

Isolierung und Charakterisierung von α -Aktinin und titinartiger Proteine der schräggestreiften Muskulatur

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Claudia Ines Soika
aus Aachen

Düsseldorf, April 2015

aus dem Institut für Zellbiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. D'Haese

Korreferent: Prof. Dr. Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2015

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	4
1.1	Muskelsysteme	4
1.2	Der Aufbau der Z-Elemente	6
1.3	α -Aktinin	8
3.1.1	Die α -Aktinin Struktur	8
3.1.2	Die α -Aktinin/Aktin-Interaktion und ihre Regulation	10
1.3	Titin und titinartige Proteine	11
3.1.3	Die Interaktion von α -Aktinin und Titin bzw. titinartigen Proteinen	15
1.4	Das Ziel dieser Arbeit	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Isolierungen verschiedener Muskel-Proteine	18
2.1.1	Präparation der Hautmuskelschläuche	18
2.1.2	Herstellung von Homogenaten	18
2.1.3	Isolierung von α -Aktinin aus Hautmuskelschläuchen	18
2.1.4	Reinigung von α -Aktinin durch Säulenchromatografie	19
2.1.5	Isolierung von Mini-Titin aus Hautmuskelschläuchen	21
2.1.6	Isolierung von Titin aus Hautmuskelschläuchen	22
2.2	Methoden der Proteinanalyse	24
2.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	24
2.2.2	Konzentrieren und Entsalzen	24
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.2.4	Western Blot und Antikörper-Reaktion	26
2.2.5	Isoelektrische Fokussierung	28
2.2.6	Abschätzung der Molmassen hochmolekularer Proteine	29
2.2.7	MS-Analyse	30
2.2.8	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	31
2.2.9	Längenbestimmung der hochmolekularen Proteine	32
2.3	Nachweis von Protein-Interaktionen	32
2.3.1	Kosedimentation	32
2.3.2	Kugelfall-Viskosimetrie	33
2.3.3	Fluorometrie	33
2.4	Molekularbiologische Methoden	34
2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und verwendete Primer	34
2.4.2	Reinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte	36
2.4.3	Ligation und Transformation	36
2.4.4	Detektion und Isolierung geeigneter Plasmide	36
2.4.5	Agarosegele	36
2.4.6	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	37
2.4.7	Screening der λ -ZAP-cDNA-Genbank	37
2.4.8	Isolierung von RNA	39

2.4.9	5'/3' RACE (rapid amplification of cDNA-ends)	40
2.5	Online-Datenbanken und Computerprogramme	41
3	ERGEBNISSE	42
3.2	Isolierung von α-Aktinin	42
3.3	Identifizierung und Charakterisierung von α-Aktinin	50
3.3.1	Bestimmung der nativen Masse mittels Gelfiltration	50
3.3.2	Nachweis von α -Aktinin mit Antikörpern	51
3.3.3	Isoelektrische Fokussierung	55
3.3.4	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	57
3.3.5	Die Kosedimentation	57
3.3.6	Ermittlung der α -Aktinin-Sequenz	59
3.4	Isolierung titinartiger Proteine	64
3.4.1	Die Isolierung von Mini-Titinen	66
3.4.2	Die Isolierung von Titin	69
3.4.3	Mit dem α -Aktinin isolierte 170/185 kDa Proteine	72
3.5	Charakterisierung titinartiger Proteine	73
3.5.1	Abschätzung der molekularen Massen	73
3.5.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	74
3.5.3	Nachweis titinartiger Proteine mit Antikörpern	78
3.5.4	MS-Analyse	80
3.6	Interaktion von α-Aktinin mit titinartigen Proteinen	84
3.7	Interaktion von Aktin mit den 170/185 kDa Titin-Fragmenten	87
4	DISKUSSION	92
4.1	α-Aktinin aus der schräggestreiften Muskulatur	92
4.1.1	Optimierung der Präparation	93
4.1.2	Charakterisierung des isolierten 100 kDa Proteins	94
4.1.3	Funktionen der Neck-Region	100
4.1.4	Interaktionen von α -Aktinin und ihre Bedeutung	101
4.1.5	Der Einfluss von Phospholipiden.	103
4.1.6	Die Interaktion von α -Aktinin und Titin	107
4.2	Die titinartigen Proteine	108
5	ZUSAMMENFASSUNG	116
	SUMMARY	117
6	QUELLEN	118
6.1	Literatur	118
6.2	Datensätze aus online Datenbanken	126

7	ANHANG	127
7.1	α -Aktinin-Sequenz des <i>L. terrestris</i>	127
7.2	Positionen der Peptide aus der MS-Analyse	129
7.3	Abkürzungsverzeichnis	130
8	DANKSAGUNG	133
9	ERKLÄRUNG	134

1 Einleitung

1.1 Muskelsysteme

Muskeln ermöglichen Bewegungen von Menschen und Tieren, sie sind zur Kontraktion fähig. Hierzu besitzen alle differenzierten Muskelzellen kontraktile Einheiten, die aus drei Filament-Typen aufgebaut sind und durch Z-Elemente begrenzt werden. Diese Myofilamente sind die dicken Myosin-Filamente, die dünnen Aktin-Filamente und die superdünnen Titin-Filamente. Die superdünnen und die dünnen Filamente sind in den Z-Elementen verankert. Die Myosin-Filamente werden durch die superdünnen Filamente in der Mitte der kontraktile Einheiten zentriert. Während der Kontraktion des Muskels interagieren die Myosin-Filamente mit den Aktin-Filamenten, dieses bewirkt eine Verkürzung der kontraktile Einheiten und damit letztlich des gesamten Muskels.

In der quergestreiften Muskulatur werden diese kontraktile Einheiten als Sarkomere bezeichnet. Die Querstreifung, die im mikroskopischen Bild beobachtet wird, wird durch die parallele, in Register gesetzte Anordnung der Filamente bewirkt (Abb. 1). Das Sarkomer wird in der quergestreiften Muskulatur durch die Z-Scheiben begrenzt und hat in der Skelettmuskulatur der Vertebraten eine durchschnittliche Größe von 2,5 μm .

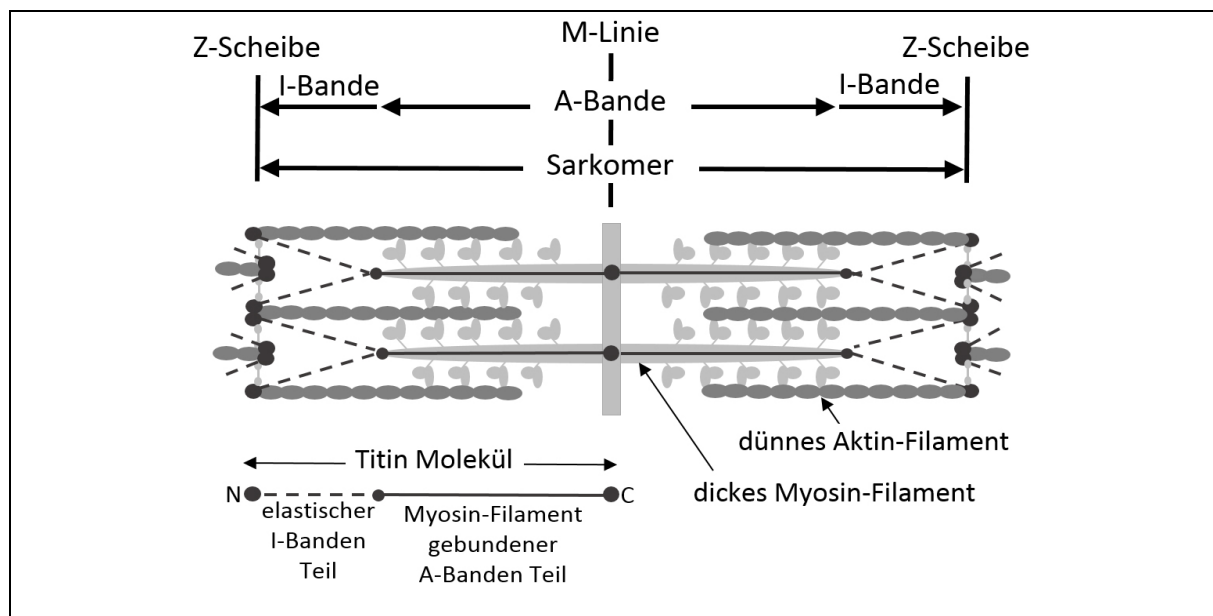


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Sarkomers des quergestreiften Muskels.

Von den Z-Scheiben ragen beidseitig dünne Aktin-Filamente und superdünne Titine in die benachbarten Sarkomere. Bereiche die nur dünne und superdünne Filamente enthalten werden als I-Banden bezeichnet. Im Zentrum der Sarkomere liegen die dicken Myosin-Filamente, dieser Bereich wird als A-Bande bezeichnet, in deren Zentrum sich die M-Linie befindet. Im Vertebraten Skelettmuskel überspannen die Titin-Filamente ein halbes Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (verändert nach Tskhovrebova & Trinick 2010).

Der Ordnungsgrad der Myofilamente variiert in verschiedenen Muskeltypen. So weist die quergestreifte Skelettmuskulatur der Vertebraten einen hohen Ordnungsgrad auf, währenddessen die glatte Muskulatur, wie sie in kontraktiven Hohlorganen wie dem Magen, Darm oder den Blutgefäßen vorkommt, weniger geordnet erscheint.

Bei den wirbellosen Tieren lassen sich anhand der Streifung drei grundlegende Muskeltypen unterscheiden: die quergestreifte, die der Vertebraten Skelettmuskulatur ähnelt, die schräggestreifte Muskulatur und die glatte Muskulatur (Paniagua *et al.*, 1996). Die schräggestreifte Muskulatur tritt häufig im Zusammenhang mit einem Hydroskelett auf und ist unter anderem bei Nematelminthen, Anneliden (Hanson, 1957; Lanzavecchia *et al.*, 1987) und Mollusken zu finden (Paniagua *et al.*, 1996). Dieser Muskeltyp lässt sich strukturell zwischen der glatten Muskulatur und der quergestreiften Muskulatur einordnen und kommt u.a. im Hautmuskelschlauch des *Lumbricus terrestris* vor (Lanzavecchia *et al.*, 1987).

