur Translation von drei unterschiedlichen Proteinen, was bei einem Unterschied lediglich der Länge des poly-A-Schwanzes nicht der Fall wäre.

Interessanterweise findet keine Kreuzreaktion zwischen den beiden P1- und P2-spezifischen Sonden statt, obwohl die Proteine zu 63% identisch sind. Ganz ähnlich verhält es sich mit den zwei Isoformen von Fragmin, die zu 65% identisch sind und deren Sonden, radioaktiv markierte cDNA-Fragmente von etwa 820bp Länge bei Anwendung vergleichbarer Hybridisierungsbedingungen, ebenfalls nicht im Northern-Blot kreuzreagieren (T`Jampens et al., 1997).

Es ist also festzustellen, dass nicht mit letzter Sicherheit nachgewiesen werden kann, dass mehr als zwei Isoformen existieren. Lediglich die Anfärbbarkeit von drei unterschiedlich langen mRNA-Populationen mit der P2-Sonde und die Übereinstimmung mit den Befunden auf der Proteinebene machen es sehr wahrscheinlich, dass P2, P3 und P4 unterschiedliche, wenn auch sehr ähnliche Proteine darstellen.

Die Funktionen von Isoformen unter besonderer Berücksichtigung von Actin und Gelso- lin-ähnlichen Proteinen

Die Feststellung der Existenz von Isoformen zieht beinahe zwangsläufig die Frage nach der physiologischen Bedeutung einer solchen Heterogenität nach sich. Eine Ursache der Heterogenität gerade von Muskelzellproteinen ist darauf zurückzuführen, dass an diese Zellen innerhalb eines Organismus sehr unterschiedliche Anforderungen gestellt werden. Zum Beispiel müssen einige Muskeln während einer Fluchtreaktion sehr schnell reagieren, während andere Muskeln, etwa jene, die für die Darmperistaltik zuständig sind, viel häufiger aktiv sind, jedoch langsamer kontrahieren, um isotonische Kraft auszuüben. Zur Erfüllung dieser unterschiedlichen Aufgaben sind die Zellen mit unterschiedlichen Isoformen der Muskelproteine ausgestattet. Es existieren daher für nahezu jede myofibrilläre Komponente, sowohl für die Motorproteine als auch für die Strukturproteine, Isoformen, die von Multigen-Familien codiert werden (Schiaffino und Reggiani, 1996). Die Proteine unterscheiden sich häufig nachweislich in mechanischen oder funktionellen Charakteristika, wie etwa Elastizität oder Calcium-Sensitivität.

Da mit EWAM ein Actin-bindendes Protein Gegenstand dieser Arbeit ist, ist die Betrachtung von Actin in diesem Zusammenhang besonders interessant. Zunächst hat Actin keinen offensichtlichen Einfluss auf die Eigenschaften des Muskels: Alle Isoformen besitzen die gleiche Fähigkeit, die Myosin-ATPase zu aktivieren, und verschiedene Actin-Isoformen gleiten in *in-vitro*-Mobilitäts-Untersuchungen mit gleicher Geschwindigkeit über Myosin (Schiaffino und Reggiani, 1996). Ein Einfluss der vorherrschenden Actin-Isoform auf die Kraftentwicklung, Elastizität und Aufrechterhaltung der Spannung konnte jedoch durch Studien an Mutanten für *Drosophila* gezeigt werden (Drummond et al., 1990). Ein weiteres Beispiel für die Beeinflussung der Kraftentwicklung stellt die Untersuchung von Hewett et al. (1994) dar: In Mäuseherzen wird nahezu ausschließlich cardiales α -Actin exprimiert. Herzen von Balb/c-Mäusen dagegen enthalten ebensoviel Skelettmuskel- α -Actin wie cardiales α -Actin. Dies führt dazu, dass an Herzpräparaten von Balb/c-Mäusen die Spannung schneller ansteigt, wobei die Zunahme der Geschwindigkeit korreliert mit der Menge an mRNA für Skelettmuskel- α -Actin. Es wird vermutet, dass die geringen Unterschiede in der Konformation der Actin-Isoformen über Isoactin-spezifische Proteine zu einer Unterscheidung der Isoformen führen, die dadurch in die korrekten Cytoskelett-Strukturen, z. B. Stressfasern, eingebaut werden (Chaponnier et al., 1995, Mounier et al., 1997). In Transfektionsversuchen konnte zur Unterstützung dieser Annahme gezeigt werden, dass eine Reihe von Muskel- und Nicht-Muskelzellen zwischen unterschiedlichen

Actin-Isoformen unterscheiden können und sie an verschiedenen Orten in der Zelle einsetzen (Mounier et al., 1999). In Regenwürmern konnten bislang die Gene von zwei verschiedene Actin-Isoformen sequenziert werden (Lewke und Weber, 1996), es liegen jedoch leider keine Erkenntnisse über unterschiedliche Funktionen der zugehörigen Proteine oder über ihre Lokalisierung vor.

Auch Isoformen von Mitgliedern der Gelsolin-Familie, also Actin-bindenden Proteinen, werden gewebe- oder entwicklungsabhängig exprimiert, was auf unterschiedliche Funktionen hindeutet. Gelsolin-verwandte Proteine, für deren Isoformen eine gewebsspezifische Expression bekannt ist, sind die Plasma- und zellulären Varianten des *Drosophila*- und Vertebraten-Gelsolins (Mensch: Kwiatkowski et al., 1986, Schwein: Way und Weeds, 1988, Pferd: Ruiz-Silva und Burtnick, 1989, *Drosophila*: Heintzelman et al., 1993, Stella et al., 1994) und eine cytoplasmatische Variante der Oligodendrocyten, Gelsolin-3 (Vouyiouklis und Brophy, 1997). Die Plasma-Varianten sind dabei jeweils nur um ein Export-Signal, eine kurze N-terminale Extension von 25 Aminosäuren Länge bei der humanen Form (Kwiatkowski et al., 1988), gegenüber den cytoplasmatischen Proteinen verlängert. Die beide Formen entstehen beim Menschen durch Ausnutzung von alternativen Initiationsstellen der Transkription des gleichen, 70kb langen Gens des Chromosoms 9, Banden q32 q34 (Ozelius et al., 1992). Die Variante der Oligodendrocyten, ebenfalls eine Spleiß-Variante desselben Gens, besitzt eine bisher unbekannte N-terminale Extension von 11 Aminosäuren Länge (Vouyiouklis und Brophy, 1997). Die Autoren diskutieren eine spezielle Aufgabe dieser Isoform bei der Regulierung des Actin-Cytoskeletts: Die cytoplasmatische und die Plasma-Form weisen Unterschiede bei der Organisation ihrer Disulfidbrücken auf, die zu verschiedenen dreidimensionalen Strukturen und dadurch verschiedenen Funktionen bei der Interaktion mit dem Actin-Filament führen könnten. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Gelsolin-3 weist innerhalb der N-terminalen Extension zwei weitere Cysteine als die cytoplasmatische Form auf. Dies könnte zu einer weiteren Komplexität in der Ausbildung der Disulfidbrücken führen und die Funktion des Proteins beeinflussen.

Der Actin-Modulator von *Physarum*, Fragmin, tritt ebenfalls in unterschiedlichen Isoformen auf, wobei FragminP (vollständige Sequenz: T`Jampens et al., 1997) im plasmodialen Stadium und FragminA (T`Jampens et al., 1999) von den Amöben exprimiert wird. FragminA und FragminP sind zu 65% identisch (T`Jampens et al., 1999), sie unterscheiden sich im Molekulargewicht (FragminA: 40kDa, FragminP: 42kDa) und sind immunologisch unterscheidbar (Uyeda et al., 1988). T`Jampens et al. (1997 und 1999) diskutieren

eine unterschiedliche Funktion der beiden Isoformen. Das Cytoskelett insbesondere des Zellcortex von Plasmodien und Amöben ist unterschiedlich organisiert, weshalb den entwicklungsabhängig unterschiedlich exprimierten Actin-bindenden Proteinen eine voneinander abweichende Aufgabe zugesprochen wird. Durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte FragminP in der Nähe der Plasmamembran und in Lobopodien von Mikroplasmodien lokalisiert werden. FragminP übernimmt vielleicht einerseits eine ähnliche Aufgaben wie Gelsolin und ist an den Vorgängen der Bewegung der Zelle beteiligt und dient andererseits im 1:1-Komplex mit G-Actin als Substrat für die Actin-Fragmin-Kinase (AFK), durch die das Actin phosphoryliert wird. In Extrakten von Amöben ist keine AFK-Aktivität nachweisbar, FragminA zeigt eine abweichende Lokalisation und wird mit einem unbekanntem Protein zusammen aufgereinigt, weshalb eine abweichende aber noch unbekannt Funktion dieses Proteins anzunehmen ist.

Die Lokalisation der Isoformen des EWAM im Gewebe und innerhalb von Muskelzellen

Da ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung stand, der nicht mit der ersten Isoform kreuzreagierte, war es möglich, durch indirekte Immunfluoreszenz Aussagen über die Lokalisation jener Gruppe von EWAM-Isoformen zu machen, die mit diesem Antikörper anfärbbar sind.

Die Anfärbung von Gefrierschnitten mit gegen P2 gerichtetem Antikörper führte zu einer besonders starken Markierung der peripheren Bereiche der Längs- und Ringmuskelschicht des Hautmuskelschlauchs und des gesamten Kaumagens. Dieses Verteilungsmuster ähnelt sehr stark dem, das für die leichten Ketten des Myosins beschrieben wurde (D`Haese und Carlhoff, 1987, Carlhoff und D`Haese, 1987). An den Orten der P2-Markierung konnte damals die leichte Kette mit 28kDa Masse (LC 28) nachgewiesen werden. Diese Muskelzellen waren auch aufgrund ihrer Enzymausstattung von den anderen Muskeln unterscheidbar: Durch histochemische Anfärbungen konnten eine niedrige Myosin- und Actomyosin-ATPase- und eine hohe Succinat-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden (D`Haese und Carlhoff, 1987, Carlhoff und D`Haese, 1987). Eine solche Enzymausstattung ist ein typisches Kennzeichen langsam kontrahierender Muskeln (Brooke und Kaiser, 1970, Burke et al., 1971, Mabuchi und Sréter, 1980). Die Zellen der peripheren Bereiche der beiden Hautmuskelschlauch-Schichten und der Kaumagen wurden daher als langsam kontrahierende Muskelzellen eingestuft. Der periphere Bereich macht etwa nur ein Sechstel des gesamten Hautmuskelschlauchs aus, was sich auch in den relativen Mengen bestimmter Muskelproteine (z. B. der Myosin-Isoformen), die jeweils nur in den peripheren

bzw. den zentraleren Muskelzellen exprimiert werden, widerspiegelt (D'Haese und Carlhoff, 1987). Erstaunlicherweise ist eine solche Mengenverteilung bei der Isolierung der Varianten des EWAM nicht zu beobachten: P2 und P3 sind in mindestens der gleichen Menge isoliert worden wie P1, wie ein Vergleich der Flächen der Aktivitätspeaks zeigt. Vermutlich werden P2 und P3 also auch in den zentraleren Anteilen der Muskelschichten exprimiert, wenn auch in geringerem Maße. Das ist möglich, denn in der Immunfluoreszenz waren diese Bereiche niemals vollkommen ungefärbt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass eventuell durch die Art der Isolierung eine Isoform bevorzugt isoliert wird, etwa weil sie nicht so fest mit dem Cytoskelett assoziiert vorliegt, während die andere Isoform schon bei der ersten Zentrifugation mit dem Cytoskelett zusammen sedimentiert wird.

Neben dem Hautmuskelschlauch und dem Kaumagen wurden auf den Gefrierschnitten weitere Muskelzellen stark angefärbt. Auch diese Muskelzellen gehören wahrscheinlich zum langsam kontrahierenden Typ. Untersuchungen bezüglich der leichten Ketten oder ihrer Succinatdehydrogenase- oder ATPase-Aktivität liegt zwar nicht vor, aber ihre Funktion spricht gegen eine Zugehörigkeit zum schnell kontrahierenden Typ. Stark mit dem anti-P2-Antikörper anfärbbar waren Dissepimente, ein Teil der Hülle des Bauchmarks, alle Muskellagen der Gefäße und die Darmmuskulatur.

Aus den vorne und hinten aneinanderstoßenden Coelomwänden benachbarter Segmente entstehen während der Embryogenese des Wurmes die Dissepimente. Ein Dissepiment besteht daher aus zwei Lagen von Muskelzellen (den Coelothelien), die einer zentralen Basallamina aufgelagert sind. Die Muskelzellen sind ringförmig angeordnet, denn sie dienen als Sphinkter einer Öffnung, die sich um das Bauchmark und Ventralgefäß herum befindet, und kontrollieren dort die Passage von Flüssigkeiten und Partikeln (Peters und Walldorf, 1986 a). Eine andere stark gefärbte Struktur ist die dreischichtige Hülle des Bauchmarks. Angefärbt wurde hier eine Schicht aus Längsmuskeln, deren Zellen parallel zur Längsachse des Bauchmarks orientiert sind (Peters und Walldorf, 1986 a). Es wird vermutet, dass die Muskelschicht die Nerven vor Druck, Stauchung oder Dehnung während der Bewegung des Wurms aktiv schützt (Peters und Walldorf, 1986 a).

Das Dorsalgefäß und etwas abgeschwächt auch das Subneuralgefäß in der Bauchmarkshülle wiesen in Gefrierschnitten stets eine besonders kräftige Anfärbbarkeit mit dem anti-P2-Antikörper auf. Die Gefäß- und Kapillarwände des geschlossenen Blutgefäßsystems des Regenwurms bestehen aus einer kontinuierlichen Lage von Endothelzellen. Diese sind in den einzelnen Gefäßen in unterschiedlichem Maße mit Myofilamenten versehen (Peters

und Walldorf, 1986 a, Jamieson, 1981). Die Myoendothelzellen des Dorsalgefäßes und der Lateralgefäße, der Motoren des Gefäßsystems, enthalten besonders viele, in Längsrichtung des Gefäßes orientierte Myofilamente. Bei dem Dorsalgefäß liegt zusätzlich außerhalb des Endothels eine Ring- und darüber eine weitere Längsmuskelschicht.

Die Wand des auf den Kaumagen folgenden Mitteldarmes besteht zwischen Chloragog und Darmepithel aus einer dünnen Schicht Muskel, und zwar einer äußeren Längs- und einer inneren Ringmuskelschicht, die ebenfalls gut mit dem anti-P2-Antikörper angefärbt werden konnten. Diese Muskulatur dient dem Weitertransport der Nahrung während der Darmpassage durch peristaltische Bewegungen des Darmes, analog zu der glatten Muskulatur des Darmes der Vertebraten.