Die verschiedenen Muskeltypen sind an unterschiedliche Anforderungen angepasst.

Die Skelettmuskeln ermöglichen schnelle und kräftige oder ausdauernde Bewegungen, während die glatte Muskulatur in der Regel langsamer und unwillkürlich arbeitet. Die Besonderheit der schräggestreiften Muskulatur des *L. terrestris* liegt in der Fähigkeit, auch bei starker Dehnung noch Kraft aufzubringen und in ihrer enormen Kontraktionsfähigkeit von bis zu 75 % (D'Haese & Ditzens, 1987). Dies beruht neben der Verkürzung der einzelnen Sarkomere durch das ineinander Gleiten der Aktin- und Myosin-Filamente auch auf ihrer besonderen Anordnung (Abb. 2). Die Schrägstreifung kommt durch die A- und I-Banden zustande, die hier in einem spitzen Winkel zur Längsachse der Fasern angeordnet sind. Bei der Kontraktion vergrößert sich der Winkel zur Längsachse und hieraus resultiert eine zusätzliche Verkürzung (Heumann & Zebe, 1967).

Ein weiterer Unterschied zur quergestreiften Muskulatur ist das Fehlen von Z-Scheiben in der schräggestreiften Muskulatur. Die strukturell analogen Elemente zu den Z-Scheiben sind in der schräggestreiften Muskulatur die Z-Stäbe.

Werden die Sarkomerlängen der Vertebraten und der Evertbraten verglichen, zeigen die Evertbraten eine wesentlich größere Variationsbreite. In der schräggestreiften Muskulatur wurden deutlich größere Sarkomere gefunden. Der Abstand zwischen zwei Z-Stäben einer kontraktiven Einheit von *Eisenia foetida* wird mit 6,5 μm (Royuela *et al.*, 2000) und der bei *L. terrestris* mit $>4,8 \mu\text{m}$ angegeben (Lanzavecchia *et al.*, 1987).

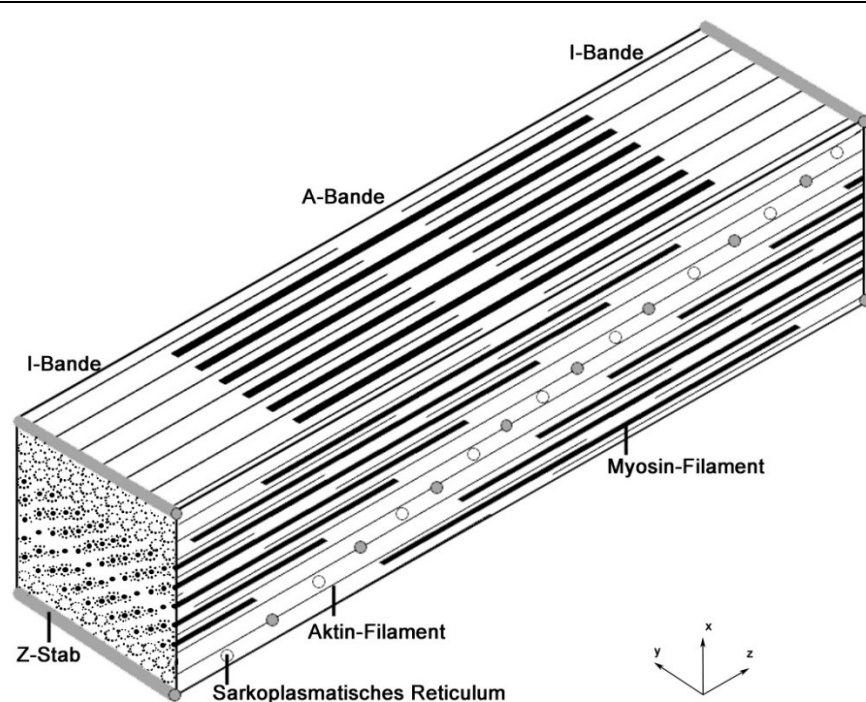


Abb. 2: Aufbau der schräggestreiften Muskulatur.

In der schräggestreiften Muskulatur sind die A- und I-Banden in einem spitzen Winkel zur Längsachse der Fasern angeordnet. Bei der Kontraktion vergrößert sich der Winkel zur Längsachse (Heumann & Zebe, 1967). Die Aktin-Filamente sind in den Z-Stäben verankert, die die analogen Strukturen zu den Z-Scheiben darstellen. Die schräggestreifte Muskulatur wird von dem sarkoplasmatischen Retikulum durchzogen, das zwischen den Z-Stäben lokalisiert ist.

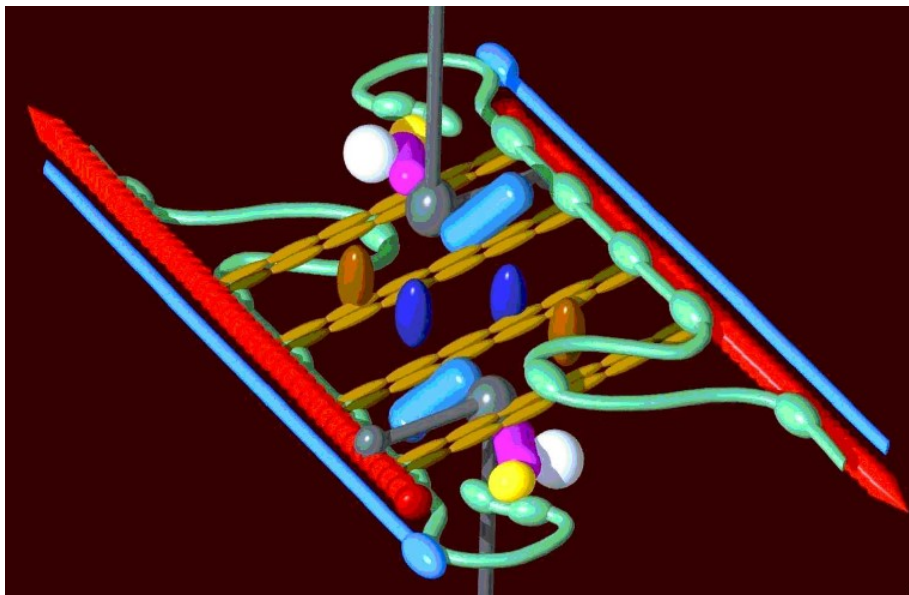
1.2 Der Aufbau der Z-Elemente

In den Z-Scheiben sind die Plus-Enden der Aktin-Filamente und der N-Terminus der superdünnen Titin-Filamente verankert. Elektronenmikroskopisch stellen die Z-Scheiben im Querschnitt ein zick-zack artiges Band dar, dessen Dicke zwischen 30 - 140 nm variiert (Luther, 2009). Sie wird durch die Anzahl der α -Aktinine bestimmt, die zwei Aktin-Filamente vernetzen. Die Anzahl variiert von zwei bis zu sechs α -Aktininen (Luther, 2009).

Z-Scheiben sind aus einer Vielzahl verschiedener Proteine aufgebaut und werden als eine der komplexesten makromolekularen Strukturen in der Biologie bezeichnet (Zou *et al.*, 2006). Sie unterliegen während der Muskelkontraktion erheblichen Belastungen und geben dem Sarkomer mechanische Stabilität. Darüber hinaus wirken sie als Mechanorezeptoren und Mechanowandler auf den intrazellulären Signaltransport ein (Knöll *et al.*, 2011).

In den Z-Scheiben der Skelettmuskulatur sind neben den Proteinen α -Aktinin, Aktin, Titin, und Nebulin weitere Proteine lokalisiert, 227 Genprodukte bzw. Proteine sind beschrieben (Knöll

et al., 2011). Die Proteine der Z-Scheibe bilden ein stabiles Netzwerk, in dem α -Aktinin eine zentrale Rolle spielt, da es mit vielen dieser Proteine interagiert (Abb. 3). Hierzu gehören neben Aktin und Titin unter anderem auch Cap Z, Myotilin, FATZ (auch als Calsarcin und Myozenin bezeichnet), ALP (α -Aktinin assoziiertes LIM Protein) und Cypher (auch als ZASP oder Oracle bezeichnet) (Faulkner *et al.*, 2001; Luther, 2009). ALP und Cypher/ZASP/Oracle enthalten C-terminal LIM-Domänen, spezifischen Zink-Finger-Strukturen, die Protein-Protein-Interaktionen bewirken. LIM-Proteine interagieren mit Transkriptionsfaktoren und stellen darüber eine Verbindung zum Nukleus her, deshalb wird vermutet, dass z. B. ALP und Cypher/ZASP/Oracle Signale der mechanosensitiven Z-Scheiben in den Kern weiterleiten, bzw. daran beteiligt sind (Frank & Frey, 2011).



Copyright © 2001 International Union of Biochemistry and Molecular Biology

Abb. 3: Hypothetisches Modell der Z-Scheibe.

Die antiparallelen Aktin-Filamente (rot) werden durch α -Aktinine (hellbraun) vernetzt. Der N-terminale Teil des Titins (grün) interagiert mit Telethonin (gelb) und mit dem C-terminalen Teil des Nebulins (blauer Stab). Über eine variierende Anzahl an Z-Repeats und eine weitere Bindungsstelle (grüne Ovale) interagiert das Titin (grün) mit α -Aktininen. FATZ (pink) bindet an α -Aktinin, Telethonin, Calcineurin (weiß) und Filamin (grau). Letzteres bindet auch an F-Aktin, Myotilin (hellblau) und Sakroglykane der Zellmembran (nicht dargestellt). ALP und Cypher/ZASP/Oracle (dunkelblau und braun) binden an die Spektrin-Repeats des α -Aktinins. Einige Proteine weisen mehrere Bindungspartner auf, so können sowohl konkurrierende als auch simultane Bindungen auftreten. (Faulkner *et al.*, 2001)

Die molekulare Organisation der Z-Scheiben und Z-Stäbe ist aufgrund der Komplexität nicht vollständig geklärt. Insbesondere über den Aufbau der Z-Elemente in den verschiedenen Muskeltypen der wirbellosen Tiere ist wenig bekannt.

1.3 α -Aktinin

Immunochemische Untersuchungen zum Aufbau der Z-Stäbe in der schräggestreiften Muskulatur der Anneliden ergaben, dass α -Aktinin Bestandteil der Z-Stäbe im Hautmuskelschlauch von *Eisenia foetida* ist (Royuela *et al.*, 1999).

α -Aktinin kommt in einer Vielzahl von Organismen und Geweben vor und wurde unter anderem immunologisch oder genetisch identifiziert in *Dictyostelium discoideum* (Witke *et al.*, 1986), *Caenorhabditis elegans* (Fyrberg *et al.*, 1990), *Drosophila melanogaster*, *Helix aspersa*, *Eisenia foetida* (Royuela *et al.*, 1999; Hooper & Thuma, 2005) und in vielen Vertebraten wie auch *Homo sapiens* (Beggs *et al.*, 1992; Mills *et al.*, 2001). In Bakterien- und Pflanzen-Genomen konnte bisher kein Gen für ein α -Aktinin nachgewiesen werden (Virel & Backman, 2004).

Wo Aktin-Filamente vernetzt werden ist auch α -Aktinin zu finden, neben den Muskelzellen auch in den Stressfasern und Fokalkontakten der Nicht-Muskelzellen. So ist α -Aktinin in unterschiedlichsten Organen wie der Leber, der Niere und dem Gehirn nachgewiesen worden (Dixon *et al.*, 2003).

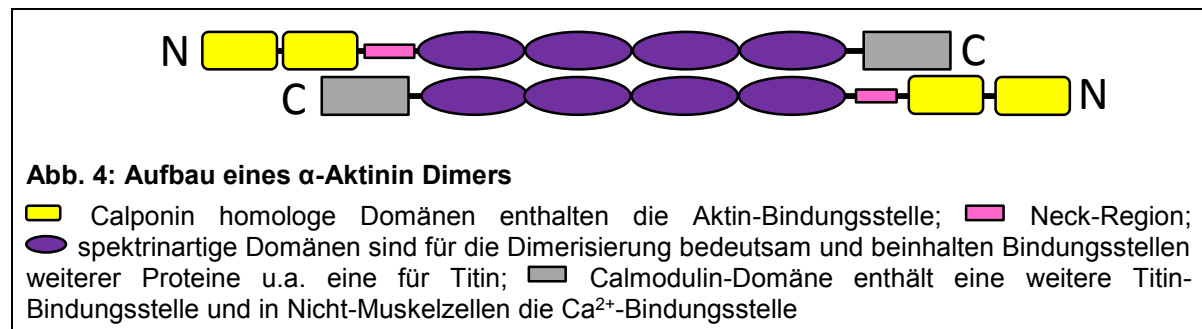
Vertebraten bilden gewebsspezifische α -Aktinin Varianten aus, so sind bei *Homo sapiens* im Cytoskelett der Nicht-Muskelzellen α -Aktinin 1 und 4 vorhanden (Sjöblom *et al.*, 2008) und in der glatten Muskulatur eine Spleiß-Variante des α -Aktinin 1 (Waites *et al.*, 1992). In den quergestreiften Muskeln befinden sich die α -Aktinine 2 und 3 (Sjöblom *et al.*, 2008).

3.1.1 Die α -Aktinin Struktur

Nativ dimerisieren α -Aktinin Moleküle antiparallel und haben dann eine hantelförmige Gestalt. α -Aktinin Monomere sind ca. 40 nm lang (Condeelis *et al.*, 1984) und 3 - 4 nm breit (Blanchard *et al.*, 1989), bei Vertebraten sind sie aus 892 - 911 Aminosäuren (*H. sapiens*: 2676 - 2733 bp) aufgebaut und besitzen eine Masse von 94 - 103 kDa (Blanchard *et al.*, 1989). Das N-terminale Kopfende des α -Aktinin Moleküls besteht aus zwei Calponin homologen Domänen (CH1 und CH2) auch Aktin-Bindungsdomänen (ABD) genannt, die über einen flexiblen Hals-Bereich („Neck-Region“) mit vier spektrinartigen Domänen verbunden sind, gefolgt von dem C-terminalen, Calmodulin ähnlichen Teil (Sjöblom *et al.*, 2008) (Abb. 4). Wird α -Aktinin aus der Hühner Skelettmuskulatur proteolytisch mit Chymotrypsin abgebaut erhält man ein 34 kDa Fragment mit der Aktin-Bindungsstelle, ein 55 kDa Fragment mit den spektrinartigen Domänen und ein 68 kDa Fragment, das die spektrinartigen und Calmodulin-Domänen enthält (Fukami *et al.*, 1996). Darüber hinaus ist ein 88 kDa Fragment beschrieben, dass die Aktin-Bindungs-

und die Spektrin-Domänen beinhaltet (Fukami *et al.*, 1996). Aus der Differenz ergibt sich für die Calmodulin-Domäne eine Fragmentgröße von 13 - 14 kDa.

Funktionell ist der spektrinartige Bereich für die Dimerisierung und als Bindungsstelle für weitere Moleküle bedeutsam (Djinovic-Carugo *et al.*, 2002). Die Spektrin-Domänen und die dazwischen liegenden Verbindungsstücke verleihen dem α -Aktinin die Elastizität, die dem quervernetzenden Molekül erlaubt, mechanischer Belastung standzuhalten (Otey & Carpen, 2004).



Das generelle Muster der α -Aktinine findet sich weitgehend auch bei Evertrebraten. Atypische α -Aktinine sind in *Entamoeba histolytica* mit nur einer und in *Schizosaccharomyces pombe* mit zwei spektrinartigen Domänen gefunden worden (Virel & Backman, 2004). Vergleicht man α -Aktinine verschiedener Spezies, zeigt sich, dass die N- und C-terminalen Bereiche konserviert sind, während in den spektrinartigen Bereichen eine größere Variationsbreite auftritt (Virel & Backman, 2004).

Vertebraten α -Aktinine werden durch eine kleine Gen-Familie codiert. Beim Menschen sind vier α -Aktinin-Gene bekannt (Sjöblom *et al.*, 2008), während bei Evertrebraten bisher jeweils nur ein Gen gefunden wurde. Bei *C. elegans* sind vier Spleiß-Varianten beschrieben (Wormbase: W04D2.1 a-d) und bei *D. melanogaster* sind fünf verschiedene α -Aktinin Spleiß-Varianten bekannt, die im larvalen bzw. adulten Muskel und in Nicht-Muskelgeweben nachgewiesen wurden (Fyrberg *et al.*, 1990; Roulier *et al.*, 1992).

Aus den Sequenzen berechnete isoelektrische Punkte liegen bei Vertebraten α -Aktininen zwischen pH 5,23 und pH 5,39 (ExPASy). Experimentell wurden elf isoelektrische Punkte für α -Aktinine aus dem Hühnermagen bestimmt, mit Werten zwischen pH 5,46 bis pH 6,6 (Endo & Masaki, 1982). α -Aktinin 1, wie es im Hühnermagen vorkommt, hat einen aus der Sequenz berechneten Wert von 5,31 pl.

Die Spleiß-Varianten der *D. melanogaster* α -Aktinine sind aus 892 - 924 Aminosäuren (103 - 107 kDa) aufgebaut bzw. werden durch 2685 - 2772 Basenpaare codiert. Sie haben etwas höhere isoelektrische Punkte von 5,45 - 5,51 pl, ebenfalls aus den Sequenzen berechnet.

α -Aktinine weisen viele posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, Acetylierungen, Ubiquitierungen und Methylierungen auf. Bereits 1977 konnten Singh *et al.*, die Acetylierung des N-Terminus von α -Aktininen aus verschiedenen Vertebraten Muskeln zeigen. Funktionell wirken solche Modifikationen auf die Protein-Protein-Wechselwirkungen ein, so wiesen Izaguirre *et al.* (2001) nach, dass die Focal Adhesion Kinase (FAK) ein Tyrosin im Bereich der ersten Calponin-Domäne des humanen α -Aktinin 4 phosphoryliert und mit dieser Phosphorylierung das α -Aktinin schlechter mit Aktin kosedimentiert als unphosphoryliertes α -Aktinin.

3.1.2 Die α -Aktinin/Aktin-Interaktion und ihre Regulation

Im Vertebraten Skelettmuskel liegt der α -Aktinin-Gehalt bei 1 % der gesamten Proteinmenge. α -Aktinine organisieren Aktin-Strukturen, indem sie F-Aktin durch Querbrücken in paralleler oder antiparalleler Anordnung bündeln.

Hieran sind jeweils zwei Aktin-Moleküle des F-Aktins beteiligt. Humanes α -Aktinin 3 hat drei Bereiche, die an der Interaktion mit Aktin beteiligt sind. Diese liegen in der CH1 Domäne (Aktin-Bindungsstelle (ABS) 1: 48 - 57 AS und ABS 2: 123 - 147 AS) und in der Verbindungsregion zwischen den CH Domänen 1 und 2 (ABS 3: 153 - 172 AS) (Sjöblom *et al.*, 2008).

Die bevorzugten Winkel zwischen α -Aktinin Dimeren und F-Aktin betragen 60° und 120°, aber auch 180° und 90° wurden beobachtet (Meyer & Aebi, 1990; Hampton *et al.*, 2007). Diese Variationsbreite erfordert eine hohe Flexibilität der Kopf-Region. Für die variable Orientierung der Aktin bindenden Domäne, die sowohl eine hochgeordnete, antiparallele Anordnung der Aktin-Filamente in den Z-Scheiben der quergestreiften Muskeln ermöglicht, als auch eine variablere Orientierung der Aktin-Filamente in Nicht-Muskelzellen zulässt, ist vermutlich die Neck-Region verantwortlich (Sjöblom *et al.*, 2008).