In der Organisation der Myofilamente des Regenwurmes existieren strukturelle Unterschiede zwischen schnellen und langsamen Muskelzellen (z. B. sind die Myosinfilamente unterschiedlich dick), die sich in Unterschieden der molaren Verhältnisse der kontraktilen Proteine (Myosin, Paramyosin und Actin) zwischen Hautmuskelschlauch und Kaumagen äußern (Carlhoff und D'Haese, 1987). Bei solchen Unterschieden in der Zusammensetzung der Myofilamente ist es nicht verwunderlich, wenn auch die Actin-Modulatoren als eng mit dem Cytoskelett assoziierte Komponenten eine Variabilität zwischen den Muskeltypen zeigen. Es ist eher verwunderlich, dass dies in der hoch differenzierten Vertebratenmuskulatur, die funktionsangepasste Variationen der Muskelzellen zwischen quergestreiften und glatten Muskeln aufweist, nicht der Fall ist, denn das Gelsolin beispielsweise des quergestreiften und des glatten Muskels ist identisch.

Neben der Lokalisation der mit dem anti-P2-Antikörper anfärbbaren Isoformen innerhalb von Geweben wurden auch Untersuchungen der Lokalisation dieser Isoformen innerhalb von isolierten Zellen durchgeführt.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist eine Bindung des Gelsolin-verwandten Proteins EWAM an F-Actin sehr wahrscheinlich, denn der Modulator wurde trotz der Permeabilisierung der unfixierten Zellen an den dünnen Filamenten lokalisiert.

Ergebnisse von Untersuchungen, die sich mit der Lokalisation von Gelsolin in Zellen befassen, sind häufig widersprüchlich. Cooper et al. (1988) etwa fanden Hinweise dafür, dass Gelsolin in Zellen einer Maus-Fibroblasten-Zelllinie nicht fest an Actin gebunden vorliegt: Injiziertes fluoreszierendes Gelsolin diffundiert vollkommen frei in den Fibroblasten, und Gelsolin war mit einer Lösung aus u. a. 0,1% Triton und 1mM EGTA nahezu vollständig aus den Zellen extrahierbar, was im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Un-

tersuchung steht. Phalloidin als Positivkontrolle der Injektionsversuche war vollständig immobil, während Hundeserum-Albumin, die Negativkontrolle, sich wie Gelsolin verhielt. Nur durch das Fixieren der Zellen ist nach Cooper et al. (1988) Gelsolin an F-Actin lokalisierbar, da kurzzeitig assoziiertes Gelsolin durch das Fixans fest an das Actin gebunden wird. In fixierten und anschließend permeabilisierten Zellen war Gelsolin an Stress-Fasern, in den cortikalen Zonen und als granuläre cytoplasmatische Komponente anfärbbar. Allerdings konnten Cooper et al. (1988) auch durch Mikroinjektion von Antikörpern gegen Gelsolin in lebende Zellen Stress-Fasern anfärben, was der Hypothese widerspricht, dass Gelsolin eine sehr niedrige Affinität zu filamentösem Actin aufweist. Dem Argument der Autoren, dass die freie Diffusion von Gelsolin eine Interaktion mit F-Actin ausschließt, ist entgegenzuhalten, dass eventuell Gelsolin an Actin-Oligomere oder kurze Actin-Filamente gebunden ist und dann die Diffusion nicht messbar eingeschränkt wird. Solche Oligomere, die bei der Injektion von zusätzlichem Gelsolin (0,5-1 μ M bei einer endogenen Konzentration von 1-4 μ M) durch Störung des in der Zelle herrschenden Gleichgewichts möglicherweise unnormal häufig sind, wären wahrscheinlich extrahierbar und führten zu dem gemessenen großen Anteil an „löslichem“ Gelsolin. Auch Schoepper und Wegner (1992) konnten mit Hilfe einer *in-vitro*-Messung der Fluoreszenz von Gelsolin eine geringe Assoziation mit Actin-Filamenten feststellen, die der der Assoziation mit G-Actin ähnlich war. Auch hierfür könnte eine Bindung von Gelsolin an Actin-Oligomere eine Erklärung sein. Teuber et al. (1994) dagegen fanden mit Hilfe von Immunfluoreszenz (allerdings an fixierten Objekten), dass Gelsolin in glatten Muskelzellen des Maus-Ovars fest mit F-Actin assoziiert vorliegt. Auch Rouayrenc et al. (1984) hatten die Lokalisation von Gelsolin in Muskelgeweben untersucht. Eine feste Assoziation des aus Herzmuskel isolierten Modulators mit den Myofilamenten legten Versuche mit Immunoblots und SDS-PAGE-Analysen nahe. Hierzu wurden Herzmuskel-Extrakte bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0,05-1M KCl) hergestellt und Pellets und Überstände mit SDS-PAGE und Western-Blots untersucht. Danach ist Gelsolin des Herzmuskels keine völlig lösliche Komponente, die Löslichkeit aus den Myofibrillen ist vielmehr abhängig von dem Salzgehalt, aber unabhängig von der Ca²⁺- oder EGTA-Konzentration. Bei niedrigem Salzgehalt bleibt Gelsolin an die unlösliche Myofibrillen-Fraktion, die aus dem größten Teil des Actin, Myosin, Tropomyosin und Troponin besteht, gebunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die schräggestreiften Muskelzellen des Regenwurmes eine Lokalisation des Actin-Modulators in der I-Z-I-Region ermittelt, was mit Untersuchungsergebnissen früherer Arbeiten übereinstimmt. In quergestreiften Muskeln unter-

schiedlicher Organismen wurde Gelsolin in der I-Z-I-Region lokalisiert: Im quergestreiften Vertebratenmuskel (Dißmann und Hinssen, 1994, Gonsior und Hinssen, 1995), im quergestreiften Teil des Adduktormuskels der Jakobsmuschel *Pecten jacobaeus* (Remmert und Hinssen, 1996), in der Schwanzmuskulatur des Flusskrebsses *Astacus leptodactylus* (Bock et al., 1994). Auch in Glattmuskelzellen scheint Gelsolin mit den Actin-Filamenten assoziiert zu sein, da eine homogene Verteilung des Gelsolins in den glatten Anteilen des Adduktormuskels von *Pecten* (Remmert, 1999) und in glatter Muskulatur des Huhns (Gonsior, 1997) gezeigt werden konnte, was der nicht-periodischen Verteilung des Actins in glatten Muskelzellen entspricht. Gelsolin bleibt auch dann noch fest an die Actin-Filamente gebunden, wenn die Ca^{2+} -Konzentration unter 10^{-6} sinkt (Rouayrenc et al., 1984, Dißmann und Hinssen, 1994). Gelsolin-verwandte Proteine in Muskeln scheinen also nicht nur das schnellwachsende Ende des F-Actins zu cappen, eine Aufgabe, die ohnehin CapZ in Muskeln zugesprochen wird. Die Kolo-kalisation mit F-Actin macht vielmehr eine laterale Assoziation an die dünnen Filamente ohne ein Schneiden wahrscheinlich, wie es für Vertebraten-Muskeln angenommen wurde (Dißmann und Hinssen, 1994). Es kann allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass ein Schneideprozess stattfindet, die Fragmente jedoch mit Hilfe anderer Actin-bindender Proteine an ihrem Platz verbleiben (Gonsior und Hinssen, 1995). Im gereizten Muskel sollte der Ca^{2+} -Influx jedenfalls die Schneide-Aktivität von Gelsolin aktivieren. Es muss also ein Mechanismus existieren, der die Fragmentation der Actin-Filamente verhindert. Die Fragmentation könnte durch Actin-assoziierte Proteine wie Nebulin und Tropomyosin verhindert werden (Dißmann und Hinssen, 1994). Tropomyosin findet sich in nahezu allen eukaryontischen Zellen, wo es lateral an Actin-Filamente bindet (Pittenger et al., 1994). Eine Ca^{2+} - und pH-unabhängige Interaktion von Gelsolin und Tropomyosin wurde beschrieben (Koepf und Burtnick, 1992, Maciver et al., 2000). Der Schutz des F-Actin durch Tropomyosin vor dem Schneiden durch Makrophagen-Gelsolin konnte gezeigt werden (Fattoum et al., 1983). Gonsior und Hinssen (1995) halten jedoch Nebulin für den wahrscheinlicheren Kandidaten: Nach der Entfernung von Tropomyosin und dem Verbleib von Nebulin in der Zelle ist Gelsolin immer noch nicht in der Lage, die Actin-Filamente im quergestreiften Muskel abzubauen.

Die Sequenz einer zweiten Isoform des EWAM

Die Sequenzierung einer zweiten EWAM-Variante sollte Sicherheit bringen, dass tatsächlich mehrere Isoformen mit signifikant unterschiedlichen Sequenzen existieren. Das Plaque-Lifting der Hautmuskelschlauch-cDNA Genbibliothek und das anschließende

Screening mit monoklonalem anti-P2-Antikörper brachte keine positiven Resultate. Im Nachhinein ist dies erklärbar durch das Auftreten eines Stop-Codons in der 5'-nicht-codierenden Region der mRNA von EWAM-P2. Genau vor dem gleichen Problem hatte bereits Giebing (1994) gestanden, denn auch die mRNA von EWAM-P1 weist hier ein Stop-Codon auf. Auch die Hybridisierung von Plaque-Liftings mit DIG-markierter EWAM-P2-Sonde führte nicht zur Isolierung eines positiven Klon. Lediglich ein für EWAM-P1 codierender Klon konnte auf diese Weise gewonnen werden, während auf die gleiche Art mit einer Actin-spezifischen Sonde eine Reihe von Klonen gefunden wurde. Es scheint, als ob die cDNA für EWAM-P2 in der Lambda-ZAP-Genbibliothek des Hautmuskelschlauchs von *L. terrestris* unterrepräsentiert wäre. Möglich ist, dass die mRNA der P2-ähnlichen Proteine eine Sekundärstruktur ausbilden, die während der reversen Transkription nicht aufgelöst wird. Es entsteht dann nur eine verkürzte cDNA, die entweder zu kurz ist, um in den Vektor inseriert zu werden oder nicht mit der verwendeten Sonde hybridisiert. Ein Hinweis auf das Entstehen solcher verkürzter cDNA-Klone ist das Auftreten von nur 250bp langen Fragmenten (bei einer zu erwartenden Länge von mindestens 1kbp plus 3'-nicht-codierende Region) beim 3'-RACE, dem ebenfalls eine reverse Transkription zugrunde liegt. Eine andere, wenn auch unwahrscheinlichere Erklärung wäre ein besonderer physiologischer Zustand der Würmer beim Anlegen der cDNA-Genbibliothek, der die Expression der gesuchten mRNA unterdrückte. Ebenfalls nicht besonders wahrscheinlich ist, dass beim Anlegen der Genbibliothek ein spezieller Bereich des Hautmuskelschlauchs zur Isolierung der RNA eingesetzt wurde, in dem besonders wenig P2-ähnliche Proteine exprimiert werden.

Die gesuchte Isoform war aber, wenn auch unterrepräsentiert, in der Genbibliothek vorhanden, denn mit Hilfe der PCR konnte schließlich die Sequenz einer zweiten Isoform entschlüsselt werden.

Ein Actin-Modulator-Klon war bereits durch Screening der cDNA-Genbibliothek des Hautmuskelschlauchs isoliert und vollständig sequenziert worden (Giebing et al., 1994). Die Herstellung der Sonden erfolgte mit Hilfe der PCR. Die notwendigen Sequenzinformationen zum Primerdesign beruhten auf den Ergebnissen der Sequenzierung von Lys-C-Peptiden des zweiten Aktivitätspeaks (Tabelle 4.1). Die sequenzierte Isoform wurde trotzdem als EWAM-P1 identifiziert. Die Identifizierung beruhte auf der Feststellung, dass die abgeleitete Aminosäuresequenz nicht die sequenzierten Peptide enthielt, aber durch Vergleich mit anderen Modulatoren als Gelsolin-verwandtes Protein erkannt wurde. Als nicht-

P2 konnte es sich also nur um P1 handeln. Die jetzt zur Verfügung stehenden Informationen weisen jedoch darauf hin, dass es drei EWAM-Varianten im Hautmuskelschlauch gibt und nicht nur die Alternative zwischen zwei Isoformen, so dass sich die Frage nach der Identität des damals sequenzierten Proteins erneut stellt. Alles spricht dafür, dass P1 wirklich P1 ist, während in der vorliegenden Arbeit ein Protein aus der Gruppe P2 bis P4 sequenziert wurde: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die gefundenen Varianten in zwei Gruppen einteilen lassen, nämlich P1 auf der einen und P2 bis P4 auf der anderen Seite. Das wird dadurch deutlich, dass der monoklonale anti-P2-Antikörper P2 bis P4 markiert, nicht jedoch P1 und die DNA-Sonden jeweils entweder nur P1 oder nur P2 bis P4 erkennen. Die Sequenz, die von Giebing (1994) für P1 gehalten wurde, unterscheidet sich zu beinahe 40% von der nun gefundenen Sequenz, beide gehören also zur jeweils anderen Gruppe von Isoformen. Die neu sequenzierte Isoform enthält wiederum die Lys-C-Peptide und muss damit zur Gruppe der P2-ähnlichen Isoformen gerechnet werden.

Die Ähnlichkeit der Varianten P2 und P3 wirft die Frage auf, welche Isoform, EWAM-P2 oder EWAM-P3, die ja beide in der Genbibliothek des Hautmuskelschlauches zu erwarten sind, in der vorliegenden Arbeit sequenziert wurde. Mit den hier angewendeten Untersuchungsmethoden ist hierauf keine Antwort zu geben.

Es ist möglich, dass mit den beiden unterschiedlich langen PCR-Fragmenten, die das 5'-Ende darstellen, zwei Anfänge für verschiedene Isoformen aus der Genbibliothek amplifiziert worden sind. Hierfür sprechen auch die Unterschiede in der nicht-codierenden und codierenden Sequenz, wobei bei letzteren interessanterweise stets das letzte Nukleotid eines Triplets betroffen ist, so dass kein Aminosäuren-Austausch auftritt.

Im Vorfeld des Screenings der Genbibliothek nach EWAM-Klonen wurden, wie erwähnt, Lys-C-Fragmente des chromatographisch gereinigten EWAM-P2 sequenziert (Giebing et al., 1994). Eine leichte Abweichung dieser Sequenzen von der in der vorliegenden Arbeit abgeleiteten Aminosäuresequenz würde dafür sprechen, dass nicht P2, sondern P3 sequenziert wurde. Es zeigt sich jedoch, dass fast nur entweder Übereinstimmungen (was für eine Identität mit der hier sequenzierten Isoform spricht) oder starke Abweichungen festzustellen sind. Die Abweichungen sind hierbei so groß, dass die mRNA nicht so ähnlich wäre, dass sie von der gleichen Sonde erkannt wird, und sicherlich die immunologischen, proteolytischen und Laufeigenschaften der Proteine sich stärker unterscheiden würden. Die Unterschiede zwischen den sequenzierten Peptiden und der gefundenen Sequenz sind also eher auf Ungenauigkeiten bei der nur einmal durchgeführten Peptidse-

quenzierung zurückzuführen, als dass es sich im einen Fall um P2 und im anderen um P3 handelte.