Für α -Aktinin aus der glatten Hühnermuskulatur wurde nachgewiesen, dass die Bindung von α -Aktinin an F-Aktin temperatur-abhängig ist. Je höher die Temperatur ist, desto höher ist auch die Dissoziationskonstante (Xu *et al.*, 1998). Bei 37 °C bindet α -Aktinin wesentlich schlechter an F-Aktin als bei 0 °C (Kuroda *et al.*, 1994). Darüber hinaus ist die F-Aktin/ α -Aktinin-Interaktion von der Salzkonzentration (KCl) abhängig. Kuroda *et al.* (1994) zeigten, dass das α -Aktinin der Hühnerbrustmuskulatur bei einer KCl Konzentration von 100 mM an F-Aktin in einem molaren Verhältnis von 1:20 bindet, während bei einer Konzentration von 10 mM KCl das Verhältnis bei 1:68 (α -Aktinin/Aktin) liegt.

Meyer & Aebi (1990) haben in Kosedimentations-Experimenten die Dissoziationskonstanten für α -Aktinin aus dem Hühnermagen mit 1,2 μ M (37 °C) bzw. 0,4 μ M (22 °C) und aus

Dictyostelium mit 2,7 μM (22 °C) bestimmt. α -Aktinin aus der glatten Muskulatur hat eine wesentlich geringere Affinität zu F-Aktin als α -Aktinin aus der Skelettmuskulatur.

Neben der Bindung von Aktin-Filamenten ist α -Aktinin mit einer Vielzahl weiterer Cytoskelett Proteine, Molekülen der Signaltransduktionswege (PIP_2 ; PIP_3 ; Ca^{2+}), cytoplasmatischen Domänen von Transmembran Rezeptoren und Ionenkanälen assoziiert (Sjöblom *et al.*, 2008). Bisher sind vier Mechanismen identifiziert worden, durch die die α -Aktinin-Interaktionen reguliert werden: die Bindung von Calcium-Ionen, die Phosphorylierung durch Tyrosin-Kinasen, die Bindung an Phosphatidylinositol-Intermediate und die Beeinflussung durch Proteasen (Otey & Carpen, 2004). Die genannten Mechanismen sind überwiegend in Nicht-Muskelzellen beobachtet worden und werden deshalb hier nur in Ansätzen dargestellt. Einen weitergehenden Überblick hierzu geben Otey & Carpen (2004).

Die Vertebraten α -Aktinine 1 und 4 der Nicht-Muskelgewebe sind Calcium sensitiv (Rosenberg *et al.*, 1981), währenddessen die α -Aktinine 2 und 3 der Skelettmuskulatur nicht Calcium sensitiv sind (Virel & Backman, 2004). In den Nicht-Muskelzellen der Vertebraten ist die α -Aktinin/Aktin-Interaktion Ca^{2+} reguliert. Hierfür sind die EF-Hand-Motive in dem Calmodulin-Domänen verantwortlich. Das EF-Hand-Motiv ist durch eine Helix-Loop-Helix-Sekundärstruktur definiert, wobei jeweils ein Ca^{2+} an bestimmte Liganden eines Loops bindet. In der kanonischen Sequenz der EF-Hände sind diese Liganden semi-konservativ, ein Austausch verhindert die Bindung eines Ca^{2+} (Gifford *et al.*, 2007).

Das α -Aktinin 1 bildet eine Ausnahme, es kommt in der glatten Muskulatur vor und ist dann nicht Calcium sensitiv, da es eine Spleiß-Variante ist, die dadurch die Sensitivität für Ca^{2+} verliert, so dass in allen Muskeln die α -Aktinin/Aktin-Interaktion nicht Ca^{2+} reguliert ist (Wenegieme *et al.*, 1994).

Bei Evertrebraten wird die Interaktion von α -Aktinin mit F-Aktin im Muskel vermutlich nicht Ca^{2+} reguliert. So konnte für die EF-Hände von *Drosophila* Muskel- α -Aktinin keine Ca^{2+} -Bindung gezeigt werden (Dubreuil *et al.*, 1991). Währenddessen für das α -Aktinin aus *Dictyostelium* eine Regulation der α -Aktinin/Aktin-Interaktion durch Ca^{2+} nachgewiesen wurde (Witke *et al.*, 1993).

Für Muskel- α -Aktinine zeigten Fukami *et al.* (1992), dass die Bindung von PI-4,5-P_2 an die Aktin-Bindungsdomäne die Interaktion zum Aktin erhöht.

1.3 Titin und titinartige Proteine

Das riesige Protein Titin bildet neben Aktin und Myosin das dritte Filament-System im Muskel. Vertebraten Titine sind flexible Moleküle von über 1 μm Länge und 3 - 4 nm Breite, mit einer

molekularen Masse bis zu $\sim 4,2$ MDa (Bang *et al.*, 2001). Sie überspannen ein halbes Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. Titine sind die elastischen Komponenten der Muskeln und dienen während der Entwicklung als „molekulare Lineale“ der Sarkomerarchitektur (Young & Gautel, 2000).

In den Vertebraten Titinen befinden sich N-terminal zwei Immunglobulin (Ig)-Domänen, gefolgt von einer variierenden Anzahl Z-Repeats (je 45 AS) (Luther & Squire, 2002), auf die eine Vielzahl von Ig-artigen Domänen folgt, in die die PEVK-Region und unikale Sequenzen eingebettet sind. Dieser Teil befindet sich in der I-Bande und wird mit den elastischen Eigenschaften von Titin in Verbindung gebracht (Wilms, 2007). Im Bereich der A-Bande schließen sich konservierte, sogenannte Superrepeats an, die aus Ig- und Fibronektin-Typ-III-Domänen (Fn III) aufgebaut sind, diesen folgt am C-Terminus eine Kinase Region (Tskhovrebova & Trinick, 2003). Bang *et al.* (2001) beschreiben eine verkürzte Isoform (Novex-3), die in der I-Bande vorkommt. Ihr fehlen die PEVK- und die Kinase-Region ebenso wie die Ig/Fn III-Superrepeats. Novex-3 besitzt im Bereich der Z-Scheiben konservierte Ig Segmente, während C-terminal ein großer Bereich unikatler Sequenzen vorhanden ist. In der glatten Muskulatur wurde Smitin identifiziert, ein Protein, das einen dem Titin ähnlichen Aufbau aufweist (Kim & Keller, 2002).

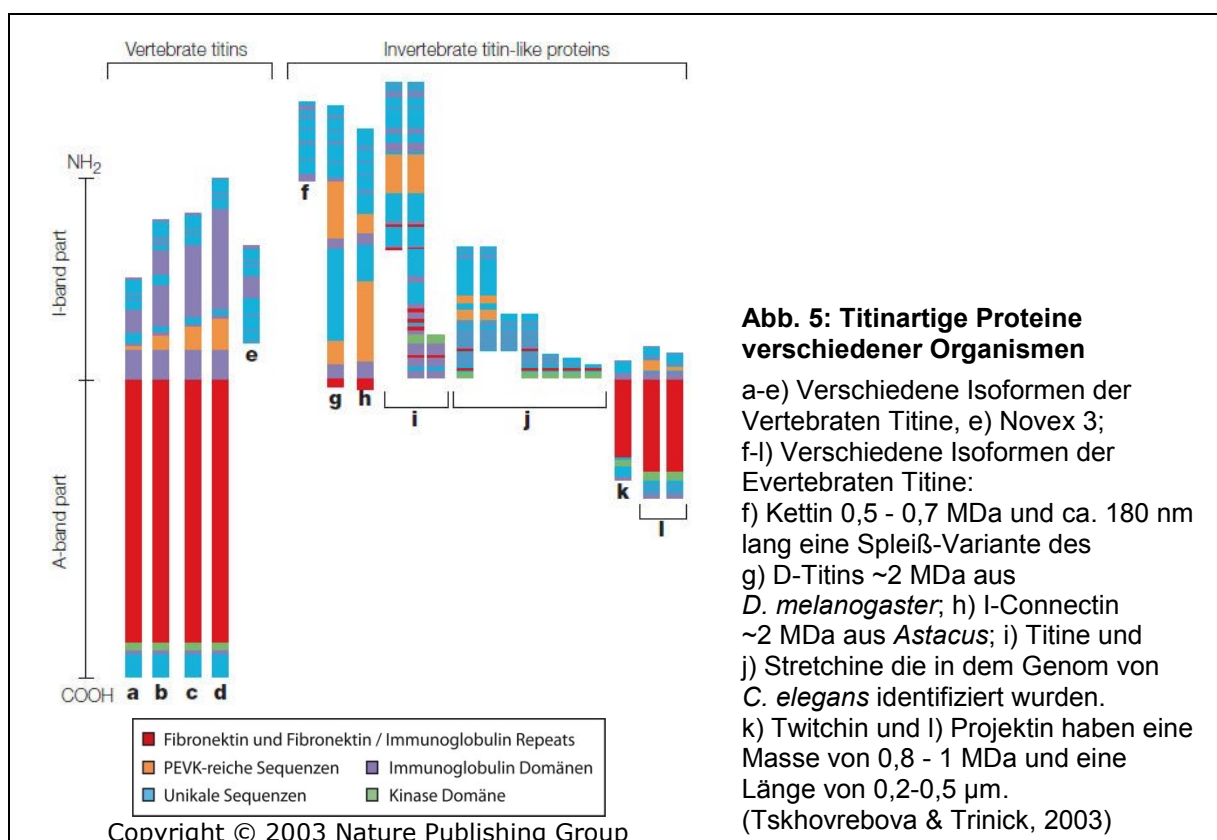
Bei den Evertrebraten sind, wie im Weiteren dargestellt, viele verschiedene Proteine als titinartig beschrieben, entweder weil sie hochmolekular sind und lange fädige Strukturen besitzen oder Sequenzähnlichkeiten mit den Vertebraten Titinen zeigen. Ein Grund für die größere Vielfalt in der Gruppe der titinartigen Proteine der Evertrebraten (Abb. 5) ist vermutlich die enorme Variationsbreite im Muskelaufbau, was sich unter anderem in der Spanne der Sarkomergrößen von $3,5 \mu\text{m}$ bis zu $13 \mu\text{m}$ (Bullard *et al.*, 2002) widerspiegelt.

Das größte der titinartigen Proteine von *D. melanogaster* ist mit 2065 kDa das D-Titin. Diese großen Isoformen sind auch bei anderen Evertrebraten zu finden. Sie stellen die elastischen Elemente des Muskels dar und überspannen die gesamte I-Bande (Tskhovrebova & Trinick, 2010).

Von dem D-Titin Gen (Sallimus) sind 13 alternative Spleiß-Varianten beschrieben, unter anderem das Kettin (550 kDa) (Machado & Andrew, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Kettin besitzt im Gegensatz zum D-Titin keine Fn III-Domänen und keine elastische PEVK Region. Es ist aus 35 Ig-artigen Domänen aufgebaut, die über kurze Zwischenstücke miteinander verbunden sind (Hakeda *et al.*, 2000; Kolmerer *et al.*, 2000). Entsprechende Proteine sind auch bei weiteren Evertrebraten beschrieben, z. B. bei *C. elegans* das Ce-Titin, das zwar dem D-Titin entsprechende Domänen aufweist, deren Anordnung aber von der im D-Titin abweicht. Ebenfalls findet sich eine dem Kettin entsprechende Variante (Bullard *et al.*, 2002).

Weitere hochmolekulare Proteine, die eine Masse von 800 kDa bis zu 1000 kDa haben, sind Projektin bei *D. melanogaster* bzw. Twitchin (Gen: *unc 22*) bei *C. elegans* (Benian *et al.*, 1993). Twitchin ist im Gegensatz zu den vorangegangenen Proteinen in der A-Bande lokalisiert und mit den Myosin-Filamenten assoziiert, währenddessen die Lokalisation von Projektin vom Muskeltyp abhängt. So ist das Projektin der Insekten in direkten Muskeln in der A-Bande nachgewiesen worden. In der indirekten Flugmuskulatur überspannt Projektin den Bereich von der Z-Scheibe über die kurze I-Bande bis in die A-Bande (Bullard *et al.*, 2006). Projektin und Twitchin sind aus sich wiederholenden Mustern von Ig-/Fn III-Domänen aufgebaut und besitzen C-terminal eine Kinase-Region. Einige Projektin-Isoformen weisen zusätzlich N-terminal eine PEVK-Region auf (Labeit & Kolmerer, 1995).

Eine weitere Gruppe von titinartigen Proteinen sind die Stretchine, von denen ebenfalls einige Spleiß-Varianten beschrieben sind. Die mit 926 kDa größte Isoform Stretchin-MLCK aus *D. melanogaster* besitzt zwei PEVK-Regionen, 32 Ig-Domänen und zwei Fn III-Domänen und darüber hinaus C-terminal eine Kinase-Region, die der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) entspricht (Champagne *et al.*, 2000). Einige Isoformen besitzen die Kinase nicht. In *C. elegans* befinden sich die Stretchine in der Mitte der A-Bande. Sie werden durch das Gen *unc 89* codiert, Mutanten dieses Gens zeigen einen gestörten Muskelaufbau und eine fehlende M-Linie (Ferrara *et al.*, 2005).



Über die titinartigen Proteine der Anneliden ist wenig bekannt. Aus der schräggestreiften Muskulatur des Anneliden *Neanthes sp.* wurden drei titinartige Proteine mit Molekularmassen von ~4000 kDa, 1200 kDa und 700 kDa beschrieben (Kawamura *et al.*, 1994). Die immunologische Untersuchungen von Kawamura *et al.* (1994) lieferten Hinweise darauf, dass das 4000 kDa Protein die Z-Elemente mit den dicken Filamenten verbindet. Bei dem titinartigen 1200 kDa Protein, das in der I-Bande nahe der Z-Elemente lokalisiert wurde, konnte eine PEVK-Region aber keine Fibronectin- und Kinase-Region nachgewiesen werden (Izawa *et al.*, 2005). Das dritte titinartige Protein wird mit 700 kDa, einer Länge von 170 nm und einer Breite von 4 nm beschrieben und soll in der A-Bande lokalisiert sein (Kawamura *et al.*, 1994).

Lange & D'Haese (1994) konnten aus Hautmuskelschläuchen von *L. terrestris* zwei hochmolekulare Proteine isolieren, ein ca. 1200 kDa großes und 300 nm langes als Mini-Titin bezeichnetes Protein und ein 2000 kDa großes über 1,6 µm langes als Connectin bezeichnetes Protein. Beide Proteine haben eine fädige Struktur. Antikörper gegen *Locusta* Projektin und gegen *C. elegans* Twitchin reagieren mit dem 1200 kDa großen Mini-Titin (Lange & D'Haese, 1994).

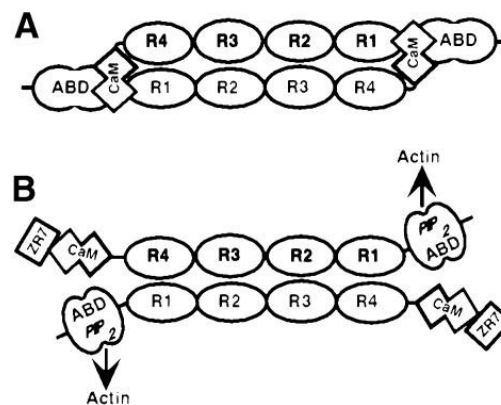
3.1.3 Die Interaktion von α -Aktinin und Titin bzw. titinartigen Proteinen

In den Z-Scheiben der Vertebraten Skelettmuskulatur interagiert α -Aktinin mit Titin. Eine Titin-Bindungsstelle des α -Aktinins liegt C-terminal im Bereich der calmodulinartigen Domäne (Atkinson *et al.*, 2001), eine weitere liegt im Bereich des zweiten und dritten Spektrin-Repeats (Abb. 3). Auch Smitin, das Titin der glatten Muskulatur, interagiert mit den genannten Bindungsstellen des α -Aktinins (Chi *et al.*, 2008).

Die mit dem α -Aktinin interagierenden N-terminalen Z-Repeats des Titins bestehen aus 45 Aminosäuren und sind 12 nm lang (Atkinson *et al.*, 2000). Die Anzahl dieser Z-Repeats hängt vom Muskeltyp ab, so weisen die Titine der Skelettmuskulatur zwei, vier oder sechs Z-Repeats auf, währenddessen im Titin des Herzmuskels sieben Z-Repeats beschrieben sind (Luther & Squire, 2002). Werden Titine exprimiert, die mehr als sieben Z-Repeats besitzen, geht die Struktur der Sarkomere verloren.

Im Gegensatz zu C-terminalen Fragmenten des α -Aktinins konnte eine Interaktion zwischen einem Z-Repeat und einem vollständigen α -Aktinin zunächst nicht gezeigt werden. Young & Gautel (2000) erklären das mit einem Phospholipid regulierten Pseudoligand Mechanismus.

Sie beschreiben ein 30 Aminosäuren langes Sequenzstück des α -Aktinins, das Z-Repeat homolog ist und zwischen der Aktin-Bindungsstelle und den Spektrin-Repeats in der Neck-Region liegt. In Abwesenheit von Phospholipiden bindet das dimerisierte α -Aktinin kein Titin, da die CaM-Domäne des einen α -Aktinin Monomers, die die Bindungsstelle für Titin enthält, mit dem Bereich der Neck-Region des zweiten α -Aktinin Monomers interagiert (Abb. 6 A). Bindet PIP_2 an die Aktin-Bindungsdomäne, hat das eine Konformationsänderung zur Folge, die Interaktion zwischen der Neck-Region und der Calmodulin-Domäne wird aufgehoben (Abb. 6 B), und somit ist die Bindungsstelle für das Z-Repeat des Titins frei (Young & Gautel, 2000).



Copyright © 2000 European Molecular Biology Organization

Abb. 6: Modell der Regulation der α-Aktinin/Titin-Z-Repeat Bindung durch Phospholipide

- A) Geschlossene, inaktive Form des α-Aktinins, die Calmodulin-Domäne (CaM) interagiert mit der Neck-Region der gegenüberliegenden Einheit des Dimers, zwischen der Aktin-Bindungsdomäne (ABD) und der ersten Spektrin-Domäne (R1). Dieses verhindert die Bindung des Titin-Z-Repeats (ZR 7) an das α-Aktinin. Weitere Spektrin-Domänen (R2, R3, R4).
- B) Offene, aktive Form des α-Aktinins, die Bindung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) an die ABD bewirkt eine Konformationsänderung, die dann die Interaktion des Titin-Z-Repeats (ZR 7) mit der Calmodulin-Domäne ermöglicht (Young & Gautel, 2000).

Über die Interaktion von α-Aktinin mit titinartigen Proteinen der Evertrebraten ist wenig bekannt. Van Straaten *et al.* (1999) beschreiben, dass das *D. melanogaster* Kettin aus der indirekten Flugmuskulatur 35 Ig-Domänen enthält, die jeweils mit einem Aktin interagieren. Dieses Kettin bindet an F-Aktin mit hoher Affinität ($K_d = 1,2 \text{ nM}$) und verdrängt Tropomyosin aus der Bindung zum F-Aktin im Bereich der Z-Scheiben. α-Aktinin und Kettin sollen gleichzeitig mit dem F-Aktin interagieren und das Kettin soll die antiparallele Anordnung der F-Aktin-Filamente fördern (Van Straaten *et al.*, 1999).

1.4 Das Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll α -Aktinin aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* isoliert werden. Eine Charakterisierung des α -Aktinins ist u. a. deshalb notwendig, um das α -Aktinin von Paramyosin zu unterscheiden, das ebenfalls eine molekulare Masse von ~100 kDa besitzt und das in erheblicher Menge in den Myosin-Filamenten der Evertibraten-Muskeln enthalten ist. Um in diesem Zusammenhang auch funktionelle Aussagen treffen zu können, wird versucht, die Sequenz von α -Aktinin aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* zu ermitteln. Da α -Aktinine überwiegend hochkonserviert sind, soll der Vergleich mit bekannten α -Aktinin-Sequenzen Hinweise liefern, welche der in der Einleitung beschriebenen Modifikationen und Interaktionen auch beim α -Aktinin von *L. terrestris* zu vermuten sind.