Tabelle 4.1: Sequenzierte Lys-C-Peptide des zweiten Aktivitätspeaks (Giebing et al., 1994)

	Peptid-Analyse	in P2 gefundene Sequenzen
Fraktion 10 (Misch- fraktion!)	KVAAW <u>G</u> YA	<u>KVAAWG</u> und <u>-GIAK</u> gibt es nicht!!
	HS <u>Q</u> LMK	
	KRNGL <u>G</u> IAK	KRNGL <u>G</u> YAH <u>S</u> HLMK
Fraktion 23	KIWRIVNFK	KIWRIVNFK
Fraktion 25	KGREELAYDVHFWIGSK	KGREELAYDVHFWIGSK
Fraktion 27	K <u>G</u> YGSFFSGDSYIILNTYK	K <u>D</u> YGSFFSGDSYIILNTYK
Fraktion 30	KSDDVFILDLGRTLYQWNGTGSNK	KSDDVFILDLGRTLYQWNGTGSNK

Unterschiede sind unterstrichen und durch Fettschreibung hervorgehoben. Die meisten Unterschiede finden sich in der Fraktion 10. Fraktion 10 enthielt 2 Peptide, darum sind die Sequenzen nicht als sicher anzusehen. Die letzten 6 Aminosäuren, die rechts zwischen den beiden Fragmenten notiert sind, konnten keinem der beiden Peptide eindeutig zugeordnet werden (Thiele, 1991). Vernachlässigt man diese Fraktion, dann bleibt als einziger Unterschied der des Austausches von Glycin und Aspartat in Fraktion 27. Die Lage dieser Aminosäure am amino-terminalen Ende des Peptides spricht für eine korrekte Sequenzierung, da die Sequenzanalyse als schrittweiser Abbau vom N-Terminus nach dem Edman-Chemismus erfolgte. Dieser Austausch ist also ein (aber noch nicht ausreichender) Hinweis dafür, dass die hier gefundene DNA-Sequenz die von EWAM-P3 ist.

Für Fehler bei der Proteinsequenzierung von Fraktion 10 spricht auch, dass bei der Verwendung einer Peptidsequenz zur Konstruktion eines PCR-Primers keine P2-spezifischen Amplifikate erhalten wurden. Das Peptid VAAWGYAHSQLMK war ab AS 325 der ersten Isoform gegenübergestellt worden (Giebing, 1994). Dies entspräche einer Position kurz vor Ende der codierenden Sequenz. Es ergab sich für den Primer anti-VAAWG:

AS des Peptids: V A A W G Y A H
 abgeleitete Basen : ³ GTC GCA GCI TGG GGA TAT GCI CA⁵

Als sense-Primer wurde zunächst GREEL benutzt und mit FENGL und anti-VAAWG reamplifiziert, Template war Kaumagen-cDNA. Bei der elektrophoretischen Auftrennung des PCR-Ansatzes der ersten Runde waren eine große Anzahl von Banden erkennbar, deren Reamplifikation in der semi-nested-PCR ein Amplifikat von etwa 400bp ergab. Zu erwarten gewesen wäre ein Amplifikat von etwa 600bp Länge. Das Amplifikat wurde

trotzdem sequenziert, und mit der Sequenz wurde die SWISS-Prot-Datenbank durchsucht. Unter den als ähnlich identifizierten Sequenzen befand sich kein Protein der Gelsolin-Familie.

Eine Lösung der Frage, zu welcher Isoform die sequenzierten PCR-Fragmente gehören, wurde auch von einem von Giebing (1994) ansequenzierten Klon erhofft. Im Rahmen der Arbeit von Giebing (1994) wurde mit Hilfe der PCR mit den Primern KIWRI und anti-FILD, die in stark konservierten Bereichen der Modulatoren hybridisieren, Amplifikate hergestellt. Die Amplifikate sollten also ein Gemisch aus Sequenzen mehrerer Isoformen darstellen. Sie wurden daher einkloniert, um die einzelnen DNA-Fragmente des Gemisches voneinander zu trennen und anschließend zu sequenzieren. Das Insert eines Klons, Klon L, zeigte eine Übereinstimmung mit einer C-terminalen Region von P1 (von Aminosäure 265 bis 303), und es wurde vermutet, dass es sich um ein Fragment der Isoform EWAM-P2 handeln könnte. Diese Vermutung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Sequenz weicht auch zu stark von der hier gefundenen P2-Sequenz ab, als dass es sich um die Isoform P3 handeln könnte. Das schließt nicht die Möglichkeit aus, dass Klon L das Fragment einer anderen, bis jetzt noch nicht identifizierten EWAM-Isoform darstellt oder das Fragment eines anderen Proteins aus der Gelsolin-Familie ist, z. B. Villin oder Adseverin.

Im Folgenden wird die sequenzierte Isoform als P2 angesprochen. Die Sequenzunterschiede zwischen P2 und P3 sind nach allen bisherigen Untersuchungen ohnehin nur als gering anzusehen. Der Genauigkeit halber wird an problematischen Stellen von den „immunologisch wie P2 reagierenden Modulator-Varianten“ gesprochen.

Eine Möglichkeit, um diese Frage zu klären, wäre es, die gesamte Sequenz zu amplifizieren, in einen Expressionsvektor einzuklonieren und das exprimierte Protein wiederum über Eich-Säulen zu eluieren. Oder es könnten, unter der Annahme, dass der Aminosäureaustausch der Lys-C-Peptid-Fraktion 27 kein Artefakt ist, Antisense-Primer hergestellt werden, deren 3'-Enden durch die entsprechenden Basen, die für Glycin bzw. Aspartat codieren, gebildet werden. Dieser Unterschied sollte ausreichen, um spezifische Amplifikate herzustellen, denn die Taq-DNA-Polymerase ist auf eine exakte Hybridisierung des 3'-Endes des Primers angewiesen. Eine andere Möglichkeit, die mit relativ wenig Aufwand verbunden ist und in Kürze in Angriff genommen werden wird, ist die Sequenzierung von PCR-Amplifikaten der Kaumagen-cDNA mit P2-spezifischen Primern. Diese Fragmente lassen sich bislang nicht direkt sequenzieren, wahrscheinlich, weil es sich um ein Gemisch aus P3- und P4-DNA handelt. Werden die PCR-Produkte jedoch einkloniert und einzelne

Bakterien-Klone herangezuchtet, so muss das Bakterien-Plasmid als Insert entweder P3- oder P4-DNA enthalten. Ist eine der beiden Sequenzen identisch mit der in dieser Arbeit auf DNA-Ebene entschlüsselten Isoform, so handelt es sich hierbei um P3.

Die Sequenzinformationen machten die Ableitung der Aminosäuresequenz eines Gelsolin-verwandten Proteins möglich. Ähnlich wie bei den 40kDa-Modulatoren Fragmin und Severin konnte die auffällige Zusammensetzung aus drei Domänen oder Segmenten mit sich wiederholenden Motiven B, A und C (Way und Weeds, 1988) gezeigt werden. Die Konservierung innerhalb der Motive ist nicht vollständig, es wird jedoch im Wesentlichen der Charakter der entsprechenden Aminosäuren beibehalten. Im dritten Segment ist die Variabilität, wie auch bei Fragmin und Severin, am größten, denn auch EWAM hat in diesem Bereich seinen C-Terminus, weshalb die Konservierung vermutlich nicht mehr so hoch ist.

Die Analyse der beiden EWAM-Sequenzen zeigte weiterhin, dass es sich tatsächlich um zwei unterschiedliche Varianten von Gelsolin-verwandten Proteinen handelt. Die beiden Sequenzen von P1 und P2 unterscheiden sich voneinander um nahezu 40%. Die Motive des ersten Segments, die wichtig zum Aufbau der dreidimensionalen Gestalt und zur Bindung des Actins sind (McLaughlin et al., 1993), weisen aber eine besonders große Ähnlichkeit in beiden Sequenzen auf. Die β -Faltblätter 1-3 sind zu 100% identisch, nur β -Faltblatt 4 unterscheidet sich in vier von sieben Aminosäuren, wobei sie jeweils von Aminosäuren mit ähnlichem Charakter ersetzt werden. Da im Ergebnisteil bereits ausführlich auf die Lokalisation der funktionell wichtigen Domänen in den EWAM-Isoformen eingegangen worden ist, wird hier dieser Aspekt nur kurz besprochen. Die potentielle zweite G-Actin-Bindungsstelle des EWAM, von der angenommen wird, dass sie sich im zweiten Segment befindet (Giebing et al., 1997), könnte möglicherweise zwischen den Aminosäuren 101/102 bis 116/117 lokalisiert sein. Hierfür spricht, dass sich hier ein Cluster ähnlicher Aminosäuren findet, wenn das zweite Segment von EWAM mit dem vierten Segment von Gelsolin verglichen wird. Die Ähnlichkeit ist dabei deutlich größer zum Gelsolin als zu den Schleimpilz-Modulatoren Severin und Fragmin. Beim Gelsolin wurden die entsprechenden Aminosäuren des zweiten Segments bereits mit der Bindung von F-Actin in Verbindung gebracht (Burtnick et al., 1997), so dass sie im EWAM eine Doppelfunktion ausüben könnten. Diese Doppelfunktion muss für ein Protein, das nur zwei Actin-Bindungsstellen besitzt, aber trotzdem sowohl nukleieren als auch F-Actin schneiden kann (D'Haese und Hinssen, 1987), ohnehin gefordert werden.

Die Identität von EWAM zur N-terminalen Hälfte von humanem Gelsolin beträgt über die Gesamtsequenz von EWAM betrachtet ca. 30% (Giebing, 1994). Die wahrscheinlich funktionell wichtigen Stellen sind überdurchschnittlich stark konserviert in den betrachteten Proteinen (Tabelle 4.2). Lediglich die PIP₂-/F-Actin-Bindungsstelle liegt mit ca. 25% Identität unter dem Durchschnittswert. Diese Stelle bindet, wie im Ergebnisteil besprochen, im EWAM wahrscheinlich kein PIP₂.

Tabelle 4.2: Vergleich der funktionell wichtigen Stellen von humanem Gelsolin (McLaughlin et al., 1993, Burtnick et al., 1997) mit den durch Sequenzvergleich identifizierten entsprechenden Stellen der Isoformen von EWAM und Vergleich dieser Stellen von EWAM-P1 und -P2 untereinander

	G-Actin-Bindungsstelle	PIP ₂ -Bindungsstelle	PIP ₂ - / F-Actin-Bindungsstelle	F-Actin-Bindungsstelle
Vergleich Gelsolin – P1	48,5% Identität (16 von 33)	50% Identität (9 von 18)	25/23,1% Ident. (3 von 12/13)	39,3/36,7% Id. (11 von 28/30)
Vergleich Gelsolin – P2	45,5% Identität (15 von 33)	50% Identität (9 von 18)	25/23,1% Ident. (3 von 12/13)	42,9/40% Ident. (12 von 28/30)
Vergleich P1 – P2	72,7% Identität (24 von 33)	72,2% Identität (13 von 18)	69,2% Identität (9 von 13)	64,3% Identität (18 von 28)

Aus dem Laufverhalten in der SDS-PAGE wurde von D`Haese und Hinssen (1987) auf das apparente Molekulargewicht geschlossen. Für P1 ergab sich ein Wert von ca. 43 kDa und für P2 ein Wert von ca. 45 kDa. Das aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht beträgt für P1 jedoch ca. 41,5 kDa und für P2 ca. 40,9 kDa, also ist P2 kleiner als P1.

Das Gelsolin-verwandte Protein aus dem Schwanzmuskel des Hummers (Lück, 1994) besitzt ein noch stärker von dem apparenten Molekulargewicht von ca. 100kDa abweichendes relatives Molekulargewicht von nur ca. 83,5kDa. Auch das etwa gleichgroße *Drosophila*-Gelsolin zeigt ein apparentes Molekulargewicht von 102kDa (Stella et al., 1994). In beiden Fällen wird die Diskrepanz mit dem hohen Anteil von negativ geladenen Aminosäuren erklärt, die die verringerte Mobilität im SDS-Gel verursachen. Ein solcher Überschuss ist bei EWAM nicht vorhanden, was auch der isoelektrische Punkt von ca. 6,1 im Gegensatz zum IEP des Hummer-Gelsolins von ca. 5 zeigt. Warum EWAM-P2 also eine verringerte Mobilität im SDS-Gel gegenüber EWAM-P1 aufweist, bleibt noch zu klären.

Mindestens zwei Gene codieren für die unterschiedlichen Isoformen des EWAM

In der vorliegenden Arbeit konnte nach den Fragmin-Isoformen (T`Jampens et al., 1999) zum zweiten Mal die Existenz von zwei unterschiedlichen Genen, die dann eine Gen-Familie darstellen, für die Produktion von zwei Varianten eines Gelsolin-artigen Proteins gezeigt werden. Die vielen kurzen Cluster von identischen und nicht identischen Aminosäuren sprechen gegen zwei Spleiß-Produkte eines Gens. Das Gen für das Troponin T (TnT) des schnellen Skelettmuskels beispielsweise weist fünf aufeinanderfolgende Exons auf, die beim Spleiß-Vorgang frei miteinander kombiniert werden können, so dass 32 (2^5) unterschiedliche reife mRNAs und damit auch unterschiedliche Aminosäuresequenzen in der betroffenen Domäne des Proteins erscheinen können (Breitbart et al., 1985). Diese Exons gehören dabei mit 12 bis 18 Nukleotiden Länge zu den kleinsten bekannten (Breitbart et al., 1987). Das gesamte Protein besitzt eine Länge von mindestens 234 und höchstens 259 Aminosäuren, das Gen enthält insgesamt maximal 18 Exons. Nimmt man an, dass die beiden EWAM-Isoformen, die beide etwa 360 Aminosäuren lang sind, Spleiß-Produkte desselben Gens sind, dann lassen sich bereits 72 (!) konstitutive Exons (d. h. auf jeden Fall als Exon aus der prä-mRNA zur Produktion der reifen mRNA herausgespleißte Sequenzabschnitte) durch Abzählen der in beiden Isoformen identischen Abschnitte bezeichnen, wobei über 20 nur drei Nukleotide Länge aufweisen, hinzu kämen eine auf diese Weise nicht bestimmbar Anzahl an alternativ gespleißten Exons. Ein solcher Aufbau eines Genes ist bis jetzt nicht beschrieben worden. Die unterschiedliche 5`-terminale nicht-codierende Region dagegen spricht nicht unbedingt gegen das Entstehen der beiden Proteine durch alternatives Spleißen. Alternative 5`-terminale Exons können auch die nicht-codierenden Regionen umfassen (Breitbart et al., 1987). Das Gen der alkalilabilen Myosin-leichten Ketten (MLC) 1 und 3 sind ein gut beschriebenes Beispiel eines solchen sich gegenseitig ausschließenden Spleiß-Vorganges, der dazu führt, dass die 5`-nicht-codierenden Sequenzen der MLC 1 und 3 sich vollständig unterscheiden (Strehler et al., 1985).

Mit Hilfe von PCRs mit genomischer DNA konnte schließlich gezeigt werden, dass zumindest P1 und ein P2-ähnliches Protein von zwei Genen codiert werden. Die PCR-Versuche zeigten, dass der für P1 codierende DNA-Abschnitt mindestens ein längeres Intron in der 3`-seitigen Hälfte der Sequenz enthält. Mit den Primern, die für P2 spezifisch sind, wurden mehrere Banden erhalten, darunter auch immer eine, die der zu erwartenden Länge bei Einsatz von cDNA als Template entsprach. Das heißt, dass mindestens ein P2-Gen kein

Intron enthält. Die anderen mit diesen Primern erhaltenen Banden könnten auf das Vorhandensein von Genen für die anderen P2-nahen Isoformen zurückzuführen sein. Eine Hybridisierung der eigentlich für P2-spezifischen Primer konnte bereits bei der erfolgreichen Amplifikation von Modulator-Fragmenten mit Kaumagen-cDNA (der ja nur P3 und P4 enthält) gezeigt werden. Es ist als glücklicher Umstand anzusehen, dass ein P2-Gen kein Intron zu enthalten scheint, denn die meisten Gene, gerade auch die für Proteine des kontraktilen Apparates codierenden, enthalten Introns (Breitbart et al., 1987).

Ein Rückschluss auf die Zahl der Genorte und damit die Bestätigung der Existenz einer Multigen-Familie von EWAM-Isoformen wäre mit Hilfe eines Southern-Blots mit verschieden gedauter genomischer DNA möglich. Eine andere Methode, um Informationen über die Anzahl der Genorte zu erhalten, wäre eine *in-situ*-Hybridisierung von Regenwurm-Chromosomen mit P1- und P2-spezifischen Sonden.

Für humanes Gelsolin sind die Verhältnisse auf der Ebene der genomischen DNA gut untersucht (Kwiatkowski et al., 1988). Das gesamte Gen umfasst etwa 70kbp, wobei allein 32kbp auf den kurzen 5'-terminalen Anteil entfallen, der Plasma- und cytoplasmatisches Gelsolin voneinander unterscheiden. Im Gen konnten 14 Introns nachgewiesen werden, möglicherweise existieren jedoch noch weitere. Bezüglich des Aufbaus des Gens unterscheiden sich also beide EWAM-Isoformen stark vom Gelsolin, was für die angewendete Methode sehr vorteilhaft war, denn Amplifikate von bis zu 35kbp Länge (bei angenommener halber Länge eines Gens für ein 40kDa-Protein) sind mit einer PCR nicht ohne weiteres herstellbar.

Die Isolierung des Gelsolin-verwandten Proteins aus den Stadien der Spermatogenese

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Gelsolin-verwandte Protein aus Nicht-Muskelzellen des Regenwurms hinsichtlich seiner Diversität und Lokalisation untersucht.

Es liegen eine Anzahl von Untersuchungen vor, die darauf hinweisen, dass Gelsolin-ähnliche Proteine eine wichtige Rolle bei der Bewegung von Nicht-Muskelzellen spielen (z. B. Hartwig et al., 1989, Huckriede et al., 1990, Cunningham et al., 1991). Insbesondere die Lokalisation von Gelsolin-ähnlichen Proteinen in Regionen von verschiedenen Zellen, die sich durch eine hohe Beweglichkeit auszeichnen, und in denen besonders viele Actin-Filamente nachweisbar sind, deuten auf eine Beteiligung der Actin-Modulatoren an der Regulation der Actin-Dynamik in solchen Zellen hin (z. B. Legrand et al., 1986, Tanaka et al., 1993). Nur eine Untersuchung beschäftigt sich jedoch bislang mit der Verteilung von Actin-bindenden Proteinen sowie ihre Lokalisation in Bezug zu filamentösem Actin in beweglichen Zellen von Wirbellosen. Neely und Macaluso (1997) untersuchten die Loka-

lisation von F-Actin, Profilin und „Gelsolin“ in den Wachstumskegeln kultivierter Nervenzellen des Blutegels. Der Actin-Modulator wurde dabei mit einem monoklonalen anti-Rattengelsolin-Antikörper nachgewiesen. Da ihnen der Nachweis der Proteine im Western-Blot nicht gelang, ist leider nicht klar, welches Molekulargewicht das markierte, als „Gelsolin“ bezeichnete Protein besitzt. „Gelsolin“ wurde in den Lamellipodien zusammen mit F-Actin nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurden modellhaft für formveränderliche Zellen die Stadien der Spermiogenese des Regenwurmes ausgewählt. Die Untersuchung dieser Zellen bot sich aufgrund mehrerer vorteilhafter Eigenschaften an: Da sie leicht und in großer Menge aus den Samenblasen zu isolieren sind, entfällt der Schritt der Kultivierung von Zellen, und die Vielzahl von Zellen pro Morula, die sich synchronisiert im gleichen Stadium der Entwicklung befinden, multipliziert die Möglichkeit des Studiums der Verteilung bestimmter Proteine.

Aus 100 Regenwürmern wurden die Samenblasen herauspräpariert. Die Organe besaßen ein Nassgewicht von 6g. Es konnte etwa 0,9mg EWAM-haltige Fraktion durch die chromatographische Auftrennung aus diesen Samenblasen gewonnen werden, was etwa 150mg EWAM pro kg Samenblase entspricht. Auch hier gilt das für den Kaumagen Gesagte bezüglich der geringen Reinheit dieser Fraktionen. Wird wiederum der gleiche präparationsbedingte Verlust angesetzt, so kann man von ca. 150mg Modulator pro kg Samenblase ausgehen. Unter Berücksichtigung des geringen Cytoplasmaanteils der Zellen ist diese Menge im Vergleich zu den aus Muskelzellen isolierten Modulator-Mengen relativ groß.

In einem nachträglich durchgeführten Versuch, in dem Samenblaseninhalte entweder total oder nach Zugabe von EGTA-haltigem Extraktionspuffer und Abzentrifugieren des Cytoskeletts SDS-gelelektrophoretisch getrennt, geblottet und mit anti-Fragmin-Antikörper inkubiert wurde, ergab sich ein interessanter Befund: Durch die Extraktion scheint man die erste Isoform selektiv anzureichern, denn im „Totalpräparat“ sind die vom Antikörper angefärbten Banden auf Höhe der ersten und zweiten Isoform noch gleich stark, während die Bande der P2-ähnlichen Isoformen nach der Extraktion deutlich schwächer ist als die der ersten Isoform. Die Mengenermittlung des isolierten Modulators gibt also nicht den Gehalt an EWAM wieder, und wahrscheinlich muss auch mit P2-ähnlichen Isoformen gerechnet werden. Der Befund erklärt auch, warum sich Spermiestadien auch mit anti-P2-Antikörper anfärben ließen (das resultierende Färbungsmuster entsprach dabei dem, das mit anti-Fragmin-Antikörper erhalten wurde).

Die Diversität des Gelsolin-verwandten Proteins aus den Stadien der Spermatogenese

Das Ergebnis der Hybridisierung des Northern-Blots der Samenblasen-RNA widerspricht sowohl den Mengenverhältnissen zwischen den Isoformen auf der Proteinebene, den Ergebnissen der RT-PCR als auch die Sequenzierung eines Fragments der vorherrschenden Modulator-Isoform, die alle auf eine beinahe ausschließliche Expression von P1 hinweisen. Der Northern-Blot mit Samenblasen-RNA wurde im Gegensatz zu den anderen Northern-Blot-Analysen nur einmal durchgeführt und sollte wegen seines abweichenden Ergebnisses noch einmal wiederholt werden. Ein weiterer Punkt, der zeigt, dass das Northern-Blot Ergebnis vorsichtig zu interpretieren ist, ist die gut sichtbare Bande von nicht aufgetrennter Nukleinsäure in der Tasche des Gels, die eventuell hochmolekulare DNA enthält. Möglicherweise ist bei der Präparation der RNA mit TRIzol, die auf einer Verteilung zwischen zwei Phasen durch Ausschüttelung beruht, DNA übertragen worden. DNA ist in den dichtgepackten Stadien der Spermiogenese in den Samenblasen in besonders großer Menge vorhanden. Die DNA wird ebenfalls von den Sonden angefärbt, allerdings nicht auf der gleichen Höhe wie die RNA, da sie auch nach einer Scherung im Schnitt noch 20kbp lang ist (Sambrook et al., 1989). Normalerweise wäre eine Übertragung von RNA für das Ergebnis eines Northern-Blots also nicht von Bedeutung, weshalb keine DNase-Behandlung der RNA oder Überprüfung mit einer PCR ohne vorgeschaltete reverse Transkription (Sambrook et al., 1989) durchgeführt worden war.

Weitere Versuche auf Protein- und RNA-Ebene ergaben, dass in den Stadien der Spermatogenese überwiegend EWAM-P1 zu finden ist, also dieselbe Isoform, die aufgrund der Untersuchungen an Muskelzellen des Regenwurmes hauptsächlich in schnell kontrahierenden Muskelzellen zu erwarten ist. Eine Erklärung auf funktioneller Ebene für diese bemerkenswerte Tatsache existiert bislang nicht. Das Vorkommen einer speziellen Actin-Isoform könnte jedoch das Vorkommen bestimmter Actin-bindender Proteine nach sich ziehen. Eine Analyse der Actin-Isoformen der Spermienstadien im Vergleich zum Hautmuskelschlauch des Regenwurmes wäre daher interessant.

Auch in Spermien und Spermienstadien von Säugetieren konnte die Expression spezieller Actin-Isoformen nachgewiesen werden: In Spermien des Kaninchens (Camatini et al., 1988) und in Wildschwein-Spermien (Casale et al., 1988) α - und β -Actin und eine aufgrund ihres isoelektrischen Punktes als neuartig eingestufte Actin-Isoform in humanen Spermien (Naaby-Hansen et al., 1997).

Die Lokalisation des Gelsolin-verwandten Proteins innerhalb der unreifen männlichen Geschlechtszellen während der Spermatogenese

Während ihrer Entwicklung von Urkeimzellen zu reifen Spermatozoen (Spermien) durchlaufen die Spermienstadien des Regenwurmes mehrere mitotische und meiotische Teilungen im Hoden und vor allem in den Samenblasen. Die Ausstattung der Zellen mit Organellen ändert sich stark (Troyer und Cameron, 1980). Während der Reifung werden fast alle Organellen und beinahe das gesamte Cytoplasma weite Strecken durch die Zellen und schließlich zentripetal durch die Zellbrücken transportiert, wodurch eine zentrale, kernlose Masse entsteht, die Cytophore (Hesse, 1909).

Es konnte das Vorhandensein von F-Actin im gesamten Cytoplasma und in der Cytophore durch Färbung mit Phalloidin nachgewiesen werden. Auch das Gelsolin-verwandte Protein EWAM wurde an diesen Stellen lokalisiert, so dass eine Beteiligung von Actin und EWAM an diesen Transportvorgängen für wahrscheinlich gehalten werden kann. Der Transport von membranösen Organellen ist sowohl entlang von Mikrotubuli als auch entlang von Actin-Filamenten beschrieben worden (Übersichtsartikel: Rogers und Gelfand, 2000, Actin-Filamente: Langford et al., 1994, Hill et al., 1996). Auch die äußere Zellgestalt wandelt sich stark: Die nahezu runden Spermatogonien werden zu extrem langen Spermatischen mit einem sehr langen und schmalen Kern (Troyer und Cameron, 1980, Troyer, 1980). An dieser Formveränderung besonders des Kerns könnte neben den Microtubuli, wie es Troyer (1980) annimmt, auch F-Actin beteiligt sein, da Phalloidin entlang des elongierenden Kerns F-Actin anfärbt. Eine andere Besonderheit ist die cytoplasmatische Brücke, die sich direkt von dem kontraktilen Ring der Zellteilung ableitet, so dass die plasmodialen Spermienstadien als Produkte einer unvollständigen Zellteilung angesehen werden können (Cooley, 1995). Die Brücken besitzen einen „fuzzy coat“ auf der Innen- und Außenseite der Plasmamembran. Die „mikrotubulären und mikrofila-mentösen“ (Jamieson, 1981) cytoplasmatischen Auflagerungen könnten Actin-Filamenten entsprechen, da sich hier eine zylindrische Struktur mit Phalloidin anfärben lässt. Der F-Actin-Ring der Brücken ist in seiner Größe variabel, um bestimmte Organellen passieren zu lassen, essentielle Organellen jedoch zurückzuhalten. Eine Veränderung des Umfangs des F-Actin-Ringes mit Filamenten, die wahrscheinlich wie beim kontraktilen Ring während der Zellteilung ringförmig angeordnet sind, ist durch Auf- und Abbau des F-Actins durch Modulatoren denkbar. Eine Verkürzung durch Kontraktion in Zusammenarbeit mit Myosin wäre jedoch wahrscheinlich der Hauptgrund der Veränderung des Umfangs, ver-

gleichbar mit den Verhältnissen des kontraktilen Ringes. Der kontraktile Ring mitotischer Stadien von Fibroblasten-Zelllinien enthält selbst kein Gelsolin (Cooper et al., 1988). In Aufnahmen des konfokalen Mikroskops konnte in den Spermienstadien des Regenwurmes dagegen EWAM in der Nähe der Brücken kreisförmig angefärbt werden.

Die Lokalisation des EWAM am distalen Pol im 64-Zell-Stadium und bei jungen Spermatischen könnte auf eine Beteiligung bei der Teilung des Golgi-Apparates hinweisen (Troyer und Cameron, 1980). Der durch die Antikörper markierte Fleck der etwas älteren Spermatischen am distalen Pol könnte mit der Differenzierung des Proacrosoms zusammenhängen (Troyer und Cameron, 1980).

In reifen Spermien dagegen, wenn auch die Mikrotubuli-Manschette um den Kern verschwunden ist, ist weder F-Actin noch EWAM nachweisbar. Alle Prozesse der Formveränderung und die Transporte sind dann beendet, so dass EWAM nun nicht mehr notwendig ist und wahrscheinlich abgebaut oder in die Cytophore transportiert wird.