Um die Interaktion titinartiger Proteine mit dem α -Aktinin untersuchen zu können, werden titinartige Proteine aus dem Hautmuskelschlauch des *L. terrestris* isoliert. Da bei den Evertibraten die titinartigen Proteine eine heterogene Gruppe darstellen (s. Einleitung), ist es notwendig, die isolierten titinartigen Proteine zu charakterisieren. Hierzu werden als Unterscheidungsmerkmale die molekularen Massen und Längen herangezogen.

α -Aktinin aus der Vertebraten Skelettmuskulatur ist ein erwiesener Bestandteil der Z-Scheiben und auch bei Anneliden zumindest immunhistologisch in den Z-Stäben der schräggestreiften Muskulatur beschrieben worden (Royuela *et al.*, 1999). Vertebraten Titin wird durch α -Aktinin in der Z-Scheibe verankert (s. Einleitung). In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob eines, und ggf. welches, der titinartigen Proteine mit dem α -Aktinin interagiert bzw. in den Z-Stäben der schräggestreiften Muskulatur von *L. terrestris* verankert ist.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierungen verschiedener Muskel-Proteine

2.1.1 Präparation der Hautmuskelschläuche

Die zur Präparation verwendeten Tiere der Art *Lumbricus terrestris*, wurden im Angelbedarf als 'Tauwürmer' gekauft. Auf Eis gekühlte, adulte Tiere wurden der Länge nach aufgeschnitten und innere Organe sowie Bindegewebe mithilfe eines Spatels entfernt. Die so präparierten Hautmuskelschläuche wurden in α -A-Waschpuffer (s. u.) gewaschen und das Nassgewicht bestimmt.

Soweit nichts anderes angegeben ist, wurden alle Zentrifugationsschritte der Präparationen in einer Kühlzentrifuge (Modell Avanti J 25 mit JA-Rotoren) oder in einer Ultrazentrifuge (Modell L7-65 mit Ti Rotoren) bei 4 °C durchgeführt (beide: Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA).

2.1.2 Herstellung von Homogenaten

Zur Herstellung von Homogenaten wurde das jeweilige Gewebe entweder direkt oder nachdem es in Stickstoff eingefroren und pulverisiert wurde in 10 ml Waschpuffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) aufgenommen. Die Ansätze wurden homogenisiert (Glas-Teflon-Homogenisator) und dann zentrifugiert (Ti 70er, 40.000 rpm, 40 min). Die Pellets wurden in SDS-Inkubationsmedium (1x; Kap.2.2.1) mindestens 10 min gerührt, zentrifugiert (Ti 70, 40.000 rpm, 20 min), und der Überstand als SDS-Probe verwendet.

2.1.3 Isolierung von α -Aktinin aus Hautmuskelschläuchen

Zur Isolierung von α -Aktinin wurde eine modifizierte Methode von Feramisco & Burridge (1980) verwendet.

Die präparierten Hautmuskelschläuche wurden in fünffachem Volumen α -A-Waschlösung homogenisiert (IKA Turrax®; 20.000 U/min, 1 min, anschl. Glas-Teflon-Homogenisator, 200 ml Volumen, 1000 U/min, 2 min). Der Überstand der Zentrifugation (JA14, 22.000 **g**, 30 min) enthielt bereits einen Teil des α -Aktinins.

Die Extraktion des α -Aktinins aus dem Pellet wurde bei Raumtemperatur mit dem sechsfachen Volumen des α -A-Extraktionspuffers durchgeführt (30 min). Der Überstand der Zentrifugation (JA14, 22.000 **g**, 30 min) wurde dann bei Raumtemperatur mit verdünnter Essigsäure sehr

langsam auf pH 7,0 bis 7,2 eingestellt. Ein Übertitrieren in den sauren Bereich musste vermieden werden, da sonst α -Aktinin irreversibel ausgefällt worden wäre. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 M MgCl_2 -Lösung auf eine Endkonzentration von 8 mM MgCl_2 gebracht. Nach 15 min wurde der entstandene wolkig weiße Niederschlag abzentrifugiert (JA14, 20.000 **g**, 30 min).

Das α -Aktinin wurde sowohl aus dem Überstand des Waschschriffs, als auch aus dem Überstand nach der MgCl_2 -Fällung, mit Ammoniumsulfat 38%iger Sättigung (20,5 g Ammoniumsulfat pro 100 ml) bei 4 °C gefällt und abzentrifugiert (22.000 **g**, 1 h).

Das Pellet der Zentrifugation wurde in möglichst wenig α -A-Dialysepuffer (Kap. 2.1.4) aufgenommen, über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert und anschließend gegebenenfalls zentrifugiert, um eine klare Lösung säulenchromatographisch aufzutrennen.

α-A-Waschlösung			α-A-Extraktionspuffer		
	0,5 mM	PMSF		0,5 mM	PMSF
oder	1 mM	Pefabloc SC®	oder	1 mM	Pefabloc SC®
	3 mM	Tris/HCl pH 7,0		1 mM	EGTA
				3 mM	Tris pH 9,0 (bei RT)

Um sicher zu stellen, dass in der beschriebenen α -Aktinin Präparation ausreichend Proteasehemmer vorhanden waren, um einen erheblichen proteolytischen Abbau zu verhindern, wurden zwei Ansätze parallel mit je drei Hautmuskelschläuchen aufgearbeitet. In dem ersten Ansatz wurde wie oben beschrieben verfahren. In dem zweiten Ansatz wurden der α -A-Waschlösung und dem α -A-Extraktionspuffer zusätzlich noch der Protease-Inhibitor-Cocktail (cOmplete, Prod. Nr.: 11697498001, Roche, Basel, Schweiz) zugefügt, der insbesondere Serin- und Cystein-Proteasen hemmt.

2.1.4 Reinigung von α -Aktinin durch Säulenchromatografie

Für alle Säulenläufe und deren Aufzeichnung wurden eine FPLC Anlage (Pharmacia/GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) verwendet, die durch einen Analog-Digital-Wandler und die Software Beckman Gold (Beckman Coulter, Brea/Kalifornien, USA) ergänzt wurde.

2.1.4.1 Ionenaustauscher-Chromatografie MacroPräp HQ

Die Reinigung des α -Aktinins erfolgte durch Anionenaustauscher Chromatographie, wobei abweichend von der originalen Präparationsvorschrift (Feramisco & Burridge, 1980) der stärkere Anionenaustauscher MacroPräp HQ (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) verwendet wurde, um eine bessere Trennung zu erreichen.

Die Säule (2,6 cm x 10 cm) wurde vorher mit mindestens acht Säulenvolumen des α -A-Säulenpuffers A (s. u.) equilibriert. Das Auftragen der Proteine erfolgte mit 0,6 ml/min und einer anschließenden Flussrate von 1 ml/min. Die Elution erfolgte nach folgendem Programm: mindestens zwei Säulenvolumen α -A-Säulenpuffer A, ein Säulenvolumen α -A-Säulenpuffer A mit 120 mM NaCl und dem Gradienten mit dem achtfachen Säulenvolumen aus α -A-Säulenpuffer A und α -A-Säulenpuffer B mit 120 mM NaCl bis 500 mM NaCl. In einigen Präparationen wurde ein flacherer Gradient von 120 mM bis 300 mM NaCl über zehn Säulenvolumen verwendet.

2.1.4.2 Ionenaustauscher-Chromatografie Mono Q

Zur weiteren Reinigung wurden die konzentrierten und entsalzten Proteine (Kap. 2.2.1) mit dem starken Anionenaustauscher Mono Q (Pharmacia/GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) mit einem Säulenvolumen von 1,7 ml aufgetrennt. Das Auftragen erfolgte mit 0,5 ml/min und die weitere Flussrate betrug 1 ml/min. Es wurde mit sechs Säulenvolumen α -A-Säulenpuffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 20 mM bis 600 mM über 100 Säulenvolumen.

α-A-Dialysepuffer / α-A-Säulenpuffer A			α-A-Säulenpuffer B		
20	mM	NaCl	1	M	NaCl
0,1	mM	EDTA	0,1	mM	EDTA
0,2	mM	DTT	0,2	mM	DTT
20	mM	Tris/Acetat pH 7,6	20	mM	Tris/Acetat pH 7,6

2.1.4.3 Gelfiltration

Mit einer Sephacryl S 400 HR Gelfiltrationssäule, die ein Volumen von 130 ml hatte (1,6 cm x 65 cm), sollte die native Größe der Proteine ermittelt werden. Der Trennbereich der Säule lag im Bereich von 20 kDa bis 8000 kDa (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien). Um eine möglichst gute Trennung zu erreichen, wurden die Proben vor dem Auftragen auf die Säule konzentriert (Kap. 2.2.1), sodass ein Probenvolumen von 800 µl nicht überschritten wurde. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min und die Elution erfolgte mit 150 ml α -A-GF-Puffer.

α -A-GF-Puffer

200	mM	NaCl
0,1	mM	EDTA
0,2	mM	DTT
20	mM	Tris/Acetat pH 7,6

2.1.5 Isolierung von Mini-Titin aus Hautmuskelschläuchen

4 - 14 Hautmuskelschläuche wurden in eisgekühlter MT-Waschlösung (s. u.) gereinigt (Nassgewicht von 6 g bis 21 g) und dann im MT-Waschpuffer (s. u.) homogenisiert (IKA Turrax®: 20.000 rpm, 1 min; anschl. Glas/Teflon Homogenisator: 1000 U/min, 3 min). Das Homogenat wurde dreimal mit je ca. 150 ml MT-Waschpuffer gewaschen und abzentrifugiert (JA 14, 22000 **g**, je 10 min).

Die Extraktion des Mini-Titins erfolgte durch 22 mM Natriumpyrophosphat (Ziegler *et al.*, 1990). Hierzu wurde das Pellet des letzten Waschschrilles in fünf- bis zehnfachem Volumen im MT-Extraktionspuffer aufgenommen, 30 Minuten gerührt und abzentrifugiert (JA 14, 22000 **g**, 1 h).

Entweder wurde der Extrakt zur Reinigung zunächst durch Glaswolle gegossen und dann direkt auf die Säule DE52 (Whatman®/Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; 1,4 cm x 48 cm) aufgetragen, oder mit AMS 38%iger Sättigung gefällt. Nach einer Zentrifugation (JA20, 22000 **g**, 30 min) wurde das AMS-Pellet in MT-Säulenpuffer A aufgenommen und dagegen dialysiert, klar zentrifugiert und dann mit einer MacroPräp HQ Säule (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA; 2,6 cm x 5,5 cm) aufgetrennt.