Die Unterschiede der Phalloidin-Färbung und der immunologischen Markierung des EWAM müssen nicht notwendigerweise bedeuten, dass sich EWAM oft in Actin-freien Bereichen lokalisieren lässt. Phalloidin färbt nur F-Actin, das unpolymerisierte Actin bleibt unmarkiert. Es ist daher möglich, dass EWAM an der G-Actin-Bindung oder dem Capping von sehr kurzen, lichtmikroskopisch nicht erkennbaren, Filamenten in den Spermienstadien beteiligt ist.

Untersuchungen an Stadien der Spermiogenese und Spermien verschiedener Tierarten dokumentieren eine ähnliche Verteilung von Actin und Mitgliedern der Gelsolin-Familie wie die vorliegende Arbeit. Pelletier et al. (1999) untersuchen die Verteilung von Scinderin (Adseverin), einem weiteren Mitglied der Gelsolin-Familie, in Rinder-Spermien. In reifen, ejakulierten Spermien findet sich dabei weniger Scinderin als in den noch bewegungsunfähigen Spermien des Nebenhodenkopfes, vergleichbar mit dem Fehlen von EWAM in reifen, von einander getrennten Spermien des Regenwurms. In rundlichen, jungen Rinder-Spermatischen ist Scinderin in der subacrosomalen Region lokalisiert, während es sich in elongierten Spermatischen im Acrosom selbst nachweisen ließ. Pelletier et al. (1999) diskutieren die Beteiligung von Scinderin bei der Formveränderung der Zellen und bei der Entwicklung des Acrosoms der männlichen Keimzellen des Rindes. Die Verteilung von Actin, die bei einer Reihe von anderen Tierarten untersucht wurde, korreliert stark mit der Verteilung dieses Proteins aus der Gelsolin-Familie. Welch und O`Rand (1985) untersuchen die Verteilung von Actin in den Keimzellen des Kaninchens in der acrosomalen Region. In reifen Spermien liegt Actin hauptsächlich unpolymerisiert vor, während sich in

den jüngeren Stadien F-Actin findet. Die Autoren halten eine Funktion des Actins bei der Entwicklung des Acrosoms und bei der Elongation des Kerns für wahrscheinlich. Auch für reife menschliche Spermien wurde gezeigt, dass Actin hauptsächlich unpolymerisiert vorliegt (Ochs und Wolf, 1985). Beim Menschen konnte jedoch kein Gelsolin in den Keimzellen nachgewiesen werden (Rousseaux-Prevost et al., 1997). Auch bei Wildschwein-Spermien konnte mit Phalloidin kein F-Actin in reifen Spermien nachgewiesen werden (Camatini et al., 1986). Actin findet sich jedoch in der Nähe des Acrosoms (Camatini et al., 1986, Casale et al., 1988, Peterson et al., 1990). Es macht 1% des zusammen mit der Membran isolierbaren Proteins von Spermien der Wildschweine aus (Peterson et al., 1990). Die äußere Acrosomen-Membran kann mit dem Myosin-Subfragment S1 markiert werden. Auch in den Spermienstadien des Erdhörnchens konnte Actin in der Nähe des Acrosoms nachgewiesen, mit Myosin-Subfragment S1 dekoriert und mit Phalloidin markiert werden (Vogl et al., 1986).

Die Entwicklung der Spermien von Wirbellosen wurden bis jetzt noch nicht bezüglich ihres Cytoskeletts untersucht, jedoch liegen Untersuchungen an weiblichen Keimzellen hierzu vor. Shimizu (1995 und 1996) beschäftigt sich mit der Oogenese von *Tubifex* mit besonderer Berücksichtigung des Actin-Cytoskeletts. Die Oocyten machen vor der Befruchtung eine auffällige Formveränderung durch, und bestimmte Bestandteile des Ooplasmas wandern in besondere Bereiche der Peripherie der Zelle. Während der Reifung der weiblichen Keimzellen des relativ nahe mit dem Regenwurm verwandten *Tubifex* finden also zwei Vorgänge statt, die mit den hier dargestellten während der Reifung der Spermien vergleichbar sind. Für beide Vorgänge konnte eine Beteiligung des Actin-Cytoskeletts nachgewiesen werden. Die Formveränderung wird durch das cortikale Actin-Cytoskelett ermöglicht, während an der Cytoplasmaströmung das endoplasmatische Actin-Cytoskelett beteiligt ist. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse erscheinen also die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Hinweise auf eine Beteiligung des Actin-Cytoskeletts an der Spermatogenese des Regenwurms als plausibel.

Vergleiche mit der Keimzellentwicklung bei *Drosophila*

Bei einer großen Zahl von Organismen bleiben Keimzellen während einiger Stadien über interzelluläre brückenartige Verbindungen in Kontakt, die durch die Ausbildung besonderer Strukturen ausgezeichnet sind (Cooley und Theurkauf, 1994). Solche Verbindungen finden sich z. B. bei männlichen und weiblichen Keimzellen von Säugetieren, aber auch bei denen von *Drosophila*.

Ein bezüglich der Zellbrückenbildung und des Cytoplasma- und Organelltransports der Spermienbildung des Regenwurmes ähnliches, gut untersuchtes Beispiel ist die Oogenese von *Drosophila*. Für die ordnungsgemäße Ausbildung der Keimzellen konnte die Beteiligung von Actin und Actin-bindenden Proteinen, die Einfluss auf den Polymerisationsgrad von Actin nehmen, gezeigt werden. Die Ovariolen von *Drosophila* gehören zu den polytroph-meroistischen Ovariolen, d. h., jeweils eine Tochterzelle der Oogonien bildet durch vier unvollständige mitotische Teilungen einen Ei-Nährzellenverband, die sogenannte Eikammer. Eine der 16 Zellen wird zur Oocyte, die 15 anderen zu Nährzellen. Die Oocyte ist über vier Interzellularbrücken, die sogenannten Ringkanäle, mit ihren vier Nachbarzellen verbunden. Die Oocyte wird durch einen Stoffstrom von den Nährzellen über die Ringkanäle mit Cytoplasma versorgt, so dass schließlich, nach der Degeneration der Kerne, nichts von den Nährzellen übrig bleibt (nach: Dettner und Peters, 1999).

Die Ringkanäle enthalten eine Reihe von Proteinen, wovon drei Komponenten identifiziert sind, nämlich filamentöses Actin und zwei Actin-bindende Proteine (die Produkte der *hu-li tai shao*- und *kelch*-Gene), die wahrscheinlich Actin-stabilisierende Funktionen ausüben (Cooley und Theurkauf, 1994). Das Lumen der Ringkanäle wird von Actin durchzogen, das für notwendig bei der Strömung des Zellinhalts von den Nährzellen zu der Oocyte gehalten wird, da der Partikeltransport durch Cytochalasin gestoppt werden kann (Cooley und Theurkauf, 1994, Sutherland und Witke, 1999). Entsprechendes Actin in den Spermienstadien des Regenwurmes könnte verantwortlich sein für die diffuse Anfärbung des Cytosols der Spermienstadien und des Restkörpers mit Phalloidin.

Bei einer Mutation, die die Expression von Profilin verhindert, laufen die Zellteilungen nicht korrekt ab, und der Zellinhalt der Nährzellen gelangt nicht in die Oocyte (Cooley et al., 1992, Verheyen und Cooley, 1994). Profilin, das als Protein der Gelsolin-Familie Einfluss auf den Polymerisationsgrad von Actin nimmt, ist also wichtig für die Cytoplasmaströmung von den Nährzellen in die Oocyte, aber auch für die ordnungsgemäße Ausbildung der schlauchförmigen Zellbrücken. Das Fehlen von Profilin führt bemerkenswerterweise auch dazu, dass eine vorzeitige Mikrotubuli-gestützte Cytoplasmaströmung einsetzt. Diese Cytoplasmaströmung ist vermutlich an der Durchmischung und ordnungsgemäßen Anordnung der in die Oocyte transportierten Cytoplasmabestandteile beteiligt (Manseau et al., 1996). Eine verfrühte Durchmischung verhindert jedoch eine ordnungsgemäße Anordnung der Stoffe, die erst in einem späteren Stadium an ihrem Bestimmungsort verankert werden, in der Oocyte. Mikrotubuli- und Actin-Cytoskelett beeinflussen sich also ge-

genseitig, eventuell über die Proteine Profilin und Cappuccino, ein Mikrotubuli-bindendes Protein (Manseau et al., 1996).

Ist das Protein nicht vorhanden, das dem ADF/Cofilin bei *Drosophila* entspricht, treten Defekte der Zellteilung auf und Ansammlungen von F-Actin sind in den Nährzellen zu finden (Sutherland and Witke, 1999).

Bei einem Fehlen von Actin-vernetzenden Proteinen wie Villin („Quail“ bei *Drosophila*) oder Fascin wird kein den Kern umgebendes Cytoskelett ausgebildet, das verhindert, dass der Kern beim schnellen Cytoplasmtransport einer späten Entwicklungsphase mitgerissen wird und den Transport durch die Ringkanäle hemmt (Cooley et al., 1992). Im Bereich um die Kerne konnte auch bei den Spermienstadien des Regenwurmes F-Actin angefärbt werden.

An der korrekten Anordnung des Ringkanals sind eine Reihe von weiteren Actin-bindenden Proteinen sowie die Regulation durch Rho, Rac und Cdc42 und auch Tec- und Src-Kinasen beteiligt (Übersicht: Sutherland und Witke, 1999).

Auch zur Spermiogenese von *Drosophila* liegen einige das Actin-Cytoskelett betreffende Ergebnisse vor: Ist das Profilin-Gen mutiert, dann kann der kontraktile Ring während der Meiose nicht korrekt gebildet werden. Zusätzlich ist bei Profilin-Null-Tieren die Kommunikation zwischen Actin- und Mikrotubuli-Cytoskelett fehlerhaft, was durch eine nicht ordnungsgemäß ausgebildete Kernspindel deutlich wird (Giansanti et al., 1998). Die Mutation des Proteins, das ADF/Cofilin bei *Drosophila* entspricht, führt u. a. zu einer gestörten Spermiogenese, da die Zellteilungen nicht ablaufen können und der Gehalt an F-Actin stark ansteigt (Gunsalus et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Sequenzierung einer zweiten Isoform die Existenz von EWAM-Isoformen nachgewiesen werden. Die Lokalisation mit Hilfe der Immunfluoreszenz zeigte in einigen Geweben eine distinkte Verteilung der Gelsolin-verwandten Proteine. An entsprechenden Stellen innerhalb der Diskussion ist auf Fragen hingewiesen worden, die erst durch die neu gewonnenen Erkenntnisse aufgeworfen wurden. Weiterhin wurden dort Vorschläge gemacht, auf welche Weisen sich diese Probleme bearbeiten lassen könnten. Eine weitere noch zu klärende Frage ist die nach der Existenz einer extrazellulären Variante des EWAM. Die hierzu eingeleiteten Arbeiten umfassen die Suche nach einem Klon, der für eine Isoform codiert, die eine 5'-terminale Signalsequenz für den Export aufweist. Hierzu wurden PCRs mit jeweils einem Sequenz-spezifischen anti-

sense-Primer und einem Vektor-spezifischen sense-Primer mit Phagen der Hautmuskelschlauch-Genbibliothek als Template durchgeführt. Weder mit P1- noch mit P2-spezifischen Primern konnten distinkte Banden erhalten werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die extrazelluläre Variante nicht im Hautmuskelschlauch synthetisiert wird.

Die gerade fertiggestellte Diplomarbeit von Heimerzheim (2000) beschäftigt sich mit dem Vorkommen von extrazellulären Varianten von Gelsolin-verwandten Proteinen bei Wirbellosen. Der Annelide *Arenicola*, ein relativ naher Verwandter des Regenwurmes, besitzt danach ebenfalls zwei im SDS-PAGE unterscheidbare Isoformen von Actin-Modulatoren im Hautmuskelschlauch. Im Blut des Wattwurmes konnte die Variante, die im SDS-PAGE ein geringeres apparentes Molekulargewicht aufwies, durch Western-Blots und Färbung mit anti-Fragmin-Antikörper nachgewiesen werden. Falls es sich also um Spleiß-Varianten eines Gens handelt, wird die Signalsequenz bei dem Export vermutlich vollständig entfernt, während die Plasma-Varianten der Vertebraten-Gelsoline eine N-terminale Extension auch nach dem Export behalten (Kwiatkowski et al., 1986).

Auch Western-Blots mit Extrakten aus Regenwurm-Blut deuten auf die Existenz einer Exportform hin. Versuche auf der Ebene der genomischen DNA könnten in Zukunft Sicherheit bezüglich der Existenz von Varianten bringen, z. B. durch die Identifikation von alternativen Initiationsstellen der Transkription.

5. Zusammenfassung

Gelsolin-verwandte Proteine, die bei einer Reihe von Eukaryonten nachgewiesen wurden, beeinflussen den Polymerisationsgrad von Actin in einer Ca^{2+} - und PIP_2 -abhängigen Weise, indem sie entweder die Nukleation von G-Actin fördern oder die Fragmentation von F-Actin bewirken. Gelsolin-verwandte Proteine treten als 40 und 80kDa-Proteine auf.

In dieser Arbeit wurde das Gelsolin-verwandte Protein EWAM des Regenwurmes *Lumbricus terrestris* untersucht, das zu den Actin-Modulatoren mit einem Molekulargewicht von 40kDa gehört. Bei der Isolierung aus dem Hautmuskelschlauch, dem Kaumagen und den Samenblasen konnte die Existenz von Varianten des EWAM gezeigt werden, deren Expressionsmuster organabhängig ist. Die Untersuchung des immunologischen Verhaltens und der Spaltmuster nach limitierter Proteolyse bestätigten, dass es sich bei den trennbaren Varianten um Isoformen handelt. Die Identität einiger Isoformen in den unterschiedlichen Organen konnte gezeigt werden. Der Hautmuskelschlauch weist die Isoformen EWAM-P1, -P2 und -P3 auf, der Kaumagen die Isoformen EWAM-P3 und -P4, und in den Samenblasen lässt sich nur EWAM-P1 nachweisen.