Nach dem Auftragen des Extraktes wurde mit zwei Säulenvolumen MT-Säulenpuffer A nachgespült. Es schloss sich ein NaCl-Gradient aus MT-Säulenpuffer A und B über ca. fünffaches Säulenvolumen an (Flussrate 30 - 60 ml/h).

MT-Waschlösung			MT-Waschpuffer		
20	mM	KCl	30	mM	KCl
0,5	mM	MgCl ₂	2	mM	MgCl ₂
10	mM	Imidazol/HCl pH 6,4	10	mM	Tris/ H ₃ PO ₄ pH 6,8
Alle pH-Angaben gelten für 4 °C.			0,5	%	Triton X-100 (v/v)
MT-Extraktionspuffer			1	mM	NaN ₃
1	mM	CaCl ₂	5	mM	EGTA
22	mM	Na ₄ P ₂ O ₇	1	mM	2-Mercaptoethanol
10	mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 8,3	MT-Säulenpuffer A		
1	mM	2-Mercaptoethanol	10	mM	Na ₄ P ₂ O ₇
0,1	µg/ml	Pepstatin	10	mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 8,3
MT-Säulenpuffer B DE52			MT-Säulenpuffer B MacroPräp		
10	mM	Na ₄ P ₂ O ₇	10	mM	Na ₄ P ₂ O ₇
10	mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 8,3	10	mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 8,3
500	mM	NaCl	1	M	NaCl

2.1.6 Isolierung von Titin aus Hautmuskelschläuchen

Diese Isolierung wurde im Anschluss an die Mini-Titin-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde das Pellet des Mini-Titin-Extraktionsschritts im T-Extraktionspuffer (s. u.) aufgenommen, über eine Stunde gerührt und abzentrifugiert (JA 20, 17000 **g**, 30 Minuten). Der Überstand wurde über Nacht entweder gegen T-Dialysepuffer A (s. u.) oder gegen T-Dialysepuffer B (s. u.) dialysiert.

Der Dialyse-Ansatz A wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (JA 20, 48000 **g**, 30 min). Der Überstand wurde zur Reinigung durch Glaswolle gegossen und dann mit dem Anionenaustauscher DE52 (Whatman/ GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien; 2,8 cm x 7,5 cm) aufgetrennt. Nach dem Auftragen des Extraktes wurde mit zwei Säulenvolumen des T-Säulenpuffers A (s. u.) nachgespült und dann ein Phosphat-Gradient mit dem T-Säulenpuffer B (s. u.) angeschlossen (Flussrate von 20 ml/h). Das Titin erschien im Durchfluss und war noch verunreinigt. Ein großer Teil der weiteren Proteine des Extraktes banden an die Säule, diese wurden mit dem Gradienten eluiert.

Der Ansatz mit dem harnstofffreien T-Dialysepuffer B wurde mit 1 M MgCl₂ auf eine Endkonzentration von 10 mM gebracht und 15 Minuten bei RT gerührt. Hierbei fiel verunreinigendes Aktomyosin aus, das abzentrifugiert wurde (Ti 45, 10.000 rpm, 30 min).

Große Mengen Titin ließen sich nicht gut über die Säulen reinigen, da sie die Säulen verstopften, deshalb wurden die weiteren Schritte im Batch durchgeführt. Der Überstand der MgCl₂-Fällung wurde mit 10 mM Tris/H₃PO₄ pH 7,8 equilibriertem DE52 Material (15 ml)

versetzt, 30 min gerührt und dann zentrifugiert (Ti 45, 10000 rpm, 30 min). Der Überstand war mit hochmolekularem Titin angereichert.

T-Extraktionspuffer

1 mM	MgCl ₂
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
3 M	Harnstoff
1 mM	2-Mercaptoethanol
10 mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 7,8

Die pH-Werte gelten bei 4 °C.

T-Dialysepuffer A

1 mM	MgCl ₂
2 M	Harnstoff
1 mM	2-Mercaptoethanol
10 mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 7,8

T-Dialysepuffer B

10 mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 7,8
-------	--

T-Säulenpuffer A

2 M	Harnstoff
10 mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 7,8

T-Säulenpuffer B

2 M	Harnstoff
200 mM	NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ pH 7,8

2.2 Methoden der Proteinanalyse

2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch nach Bradford (1976) bestimmt, unter Verwendung des Farbreagens Protein Assay Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA). Als Standard diente eine Rinderserumalbumin-Lösung bekannter Konzentration (0,5 mg/ml). Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Da diese Methode nur in einem Bereich bis 1 OD genaue Werte liefert, wurden die Proben bei höheren optischen Dichten verdünnt.

2.2.2 Konzentrieren und Entsalzen

Die Proben wurden entweder durch eine Fällung mit Ammoniumsulfat bei 40 % Sättigung oder durch Zentrifugation in Ultrafiltrationseinheiten Vivaspın® (Santorius, Göttingen, Deutschland) mit einem Ausschluss von 100 kDa konzentriert.

Das Entsalzen der Proben erfolgte durch Dialyse gegen einen entsprechenden salzfreien Puffer. Hierzu wurde der Dialyseschlauch Spectra/Por mit einem Ausschluss von 6 - 8 kDa (Spectrum Laborieties, Los Angeles, Kalifornien, USA) verwendet.

Alternativ wurde mithilfe fertig gepackter NAP™ Säulen (Sephadex GM25, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) nach Anleitung entsalzt.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

2.2.3.1 Probenvorbereitung

Zu 300 µl verdünnter Proteinprobe wurden 30 µl des 11fach konzentrierten SDS-Inkubationsmediums (Laemmli, 1970) hinzugefügt. Diese Mischung wurde für 3 Minuten bei 95 °C inkubiert. In den Proben, die hochmolekulares Titin enthielten, wurde die SDS-Konzentration auf 4 % erhöht (mdl. Mitteilung Fürst), da das eine bessere Auftrennung der hochmolekularen Proteine ermöglichte. Anschließend wurden 70 µl Markerlösung hinzugefügt, die Proben auf Eis abgeschreckt und bis zur Auftrennung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.2 Mini-SDS-PAGE

Mini-Gele mit 10%iger Acrylamid Konzentration wurden zur Darstellung des α -Aktinins genutzt. Hiermit wurde eine gute Trennung im Bereich von 40 kDa bis 200 kDa erreicht. Zur Fokussierung der Banden wurde das 10%ige Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. Teilweise wurde die Acrylamid-Konzentration auf 8 % herabgesetzt. Das Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis beider Lösungen betrug 37,5:1.

Zur Darstellung der hochmolekularen Proteine wurden 5%ige Trenngele mit 4%igen Sammelgelen, die dann 0,2 % SDS enthielten, oder große Gradienten-Gele verwendet.

Die kleinen vertikalen Plattengele hatten Maße von 72 x 72 x 0,75 mm (Gießstand: Dual Gel Caster, Hoefer/GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien). Die Auftrennung erfolgte in einer 2050 Midget Electrophoresis Unit (LKB/GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) mit 23 mA pro Gel unter Verwendung der angegebenen Elektrodenpuffer.

SDS-Inkubationsmedium (11 fache Konz.)			Markerlösung		
11	%	SDS	5 Teile		Glycerin
110	mM	Tris	+ 1 Teil	0,1%	Bromphenolblau-Lösung
11	mM	EDTA			
55	%	2-Mercaptoethanol			
10%iges Trenngel			4%iges Sammelgel		
10	%	Acrylamid	4	%	Acrylamid
0,1	%	Bisacrylamid	0,14	%	Bisacrylamid
0,1	%	SDS	0,1	%	SDS
0,38	M	Tris/HCl pH 8,8	0,125	M	Tris/HCl pH 6,8
Starten der Polymerisation mit:			Starten der Polymerisation mit:		
0,08	%	APS	0,2	%	APS
0,1	%	TEMED	0,1	%	TEMED
5%iges Trenngel			Elektodenpuffer		
5	%	Acrylamid	0,1	%	SDS
0,1	%	Bisacrylamid	192	mM	Glycin
0,2	%	SDS	25	mM	Tris
0,38	M	Tris/HCl pH 8,8			
Starten der Polymerisation mit:			Der pH-Wert ergibt sich auf 8,3 - 8,9		
0,08	%	APS			
0,1	%	TEMED			

Die Färbung der Gele erfolgte mit einer Fertiglösung entweder nach dreimaligem Waschen mit Wasser (10 min) (Fermentas/Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) oder nach 30 min Inkubation in Fixierlösung (Roti®-Blue Roth, Karlsruhe, Deutschland). Ein Entfärben wurde durch 10%ige Essigsäure erreicht.

2.2.3.3 Gradienten-SDS-PAGE

Zur besseren Darstellung der hochmolekularen Proteine wurden Gele mit einem Gradienten von 2 - 10 % (w/v) Polyacrylamid verwendet. Die Gele wurden als vertikale Plattengele mit den Maßen 145 x 180 x 1 mm gegossen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht mit 20 mA je Gel in einer Elektrophorese-Apparatur (Eigenbau), die mit 3 Litern Elektrodenpuffer gefüllt war. Die benötigte Zeit pro Lauf betrug ca. 18 - 20 Stunden, über die gesamte Zeit wurde die Apparatur auf 4 °C gekühlt.

Der Gradient wurde mit einem Zweikammer-Gradienten-Mischer aus der 10%igen und der 2%igen Acrylamid-Lösung erstellt. Das Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis beider Lösungen betrug 50:1.