Die Sequenz von EWAM-P1 war bereits bekannt (Giebing et al., 1994). Mit Hilfe von PCRs mit jeweils einem Sequenz- und einem Vektor-spezifischen Primer und Phagen der cDNA-Genbibliothek des Hautmuskelschlauchs als Template gelang die Amplifizierung der codierenden Region einer weiteren Isoform. Die codierende Region umfasst 1107 bp und die abgeleitete Aminosäuresequenz 366 Aminosäuren, woraus sich ein errechnetes Molekulargewicht von 40924,1 Da ergibt. Die Aminosäuresequenz ist zu etwa 64% mit der der ersten Isoform identisch. Die Sequenzierung dieser zweiten Isoform ermöglichte durch Vergleich mit anderen Actin-Modulatoren die Identifizierung von funktionell wichtigen Domänen. Konservierte Aminosäuren in strukturell wichtigen Bereichen lassen den Schluss zu, dass das erste Segment eine ähnliche dreidimensionale Gestalt besitzt wie das erste Segment von Gelsolin. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten mit der potentiellen zweiten G-Actin-Bindungsstelle des vierten Segments des Gelsolins konnte eine vermutliche zweite G-Actin-Bindungsstelle des EWAM im zweiten Segment identifiziert werden.

In den schräggestreiften Muskelzellen des Kaumagens gelang eine Kolokalisation mit den dünnen Filamenten. In den Stadien der Spermatogenese konnte eine unterschiedliche Verteilung von EWAM, Actin und Tubulin in Abhängigkeit vom Stadium der Morphogenese gezeigt werden. Für F-Actin und EWAM ergab sich eine partielle Kolokalisation. Wahrscheinlich ist EWAM also an der Umorganisation des Actins beteiligt, die notwendig ist für den Transport von Organellen und die Gestaltveränderung während der Reifung der Spermien.

6. Literatur

- Aebi, U., Fowler, W. E., Isenberg, G., Pollard, T. D., Smith, P. R. (1981): Crystalline actin sheets: their structure and polymorphism. *J. Cell Biol.* 91: 340-351
- Amos, L. A. (1985): Structure of muscle filaments studied by electron microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14: 291-314
- Amos, L. A., Amos, W. B. (1991): *Molecules of the cytoskeleton*. Macmillan education Ltd., London
- Ampe, C., Vandekerckhove, J. (1987): The F-actin capping proteins of *Physarum polycephalum*: cap42(a) is very similar, if not identical, to fragmin and is structurally and functionally very homologous to gelsolin; cap42(b) is *Physarum* actin. *EMBO J.* 6(13): 4149-4157
- Anderson, R. A., Boronenkov, I. V., Doughman, S. D., Kunz, J., Loijens, J. C. (1999): Phosphoinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. *J. Biol. Chem.* 274: 9907-9910
- André, E., Lottspeich, F., Schleicher, M., Noegel, A. A. (1988): Severin, gelsolin, and villin share a homologous sequence in regions presumed to contain F-actin severing domains. *J. Biol. Chem.* 263: 722-727
- Azuma, T., Witke, W., Stossel, T. P., Hartwig, J. H., Kwiatkowski, D. J. (1998): Gelsolin is a downstream effector of Rac for fibroblast motility. *EMBO J.* 17: 1362-1370
- Babcock, G. G., Fowler, V. M. (1994): Isoform-specific interaction of tropomodulin with skeletal muscle and erythrocyte tropomyosins. *J. Biol. Chem.* 269: 27510-27518
- Ballestream, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B., Imhof, B. A. (2000): Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol. Biol. Cell* 11(9): 2999-3012
- Belmont, L. D., Orlova, A., Drubin, D. G., Egelmann, E. H. (1999): A change in actin conformation associated with filament instability after Pi release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 29-34
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Res.* 7: 1513-1523
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J., Gotschlich, E. C. (1984): A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136: 175-179
- Bock, D., Hinssen, H., D'Haese, J. (1994): A gelsolin-related actin-severing protein with fully reversible actin-binding properties from the tail muscle of crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Eur. J. Biochem.* 225: 727-735
- Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Breitbart, R. E., Nguyen, H. T., Medford, R. M., Destree, A. T., Mahdavi, V., et al. (1985): Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated troponin T isoforms from a single gene. *Cell* 41(1): 67-82
- Breitbart, R. E., Andreadis, A., Nadal-Ginard, B. (1987): Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 467-495
- Brooke, M. H., Kaiser, K. K. (1970): Muscle fibre types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* 23: 369-379
- Brown, S. S., Yamamoto, K., Spudich, J. A. (1982): A 40,000-dalton protein from *Dictyostelium discoideum* affects assembly properties of actin in a Ca²⁺-dependent manner. *J. Cell Biol.* 93: 205-210
- Bryan, J. (1988): Gelsolin has three actin-binding sites. *J. Cell Biol.* 106: 1553-1562

- Burke, R. E., Levine, D. N., Zajac, F. E., Tsairis, P., Engel, W. K. (1971): Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* 174: 709-712
- Burtnick, L. D., Koepf, E. K., Grimes, J., Jones, E. Y., Stuart, D. I., McLaughlin, P. J., Robinson, R. C. (1997): The crystal structure of plasma gelsolin: implications for severing, capping, and nucleation. *Cell* 90: 661-670
- Camatini, M., Anelli, G., Casale, A. (1986): Identification of actin in boar spermatids and spermatozoa by immunoelectron microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* 42: 311-318
- Camatini, M., Casale, A., Cifarelli, M. (1988): Immunocytochemical identification of actin in rabbit spermiogenesis and spermatozoa. *Eur. J. Cell Biol.* 45(2): 274-281
- Carlhoff, D., D'Haese, J. (1987): Slow type muscle cells in the earthworm gizzard with a distinct, Ca^{2+} -regulated myosin-isoform. *J. Comp. Physiol. B* 157: 589-597
- Carlhoff, D. (1988): Charakterisierung der Proteine aus der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris* mit besonderer Berücksichtigung der Myosin-gekoppelten Ca^{2+} -Regulation. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf.
- Carlier, M. F. (1991): Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266: 1-4
- Carlier, M. F., Pantaloni, D. (1997): Control of actin dynamics in cell motility. *J. Mol. Biol.* 269: 459-467
- Carlsson, L., Nystrom, L. E., Sundkvist, I., Markey, F., Lindberg, U. (1976): Profilin, a low molecular weight protein controlling actin polymerisability. In: *Contractile System in Non-Muscle Tissues*, Perry, S. V., Margreth, A., Adelstein, R. S. (eds.), Amsterdam: Elsevier/North Holland
- Casale, A., Camatini, M., Gabbiani, G. (1988): Characterization of actin isoforms in ejaculated boar spermatozoa. *Gamete Res.* 20(2): 133-144
- Chaponnier, C., Yin, H. L., Stossel, T. P. (1987): Reversibility of gelsolin/actin interaction in macrophages. Evidence of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent pathways. *J. Exp. Med.* 165(1):97-106
- Chaponnier, C., Kocher, O., Gabbiani, G. (1990): Modulation of gelsolin-content in rat aortic smooth muscle cells during development, experimental thickening and culture. *Eur. J. Biochem.* 190: 559-565
- Chaponnier, C., Goethals, M., Janmey, P. A., Gabbiani F., Gabbiani, G., Vandekerckhove, J. (1995): The specific NH_2 -terminal sequence Ac-EEED of a α -smooth muscle actin plays a role in polymerization *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Biol.* 130: 887-895
- Chomczynski, P. (1992): One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem.* 201(1):134-9
- Ciechanover A., Schwartz A. L. (1989): How are substrates recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system? *Trends Biochem. Sci.* 14(12): 483-488
- Coluccio, L. M., Sedlar, P.A., Bryan, J. (1986): The effects of a 45 000 molecular weight protein from unfertilized sea urchin eggs and its 1:1 actin complex on actin filaments. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 7: 133-141
- Cooley, L., Verheyen, E., Ayers, K. (1992): chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* 69: 173-184
- Cooley, L., Theurkauf, E. (1994): Cytoskeletal functions during *Drosophila* oogenesis. *Science* 266: 590-596
- Cooley, L. (1995): Oogenesis: variations on a theme. *Dev. Genet.* 16: 1-5
- Cooper, J. A., Loftus, D. J., Frieden, C., Bryan, J., Elson, E. L. (1988): Localization and mobility of gelsolin in cells. *J. Cell Biol.* 106: 1229-1240
- Cunningham, C. C., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J. (1991): Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. *Science* 251: 1233-1236

- Dettner, K., Peters, W. (Eds.) (1999): Lehrbuch der Entomologie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- D`Haese, J., Carlhoff, D., (1987): Localization and histochemical characterization of myosin isoforms in earthworm body wall muscle. *J. Comp. Physiol. (B)* 157: 171-179
- D`Haese, J., Hinssen, H. (1987): Isolation and characterization of a Ca^{2+} -activated actin-modulating protein from obliquely striated muscle. *J. Comp. Physiol. (B)* 248: 397-402
- D`Haese, J., Rutschmann, M., Dahlmann, B., Hinssen, H. (1987): Activity of a gelsolin-like actin modulator in rat skeletal muscle under protein catabolic conditions. *Biochem. J.* 248: 397-402
- D`Haese, J., Fey, M. (1989): Ca^{2+} -activated actin-modulating proteins of the 40 kDa-type in various invertebrate muscle tissues. *Eur. J. Cell Biol.* 48, Suppl. 26: 81
- D`Haese, J. (1992): Funktionelle Morphologie schräggestreifter Muskeln. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 85.2: 315-328
- Dißmann, E., Hinssen, H. (1994): Immunocytochemical localization of gelsolin in fibroblasts, myogenic cells, and isolated myofibrils. *Eur. J. Cell Biol.* 63: 336-344
- Dome, J. S., Mittal, B., Pochapin, M. B., Sanger, J. M., Sanger, J. W. (1988): Incorporation of fluorescently labeled actin and tropomyosin into muscle cells. *Cell Differ.* 23(1-2): 37-52
- Drummond, D. R., Peckham, M., Sparrow, J. C., White, D. C. S. (1990): Alterations in cross bridge kinetics caused by mutations in actin. *Nature Lond.* 348: 441-442
- Ebisawa, K., Nonomura, Y. (1985): Enhancement of actin-activated myosin-ATPase by an 84 K Mr actin binding protein in vertebrate smooth muscle. *J. Biochem.* 98: 1127-1130
- Egelmann, E. H. (1985): The structure of the actin thin filament. *J. Muscle Res. & Cell Motil.* 6: 129-151
- Eichinger, L., Noegel, A. A., Schleicher, M. (1991): Domain structure in actin-binding proteins: Expression and functional characterization of truncated severin. *J. Cell Biol.* 112 (4): 665-676
- Eichinger, L., Schleicher, M. (1992): Characterization of actin- and lipid-binding domains in severin, a Ca^{2+} -dependent F-actin fragmenting protein. *Biochemistry* 31: 4779-4787
- Fattoum, A., Hartwig, J. H., Stossel, T. P. (1983): Isolation and some structural and functional properties of macrophage tropomyosin. *Biochemistry* 22: 1187-1193
- Fedorcsak, I., Ehrenberg, L. (1966): Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* 20: 107-112
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1984): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137: 266-267
- Folger, P. A., Berg, W. J., DeJesus, Z., Fong, Y., Pardee, J. D. (1999): A mammalian severin replaces gelsolin in transformed epithelial cells. *Cancer Res.* 59: 5349-5355
- Fretz, A. (1996): Zur hormonellen Regulation der Expression von Zytoskelett-Proteinen einer epithelialen Zelllinie von *Chironomus tentans*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Frohmann, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R. (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002
- Fruman, D. A., Meyers, R. E., Cantley, L. C. (1998): Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 481-507
- Gailly, P., Lejeune, T., Caponi, J. P., Gillis, J. M. (1990): The action of brevin, an F actin-severing protein, on the mechanical properties and ATPase activity of skinned smooth muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 11: 293-301

- Geng, Y.-J. A. T., Tang, J. X., Hartwig, J. H., Muszynski, M., Libby, P., Kwiatkowski, D. J. (1999): Caspase-3 induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and Apoptosis of vascular muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur. J. Cell Biol.* 50: 294-302
- Gettemans, J., De Ville, Y., Waelkens, E., Vandekerckhove, J. (1995): The actin-binding properties of the *Physarum* actin-fragmin complex. Regulation by calcium, phospholipids and by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270: 2644-2651
- Giansanti, M. G., Bonaccorsi, S., Williams, B., Santolamazza, C., Goldberg, M. L., Gatti, M. (1998): Cooperative interactions between the central spindle and the contractile ring during *Drosophila* cytokinesis. *Genes Dev.* 12: 369-410
- Giebing, T. (1989): Erstellung eine Genbibliothek des Regenwurmes *Lumbricus terrestris* im Expressionsvektor Lambda gt 11 zur Charakterisierung von Muskelproteinen mit Hilfe gentechnologischer Methoden. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Giebing, T., Meyer, H. E., Hinssen, H., D'Haese, J. (1993): Sequence information about an actin-severing protein from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 14: 279
- Giebing, T. (1994): Sequenzierung und Struktur-Funktions-Beziehung eines Actin-Modulators aus der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Giebing, T., Hinssen, H., D'Haese, J. (1994): The complete sequence of a 40-kDa actin-modulating protein from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Eur. J. Biochem.* 255: 773-779
- Giebing, T., Langer, M., Serwe, C., Di Gregorio, A., Di Lauro, R., D'Haese, J. (1996): Gelsolin-like proteins from tunicates- analytical approach at both protein and DNA level. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 17: 111
- Giebing, T., Obermann, W. M. J., Fürst, D., D'Haese, J. (1997): C-terminally deleted fragments of 40-kDa earthworm actin modulator still show gelsolin activities. *FEBS Letters* 417: 191-195
- Gilmore, A. P., Burrige, K. (1996): Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol 4,5-biphosphate. *Nature* 381: 531-535
- Giloh, H., Sedat, J. W. (1982): Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamin and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 217: 1252-1255
- Gonsior, S., Hinssen, H. (1995): Exogenous gelsolin binds to sarcomeric thin filaments without severing. *Cell Motil. Cytoskeleton* 31: 196-206
- Gonsior, S. (1997): Aktin und Aktin-bindende Proteine: Einfluß von Gelsolin und Nebulin auf die Stabilität dünner Myofilamente und Charakterisierung eines monoklonalen Aktin-Antikörpers. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld
- Goode, B. L., Drubin, D. G., Barnes, G. (2000): Functional cooperations between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 63-71
- Gunsalus, K. C., Bonaccorsi, S., Williams, E., Verni, F., Gatti, M., Goldberg, M. L. (1995): Mutations in *twinstar*, a *Drosophila* gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 131: 1243-1259
- Guruprasad K., Reddy B. V. B., Pandit M. W. (1990): Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering* 4: 155-161
- Gusev, N. B., Pritchard, K., Hodgkinson, J. L., Marston, S. B. (1994): Filamin and gelsolin influence Ca^{2+} -sensitivity of smooth muscle thin filaments. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15: 672-681

- Hannappel, E., Xu, G.-J., Morgan, J. L., Hempstead, J., Horecker, B. L. (1982): Thymosin β_4 : a ubiquitous peptide in rat and mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2172-2175
- Hartwig, J. H., Chambers, K. A., Stossel, T. P. (1989): Association of gelsolin with actin filaments and cell membranes of macrophages and platelets. *J. Cell Biol.* 108: 467-479
- Hartwig, J. H., Bokoch, G. M., Carpenter, C. L., Janmey, P. A., Taylor, L. A., Toker, A., Stossel, T. P. (1995): Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 82: 643-653
- Hasegawa, T., Takahashi, S., Hayashi, H., Hatano, S. (1980): Fragmin: a calcium ion sensitive regulatory factor on the formation of actin filaments. *Biochemistry* 19: 2677-2683
- Heimerzheim, T. (2000): Isolierung und Charakterisierung Gelsolin-ähnlicher Proteine in der Hämolymphe von Arthropoden. Diplomarbeit Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Heintzelman, M. B., Frankel, S. A., Artavanis-Tsakonas, S., Mooseker, M. S. (1993): Cloning of a secretory gelsolin from *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 230: 709-716
- Henikoff, S., Henikoff, J. G. (1992): Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919
- Herlan, G., Wunderlich, F., Kreuzer, H. P. (1981): Central hidden breaks in the cytoplasmic 26S rRNA and its nuclear precursors in *Tetrahymena*. *Cell Biol. Int. Reports* 5(11): 1033-1038
- Herman, I. M. (1993): Actin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5(1): 48-55
- Hesse, E. (1909): Quelques particularités de la spermatogenèse chez les Oligochaetes. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 40: 411-446
- Heumann, H-G, Zebe, E. (1967): Über Feinbau und Funktionsweise der Fasern aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms, *Lumbricus terrestris*. *Z. Zellforsch.* 78: 131-150
- Hewett, T. E., Grupp, I. L., Grupp, G., Robbins, J. (1994): α -Skeletal actin is associated with increased contractility in the mouse heart. *Circ. Res.* 74: 740-746
- Hill, K. L., Catlett, N. L., Weisman, L. S. (1996): Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 135: 1535-1549
- Hinssen, H. (1981 a): An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. I. Isolation and purification. *Eur. J. Cell Biol.* 23: 225-233
- Hinssen, H. (1981 b): An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. II. Ca^{++} -dependence and other properties. *Eur. J. Cell Biol.* 23: 234-240
- Hinssen, H., Small, J. V., Sobieszek, A. (1984): A Ca^{2+} -dependent actin modulator from vertebrate smooth muscle. *FEBS Lett.* 166: 90-95
- Hinssen, H., Small, J. V., Sobieszek, A. (1985 a): An actin modulating protein from vertebrate smooth muscle. In: Alia, E., Arena, M., Russo, M. (eds): *Contractile proteins in muscle and non-muscle cell systems*. Praeger Publishers, New York, pp 319-342
- Hinssen, H., Engels, F. E., Small, J. V. (1985 b): The role of actin modulators in smooth and skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6: 117-118
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W. (1990): Atomic model of the actin filament. *Nature* 347: 44-49
- Holmes, K. C., Tirion, M., Popp, D., Lorenz, M., Kabsch, W., Milligan, R. A. (1993): A comparison of the atomic model of F-actin with cryo-electron micrographs of actin and decorated actin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 332: 15-22

- Horwitz, J. P., Chua, J., Curby, R. J., Thomson, A. J., Da Rooge, M. A., Fischer, B. E., Mauricio, J., Klundt, I. (1964): Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- β -D- glycopyranosides. *J. Med. Chem.* 7: 547-548
- Huckriede, A., Fuechtbauer, A., Hinssen, H., Chaponnier, C., Weeds, A., Jockusch, B. M. (1990): Differential effects of gelsolin on tissue culture cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 16: 229-238
- Huxley, H. E. (1963): Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* 7: 281-307
- Jamieson, B. G. M. (1978): A comparison of spermiogenesis and spermatozoal ultrastructure in megascolecid and lumbricid earthworms (Oligochaeta: Annelida). *Austr. J. Zool.* 26: 225-240
- Jamieson, B. G. M. (1981): The ultrastructure of the oligochaeta. Academic Press Inc. (London) LTD.
- Janmey, P. A., Chaponnier, C., Lind, S. E., Zaner, K. S., Stossel, T. P., Yin, H. L. (1985): Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing and end blocking. *Biochemistry* 24: 3714-3723
- Janmey, P. A., Lind, S. E. (1987): Capacity of human serum to depolymerize actin filaments. *Blood* 70: 524-530
- Jockusch, B. M., Hinssen, H. (1996): Nonmuscle motility and the actin-based cytoskeleton. In: *Comprehensive Human Physiology*, Vol. 1, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1996: 225-243
- 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
- Karnovsky, M. J. (1971): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for the use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137A-138A
- Khaitlina, S., Hinssen, H. (1997): Conformational changes in actin induced by its interaction with gelsolin. *Biophys. J.* 73(2): 929-937
- Khandjian, E. W., Meric, C. (1986): A procedure for Northern blot analysis of native RNA. *Anal. Biochem.* 159(1): 227-232
- Khyse-Andersen, J. (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-209
- Koepf, E. K., Burtnick, L. D. (1992): Tropomyosin binds to gelsolin in a Ca^{2+} -independent manner. *FEBS Lett.* 309: 56-58
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGerry, T. J., Kirschner, M. W., Kohts, K., Kwiatkowski, D. J., Williams, L. T. (1997): Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-298
- Kozak, M. (1986): Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292
- Kubista, M., Akermann, B., Norden, B. (1987): Characterization of interaction between DNA and 4', 6-diamino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry* 26: 4545
- Kuzumaki, N., Fujita, H., Tanaka, M., Sakai, N., Ohtsu, M. (1998): Tumor suppressive function of gelsolin. In: *G Proteins, Cytoskeleton and Cancer*. Maruta, H. K., Kohama, K., Austin, T. X. (Eds.). RG Landes Company
- Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R., Yin, H. L. (1986): Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature*, 323: 455-458
- Kwiatkowski, D. J., Mehl, R., Yin, H. L. (1988): Genomic organization and biosynthesis of secreted and cytoplasmic forms of gelsolin. *J. Cell Biol.* 106: 375-384

- Kwiatkowski, D. J., Janmey, P. A., Yin, H. L. (1989): Identification of critical functional and regulatory domains in gelsolin. *J. Cell Biol.* 108: 1717-1726
- Kwiatkowski, D. J. (1999): Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 103-108
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Langer, M., Giebing, T., D'Haese, J. (1998): Purification and functional characterization of an 85-kDa gelsolin from the ascidians *Microcosmus sulcatus* and *Phallusia mammilata*. *Comp. Biochem. Physiol. (B)* 119: 697-704
- Langford, G. M., Kuznetsov, S. A., Johnson, D., Cohen, D. L., Weiss, D. G. (1994): Movement of axoplasmic organelles on actin filaments assembled on acrosomal processes: evidence for a barbed-end-directed organelle motor. *J. Cell Sci.* 107: 2291-2298
- Lazarides, E., Lindberg, U. (1974): Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4742-4746
- Legrand, C., Ferraz, C., Clavel, M.-C., Rabié, A. (1986): Immunocytochemical localization of gelsolin in oligodendroglia of the developing rabbit central nervous system. *Devel. Brain Res.* 30: 231-235
- Lewke, N., Weber, K. (1996): Nucleotide sequence of two actin genes of *Lumbricus terrestris*. *Gene* 178 (1-2): 199-200
- Lin, K.-M., Wenegieme, E. F., Lu, P.-J., Chen, C.-S., Yin, H. L. (1997): Gelsolin binding to phosphoinositol 4,5-biphosphate is modulated by calcium and pH. *J. Biol. Chem.* 272: 20443-20450
- Littlefield, R., Fowler, V. M. (1998): Defining actin filament length in striated muscle: rulers and caps or dynamic stability? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 487-525
- LoRusso, S. M., Imanaka-Yoshida, K., Shuman, H., Sanger, J. M., Sanger, J. W. (1992): Incorporation of fluorescently labeled contractile proteins into freshly isolated living adult cardiac myocytes. *Cell Motil. Cytoskeleton* 21(2): 111-122
- Lu, M., Witke, W., Kwiatkowski, D. J., Kosik, K. S. (1997): Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice. *J. Cell Biol.* 138: 1279-1287
- Lück, A. (1994): Gelsolin in Evertebraten: Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung des 100 kDa Actin-Modulators aus dem Schwanzmuskel des Hummers *Homarus americanus*. Dissertation an der Universität Bielefeld
- Lück, A., D'Haese, J., Hinssen, H. (1995): A gelsolin-related protein from lobster muscle: cloning, sequence analysis and expression. *Biochem. J.* 305: 767-775
- Mabuchi, K., Sréter, F. A. (1980): Actomyosin ATPase. II. Fibre typing by histochemical ATPase reaction. *Muscle Nerve* 3: 233-239
- Maciver, S. K., Ternent, D., McLaughlin, P. J. (2000): Domain 2 of gelsolin binds directly to tropomyosin. *FEBS Lettes* 473: 71-75
- MacLean-Fletcher, S. D., Pollard, T. D. (1980): Viscometric analysis of the gelation of *Acanthamoeba* extracts and purification of two gelation factors. *J. Cell Biol.* 85(2):414-28
- Mannherz, H.-G., Gooch, J., Weeds, A. G., McLaughlin, P. J. (1992): Crystallization of the complex of actin with gelsolin segment 1. *J. Mol. Biol.* 226: 899-901
- Manseau, L., Calley, J., Phan, H. (1996): Profilin is required for posterior patterning of the *Drosophila* oocyte. *Development* 122: 2109-2116
- Markus, M. A., Nakayama, T., Matsudaira, P. T., Wagner, G. (1994): Solution structure of villin 14T, a domain conserved among actin-severing proteins. *Protein Sci.* 3: 70-81
- Matsudaira, P., Janmey, P. A. (1988): Pieces in the actin-severing puzzle. *Cell* 54(2): 139-140

- McGough, A., Chiu, W., Way, M. (1998): Determination of the gelsolin binding site on F-actin: implications for severing and capping. *Biophys. J.* 74: 764-772
- McGrath, J. L., Osborn, E. A., Tardy, Y. S., Dewey, C. F. Jr., Hartwig, J. H. (2000): Regulation of the actin cycle *in vivo* by actin filament severing. *PNAS* 97(12): 6532-6537
- McLaughlin, P. J., Gooch, J. T., Mannherz, H.-G., Weeds, A. G. (1993): Structure of gelsolin segment 1- actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364: 685-692
- Meerschaert, K., De Corte, V., De Ville, Y., Vandekerckhove, J., Gettmans, J. (1998): Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatic acid. *EMBO J.* 17: 5923-5932
- Mounier, N., Sparrow, J. C. (1997): Structural comparisons of muscle and nonmuscle actins give insights into the evolution of their functional differences. *J. Mol. Evol.* 44(1): 89-97
- Mounier, N., Desmoulière, A., Gabbiani, M. D. (1999): Subcutaneous tissue fibroblasts transfected with muscle and nonmuscle actins: A good *in vitro* model to study fibroblastic cell plasticity. *Wound Rep. Reg.* 7: 45-52
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., Pollard, T. D. (1998): The interaction of Arp2/3 complex with actin – nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6181-6186
- Naaby-Hansen, S., Flickinger, C. J., Herr, J. C. (1997): Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 56(3): 771-787
- Nakai, J., Kanehisa, K. (1992): PSORT-Prediction of Protein Localization Sites Version 6.4: A novel approach for predicting the localization of proteins. *Protein Engineering* 6: 120-126
- Neely, M. D., Macaluso, E. (1997): Motile areas of leech neurites are rich in microfilaments and two actin-binding proteins: gelsolin and profilin. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264: 1701-1706
- Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H. (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with CBB dyes in PA gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6: 423-448
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988): Improved staining of proteins in PA gels including isoelectric focusing gels with clear background at ng sensitivity using CBB G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262
- Neuhoff, V. (1990a): Die kolloidale Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen und Peptiden in PA-Gelen. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371: 10-11
- Neuhoff, V., Stamm, R., Pardowitz, I., Arold, N., Ehrhardt, W., Taube, D. (1990b): Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with CBB dyes in PA gels, and their solution. *Electrophoresis* 11: 101-107
- Ochs, D., Wolf, D. P. (1985): Actin in ejaculated human sperm cells. *Biol. Reprod.* 33(5): 1223-1236
- O'Farrell, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021
- Ohtsuka, Y., Nakae, H., Abe, H., Obinata, T. (1994): Immunochemical studies of an actin-binding protein in ascidian body wall smooth muscle. *Zool. Sci.* 11: 407-412
- Ozelius, L. J., Kwiatkowski, D. J., Schuback, D. E., Breakfield, X. O., Wexler, N. S., Gusella, J. F., Haines, J. L. (1992): A genetic linkage map of human chromosome 9q. *Genomics* 14: 715-720
- Paniagua, R., Royuela, M., García-Anchuelo, R. M., Fraile, B. (1996): Ultrastructure of invertebrate muscle cell types. *Histol. Histopathol.* 11: 181-201

- Pelletier, R., Trifaro, J. M., Carbajal, M. E., Okawara, Y., Vitale, M. L. (1999): Calcium-dependent actin-filament severing scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis, and spermatozoa. *Biol. Reprod.* 60(5): 1128-1136
- Peters, W., Walldorf, V. (1986a): *Der Regenwurm Lumbricus terrestris* L. Quelle und Meyer, Heidelberg.
- Peters, W., Walldorf V. (1986b): Endodermal secretion of chitin in the 'cuticle' of the earthworm gizzard. *Tissue Cell* 18: 361-374
- Peterson, R. N., Bozzola, J. J., Hunt, W. P., Darabi, A. (1990): Characterization of membrane-associated actin in boar spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 253(2): 202-214
- Pittenger, M. F., Kazzaz, J. A., Helfman, D. M. (1994): Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6(1): 96-104
- Pollard, T. D., Cooper, J. A. (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 987-1035
- Pollard, T. (1990): Actin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2: 33-40
- Pope, B., Maciver, S., Weeds, A. (1995): Localization of the calcium-sensitive actin monomer binding site in gelsolin segment 4 and identification of calcium binding sites. *Biochemistry* 34: 1583-1588
- Remmert, K., Hinssen, H. (1996): Molluscan adductor muscle contains a 50-kDa gelsolin-related Ca^{2+} -dependent actin-severing protein. *Eur. J. Cell Biol.* 69 (suppl. 42): 160
- Remmert, K. (1999): Aktin-modulierende Proteine des Muskels: Reinigung und Charakterisierung von Gelsolin aus Mollusken und von rekombinantem CapZ aus Vertebraten. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld
- Reynolds, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212
- Rogers, S. L., Gelfand, V. I. (2000): Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 57-62
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., Kirschner, M. W. (1999): The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97: 221-231
- Rouayrenc, J. F., Fattoum, A., Gabrion, J., Audemard, E., Kassab, R. (1984): Muscle gelsolin – isolation from heart tissue and characterization as an integral myofibrillar protein. *FEBS Lett.* 167: 52-58
- Rousseaux-Prevost, R., Delobel, B., Hermand, E., Rigot, J.-M., Danjou, P., Mazeman, E., Rousseaux, J. (1997): Distribution of gelsolin in human testis. *Mol. Reprod. Dev.* 48: 63-70
- Ruiz-Silva, B. E., Burtnick, L. D. (1989): Characterization of horse plasma gelsolin. *Biochem. Cell Biol.* 68: 796-800
- Rüttimann, C., Cotoras, M., Zaldivar, J., Vicuna, R. (1985): DNA polymerases from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. *Eur. J. Biochem.* 149(1): 41-46
- Salinovich, O., Montelaro, R. C. (1986): Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156: 341-347
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning; a laboratory manual*. Second edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Scali, V., Tinti, F. (1992): Rapid assessment of maturation stage and reproductive mode in centrolecytic eggs of stick insects (Phasmatodea) using DAPI stain. *Biotech. Histochem.* 67(6): 356-359

- Schafer, D. A., Jennings, P. B., Cooper, J. A. (1996): Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* 135: 169-179
- Schiaffino, S., Reggiani, C. (1996): Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological Reviews* 76 (2): 371-423
- Schnuchel, A., Wiltschek, R., Eichinger, L., Schleicher, M., Holak, T. A. (1995): Structure of severin domain 2 in solution. *J. Mol. Biol.* 247: 21-27
- Schoepper, B., Wegner, A. (1992): Gelsolin binds to polymeric actin at a low rate. *J. Biol. Chem.* 267(20): 13924-13927
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P. (1998): SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5857-5864
- Schultz, J., Copley, R.R., Doerks, T., Ponting, C.P. and Bork, P. (2000) SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* 28, 231-234
- Schutt, C. E., Lindberg, U., Myslik, J., Strauss, N. (1989): Molecular packing in profilin:actin crystals and its implications. *J. Mol. Biol.* 209: 735-746
- Selden, L. A., Kinosian, H. J., Newman, J., Lincoln, B., Hurwitz, C., Gershman, L. C., Estes, J. E. (1998): Severing of F-actin by the amino-terminal half of gelsolin suggests internal cooperativity in gelsolin. *Biophys. J.* 75: 3101-3109
- Shimuzu, T. (1995): Role of the cytoskeleton in the generation of spatial patterns in *Tubifex* eggs. *Curr. Top. Dev. Biol.* 31: 197-235
- Shimuzu, T. (1996): Ooplasmic redistribution in *Tubifex* eggs with selectively impaired cortical actin cytoskeleton. *Dev. Biol.* 180: 54-62
- Stegemann, H. (1972): Bau, Einrichtung und Geräte des Instituts für Biochemie. G-I-T, Fachz. Lab. 16: 928
- Stella, M. C., Schauerte, H., Straub, K. L., Leptin, M. (1994): Identification of secreted and cytosolic gelsolin in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 125: 607-616
- Stossel, T. P. (1989): From signal to pseudopod. *J. Biol. Chem.* 264: 18261-18264
- Stossel, T. P., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Kwiatkowski, D. J. (1999): Cell crawling two decades after Abercrombie. *Biochem. Soc. Symp.* 65: 267-280
- Strehler, E. E., Periasamy, M., Strehler-Page, M.-A., Nadal-Ginard, B. (1985): Myosin light-chain 1 and 3 gene has two structurally distinct and differentially regulated promoters evolving at different rates. *Mol. Cell Biol.* 5: 3168-3182
- Strzelecka-Golaszewska, H., Hinssen, H., Sobieszek, A. (1985): Influence of an actin-modulating protein from smooth muscle on actin-myosin interaction. *FEBS Lett.* 177: 209-216
- Suck, D., Kabsch, W., Mannherz, G. (1981): Three-dimensional structure of the complex of skeletal muscle actin and bovine pancreatic DNase I at 6 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 78: 4319-4323
- Suhler, E., Lin, W., Yin, H. L., Lee, W. M. (1997): Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Crit. Care Med.* 25: 594-598
- Sun, H. Q., Wooten, D. C., Janmey, P. A., Yin, H. L. (1994): The actin side-binding domain of gelsolin also caps actin filaments. Implications for actin filament severing. *J. Biol. Chem.* 269: 9473-9479
- Sun, H. Q., Kwiatkowski, K., Yin, H. L. (1995): Actin monomer binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 102-110
- Sun, H. Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., Yin, H. L. (1999): Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 274: 33179-33182

- Sussman, M. A., Sakhi, S., Barrientos, P., Ito, M., Kedes, L. (1994): Tropomodulin in rat cardiac muscle. Localization of protein is independent of messenger RNA distribution during myofibrillar development. *Circ. Res.* 75: 221-232
- Sutherland, J. D., Witke, W. (1999): Molecular genetic approaches to understanding actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 142-151
- Svitkina, T. M., Borisy, G. G. (1999): Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145: 1009-1026
- Tanaka, J., Kira, M., Sobue, K. (1993): Gelsolin is localized in neuronal growth cones. *Dev. Brain Res.* 76: 268-271
- Tanaka, J., Sobue, K. (1994): Localization and characterization of gelsolin in nervous tissues: gelsolin is specifically enriched in myelin-forming cells. *J. Neurosci.* 14(3): 1038-1052
- Teubner, A., Sobek-Klocke, I., Hinssen, H., Eichenlaub-Ritter, U. (1994): Distribution of gelsolin in mouse ovary. *Cell Tissue Res.* 276: 535-544
- Thiele, I. (1991): Analyse der Isoformen und funktionelle Charakterisierung von proteolytischen Fragmenten des Actin-Modulators von *Lumbricus terrestris*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673-4680
- T'Jampens, D. T., Meerschaert, K., Constantin, B., Bailey, J., Cook, L. J., De Corte, V., De Mol, H., Goethals, M., Van Damme, J., Vandekerckhove, J., Gettemans, J. (1997): Molecular cloning, overexpression, developmental regulation and immunolocalization of fragminP, a gelsolin-related actin-binding protein from *Physarum polycephalum* plasmodia. *J. Cell Sci.* 110: 1215-1226
- T'Jampens, D., Bailey, J., Cook, L. J., Constantin, B., Vandekerckhove, J., Gettemans, J. (1999): *Physarum* amoebae express a distinct fragmin-like actin-binding protein that controls *in vitro* phosphorylation of actin by the actin-fragmin kinase. *Eur. J. Biochem.* 265: 240-250
- Toker, A. (1998): The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 254-261
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- Troyer, D., Cameron, M. L. (1980): Spermiogenesis in lumbricid earthworms revisited. I – Function and fate of centrioles, fusion of organelles and organelle movement. *Biol. Cellulaire* 37: 273-286
- Troyer, D. (1980): Spermiogenesis in lumbricid earthworms revisited. II – Elongation and shortening of the spermatid nucleus and the roles of microtubules and chromatin in organelle shaping. *Biol. Cellulaire* 37: 287-292
- Uyeda, T. Q. P., Hatano, S., Kohama, K., Uruya, M. (1988): Purification of myxamoebal fragmin, and switching of myxamoebal fragmin to plasmodial fragmin during differentiation of *Physarum polycephalum*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 9: 233-240
- Vandekerckhove, J., Weber, K. (1978): At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the aminoterminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 126: 783-802

- Vandekerckhove, J., Weber, K. (1984): Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J. Mol. Biol.* 179(3): 391-413
- Van Troys, M., Dewitte, D., Goethals, M., Vanderkerckhove, J., Ampe, C. (1996): Evidence for an actin binding helix in gelsolin segment 2; have homologous sequences in segments 1 and 2 of gelsolin evolved to divergent actin binding functions? *FEBS Lett.* 397: 191-196
- Verheyen, E. M., Cooley, L. (1994): Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* 120: 717-728
- Vinson, V. K., Archer, S. J., Lattman, E. E., Pollard, T. D., Torchia, D. A. (1993): Three-dimensional solution structure of *Acanthamoeba* profilin-I. *J. Cell Biol.* 122: 1277-1283
- Vogl, A. W., Grove, B. D., Lew, G. J. (1986): Distribution of actin in Sertoli cell ectoplasmic specializations and associated spermatids in the ground squirrel testis. *Anat. Rec.* 215(4): 331-341
- Vouyiouklis, D., Brophy, P. J. (1997): A novel gelsolin isoform expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *J. Neurochem.* 69: 995-1005
- Wang, L. L., Spudich, J. A. (1984): A 45,000-mol-wt protein from unfertilized sea urchin eggs severs actin filaments in a calcium-dependent manner and increases the steady-state concentration of nonfilamentous actin. *J. Cell Biol.* 99(3): 844-851
- Waterston, R., Martin, C., Craxton, M., Coulson, A. (1992): A survey of expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genet.* 1: 114-123
- Way, M., Weeds, A. G. (1988): Nucleotide sequence of pig plasma gelsolin. Comparison of protein sequence with human gelsolin and other actin-severing proteins shows strong homologies and evidence for large internal repeats. *J. Mol. Biol.* 203: 1127-1133
- Weber, A., Pring, M., Lin, S.-L., Bryan, J. (1991): Role of the N- and C-terminal actin-binding domains of gelsolin in barbed filament end capping. *Biochemistry* 30: 9327-9334
- Weber, A. (1999): Actin binding proteins that change extent and rate of actin monomer-polymer distribution by different mechanisms. *Mol. Cell Biochem.* 190: 67-74
- Weeds, A. G., Gooch, J., McLaughlin, P., Pope, B., Bengtsdotter, M., Karlsson, R. (1995): Identification of the trapped calcium in the gelsolin segment 1-actin complex: implication for the role of calcium in the control of gelsolin activity. *FEBS Lett.* 360: 227-230
- Wegner, A. (1976): Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* 108: 139-150
- Wegner, A. (1982): Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. *J. Mol. Biol.* 161: 607-615
- Welch, J. E., O'Rand, M. G. (1985): Identification and distribution of actin in spermatogenic cells and spermatozoa of the rabbit. *Dev. Biol.* 109(2): 411-417
- Wieland, T. (1986): Peptides of poisonous *Amanita* mushrooms. In: *Phallotoxins*, pp. 69-88, Springer-Verlag, New York
- Yamamoto, K., Pardee, J. D., Reidler, J., Stryer, L., Spudich, J. A. (1982): Mechanism of interaction of *Dictyostelium* severin with actin filaments. *J. Cell Biol.* 95: 711-719
- Yin, H. L., Stossel, T. P. (1979): Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281: 583-586
- Yin, H. L., Stossel, T. P. (1980): Purification and structural properties of gelsolin, a Ca^{++} -activated regulatory protein of macrophages. *J. Cell Biol.* 255: 581-586
- Yin, H. L., Albrecht, J. H., Fattoum, A. (1981): Identification of gelsolin, a Ca^{2+} -dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. *J. Cell Biol.* 91: 901-906

- Yin, H. L., Stull, J. T. (1999): Proteins that regulate dynamic actin remodeling in response to membrane signaling. *J. Biol. Chem.* 274: 32529-32530
- Yu, F.-X., Zhou, D., Yin, H. L. (1991): Chimeric and truncated gCap39 elucidate the requirements for actin filament severing and end capping by the gelsolin family of proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 19269-19275
- Yu, F.-X., Sun, H.-W., Janmey, P. A., Yin, H. L. (1992): Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. *J. Biol. Chem.* 267: 14616-14621

7. Anhang

Abkürzungen

[X]:	Konzentration von X
APS:	Ammoniumperoxidsulfat
AS:	Aminosäure
bp:	Basenpaare
BCIP:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat-p-Toluidinsalz
bp:	Basenpaar(e)
BSA:	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CBB:	Coomassie Brilliant Blue
cDNA:	komplementäre DNA
Da:	Dalton
DEAE:	Diethylaminoethyl
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase:	Desoxyribonuklease
dNTP:	desoxy-Nukleotidtriphosphat
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA:	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl-)tetraessigsäure
EWAM:	Regenwurm-Actin-Modulator (earthworm actin modulator)
F-Actin:	filamentöses Actin (Polymerform)
FITC:	Fluorescein-Isothiocyanat
g:	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-Actin:	globuläres Actin (Monomerform)
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
kb:	Kilobasen, 1000 Basen
kDa:	Kilodalton, 1000 Dalton
Lys-C:	Endoproteinase aus <i>Lysobacter enzymogenes</i> (Boehringer), spaltet spezifisch Peptidbindungen C-terminal an Lysin
LB:	Luria Broth
LPA:	Lysophosphorsäure
M:	mol * l ⁻¹
min:	Minute
NBT:	Nitroblautetrazoliumsalz
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P1 bis P4:	1. bis 4. Aktivitätspeak der Ionenaustauscher-Chromatographie, EWAM-Isoformen 1 bis 4
PBS:	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PIP:	Phosphatidylinositol-4-monophosphat
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
RNA:	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase:	Ribonuklease
rpm:	Umdrehungen pro Minute
rRNA:	ribosomale RNA
RTase:	Reverse Transkriptase
RT-PCR:	Kombination aus Reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

SDS: Natriumdodecylsulfat (sodium-dodecylsulfate)
 SSC: Standard Sodium Citrate
 Taq-Polymerase: DNA-abhängige DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*
 TBE: TRIS-Borat-EDTA-Puffer
 TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
 TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
 TRITC: Tetramethylrhodaminisothiocyanat
 Triton X-100: Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
 u: Einheit der Enzymaktivität
 ü. N.: über Nacht
 UV: Ultraviolett
 v/v: Volumen/Volumen-Verhältnis
 w/v: Gewichts/Volumen-Verhältnis

Abkürzungen für Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. J. D`Haese, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, das motivierende Interesse an meiner Arbeit und die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und Ratschläge. Herrn Prof. Dr. H. Greven möchte ich für die Bereitschaft danken, meine Arbeit als Zweitgutachter zu referieren.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. D`Haese, Prof. Greven, Prof. Mehlhorn und Prof. Wunderlich möchte ich für das gute, freundschaftliche Arbeitsklima danken. Meinen Kollegen Ernst Kiehl und Dr. Thomas Giebing danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft. Joachim Pirch bin ich besonders für sein gewissenhaftes Korrekturlesen und seine Hilfe bei der Lösung von Computerproblemen dankbar.

Für technische Assistenz und Unterstützung bei der Erstellung der Abbildungen bedanke ich mich bei Martin Fey, Hanne Horn und Steffen Köhler.