10%ige Acrylamid-Lösung			2%ige Acrylamid-Lösung		
10	%	Acrylamid	2	%	Acrylamid
0,2	%	Bisacrylamid	0,04	%	Bisacrylamid
0,2	%	SDS	0,2	%	SDS
0,38	M	Tris/HCl pH 8,8	0,38	M	Tris/HCl pH 8,8
16	%	Glycerin (v/v)	Starten der Polymerisation mit:		
Starten der Polymerisation mit:			0,08	%	APS
0,025	%	APS	0,1	%	TEMED
0,06	%	TEMED			

2.2.4 Western Blot und Antikörper-Reaktion

Die in SDS-Acrylamid-Gelelen aufgetrennten Proteine wurden mit einem diskontinuierlichen Semidry-Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm, Whatman/ GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) aufgebracht. Der diskontinuierliche Semidry-Transfer benötigt drei verschiedene Puffer (s. u.: Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer) (Tovey & Baldo, 1987). Er erfolgte über 3 Stunden mit 200 mA. Zur Dokumentation wurde die Membran mit Ponceau S Lösung (1:100) angefärbt, fotografiert und anschließend mit Wasser entfärbt.

Unspezifische Bindungsstellen der Nitrocellulose wurden blockiert, indem die Nitrocellulose-Membran entweder über Nacht in Abdecklösung (s. u.) bei 4 °C oder für 4 Stunden bei RT inkubiert wurde. Die Membran wurde dann für weitere 4 Stunden mit dem jeweiligen Erstantikörper in PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) mit 1 M NaCl (s. u.) behandelt, anschließend dreimal 10 min mit PBS gewaschen und dann 2,5 Stunden mit dem an alkalische Phosphatase gekoppelten Zweitantikörper in PBS/1 M NaCl inkubiert. Es folgten weitere 3 Waschschrte mit je 10 min mit PBS und 3 mit AP-Puffer (s. u.). Zum Färben wurde

NBT/BICP-Lösung (Roche, Basel, Schweiz) verwendet, bis eine positive Reaktion sichtbar wurde. Die Membranen wurden mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Anodenpuffer I:			Abdecklösung:		
300	mM	Tris	1	M	NaCl
20	%	Methanol	27	mM	KCl
Anodenpuffer II:			80	mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
25	mM	Tris	15	mM	KH ₂ PO ₄
20	%	Methanol	0,3	%	Tween 20
Kathodenpuffer:			AK-Waschlösung:		
40	mM	6-Aminohexansäure	wie die Abdecklösung + 0,05 % Tween 20		
20	%	Methanol	PBS		
0,01	%	SDS	137	mM	NaCl
			2,7	mM	KCl
			10	mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
			2	mM	KH ₂ PO ₄
			ggf. + 1 M NaCl		
			AP-Puffer		
			100	mM	NaCl
			50	mM	MgCl ₂
			100	mM	Tris/HCl pH 9,5

Zur Herstellung des polyklonalen Anti- α -Aktinin-LT-Antikörpers (Davids Biotechnologie, Regensburg, Deutschland) ist ein Kaninchen viermal mit dem isolierten α -Aktinin immunisiert worden. Es wurde das Serum ohne weitere Reinigung verwendet.

Die Antikörper gegen α -Aktinin vom *Dictyostelium discoideum*: 47-18-9 (D1), 47-62-17 (D2) und 47-60-8 (D3) (Schleicher *et al.*, 1988), gegen die Hautmuskelschlauch Z-Stäbe in *C. elegans*: KT9 und KT10 (Takeda *et al.*, 2008) und der Titin-Antikörper 9 D10 (Greaser) sind über die Developmental Studies Hybridoma Bank der Universität Iowa bezogen worden. Der Twitchin- und die Projektin-Antikörper wurden von Prof. Beinbrecht und die weiteren Titin-Antikörper T41, T42 und T44 wurden von Prof. Fürst dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Antikörper werden in der Tabelle 1 mit den eingesetzten Konzentrationen angegeben.

Erstantikörper	aus	Verdünnung
polyklonal Anti- α -Aktinin-LT (<i>L. terrestris</i>)	Serum Kaninchen	1:10000- 1:100000
monoklonal gegen <i>D. discoideum</i> - α -Aktinin: 47-18-9 (D1) 47-62-17 (D2) 47-60-8 (D3) gegen Hautmuskelschlauch Z-Stäbe: KT10 (<i>C. elegans</i>) KT9 (<i>C. elegans</i>)	Maus Maus Maus Maus Maus	jeweils 1:2000
polyklonal 562 gegen Twitchin (<i>C. elegans</i>) 528 gegen Projektin (<i>L. migratoria</i>) 529 gegen Projektin (<i>L. migratoria</i>)	Serum Kaninchen affinitätsgereinigt Kaninchen	1:2500 1:5000 1:5000
monoklonal Anti-Vertebraten-Titin im Bereich der M-Bande T41 T42 T44 Im Bereich der PEVK-Region 9D10 gegen Titin (<i>Bovinae</i>)	Kaninchen Kaninchen Kaninchen Maus	1:5000 1:5000 1:5000 1:2000
Zweitantikörper		
Anti-Rabbit-IgG alkalische Phosphatase gekoppelt (Dianova, Hamburg, Deutschland)	Ziege	1:5000
Anti-Maus-IgG alkalische Phosphatase gekoppelt (Dianova, Hamburg, Deutschland)	Ziege	1:2500

Tabelle 1: Für die Immunreaktionen verwendete Antikörper

2.2.5 Isoelektrische Fokussierung

Zur Vorbereitung der Proben wurden 100 μ g bis 150 μ g α -Aktinin mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 10 %) gefällt (30 min, auf Eis). Die Suspension wurde zentrifugiert (13000 g / 4 °C/ 30 min) und das Pellet zweimal mit -20 °C kaltem Aceton gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 340 μ l Probenpuffer aufgenommen, mit 24 μ l Servalyt™ 4 - 7 (Serva, Heidelberg, Deutschland) und Dithiothreitol (DTT mit 5 mg/ 364 μ l) versetzt (1h/ RT).

Der Fokussierungsstreifen (Immobiline™ DryStrip pH 4 - 7, 18 cm, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) wurde dann in der gelösten Probe über 10 - 20 Stunden rehydratisiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde der Streifen nach einer Stunde mit Mineralöl überschichtet.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer Multiphor II (LKB/ GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien). Der Lauf wurde mit einer Spannung von 500 V für 6 Stunden gestartet und über 1,5 Stunden in 100 V Schritten auf 2000 V gesteigert. Anschließend wurde die Spannung von 2000 V über Nacht (16 Stunden) beibehalten.

Um die Proteine in der zweiten Dimension nach der Größe auftrennen zu können, wurde der Fokussierungs-Streifen zweimal für 15 min in 5 ml SDS-haltigem Equilibrierungspuffer inkubiert, wobei der erste DTT enthielt, und der zweite Indol-3-essigsäure (IAA).

Der Streifen wurde auf ein 10%iges, 1,5 mm dickes SDS-Trenngel aufgelegt und mit Agarose fixiert. Die Auftrennung erfolgt wie in der SDS-PAGE.

Probenpuffer			Equilibrierungspuffer		
7	M	Harnstoff	50	mM	Tris/HCl pH 8,8
2	M	Thioharnstoff	6	M	Harnstoff
0,5	%	CHAPS	30	%	Glycerin
0,5	%	Amidosulfobetain 14	2	%	SDS
0,002	%	Bromphenolblau	0,002	%	Bromphenolblau
Jeweils frisch zugeben:			Jeweils frisch zugeben:		
0,2	%	Ampholyte pH 4-7 (40 %)	A)	+ 10 mg/ml DTT oder	
5 mg/	350 µl	DTT	B)	+ 25 mg/ml IAA	

2.2.6 Abschätzung der Molmassen hochmolekularer Proteine

Es wurde ein halblogarithmischer Zusammenhang zwischen der relativen Mobilität der Proteine in SDS-Gelen und der molaren Masse angenommen. Da die angenommene Linearität lediglich eine Annäherung liefern konnte, sind die Standards nur in dem Bereich oberhalb des Myosins gewählt worden, um diese Annäherung möglichst genau zu gestalten.

Als Standard wurden die in der Tabelle 2 angegebenen Proteine verwandt. Die jeweiligen molekularen Massen wurden aus den Sequenzen abgeleitet (UniProt). Von dem Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) Titin war nur die Sequenz eines Fragments (G1U9S3_RABIT) bekannt, das bereits eine Masse von 3,45 MDa besitzt und zu 90 % identisch mit humanem Titin Q8WZ42 (TITIN_HUMAN) ist. Da dieses, wie auch weitere Vertebraten Titine, eine molekulare Masse von 3,8 MDa besitzt, wurde dieser Wert hier als Standard verwendet.

Protein	Molekulare Masse [kDa]	Quelle:
Titin <i>Homo sapiens</i> Skelettmuskel	3800	(G1U9S3_RABIT) Q8WZ42 (TITIN_HUMAN)
Projektin <i>Procambarus clarkii</i> Scherenmuskel	963	Q86GD6 (Q86GD6_PROCL)
Nebulin <i>Oryctolagus cuniculus</i> Skelettmuskel	800	(Hu <i>et al.</i> , 1989) G1TDU6 (G1TDU6_RABIT)
Filamin <i>Oryctolagus cuniculus</i> Skelettmuskel	280	B7NZIP9 (B7NZIP9_RABIT)
Myosin	205	Standard Mixtur (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Tabelle 2: Standards der Molmassenbestimmung titinartiger Proteine

Zur Abschätzung wurden die Homogenate oder Extrakte aus dem Kaninchen-Skelettmuskel, dem Scherenmuskel von *Astacus*, der Flug- und Bein-Muskulatur von *Locusta migratoria*, dem Gänse-Herzmuskel und aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* gewonnen und in 2 - 10%igen Gradienten-SDS-PAGE aufgetrennt. Sofern genügend Standards auf einem Gel vorhanden waren, wurden die Molekularmassen der titinartigen Proteine von *L. terrestris* durch Extrapolation innerhalb dieser Datenreihe ermittelt. Da einige Gele nicht alle Standards enthielten, erfolgte die Extrapolation über die relativen Mobilitäten der Standards, die aus sechs Gelen ermittelt wurden. Diese beziehen sich jeweils auf die Mobilität des Myosins, der ein Wert von 100 % zugeordnet wurde.

2.2.7 MS-Analyse

Der tryptische Verdau und die ESI-MS/MS-Analysen wurden von Frau Dr. Dyballa im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) durchgeführt.

Die jeweiligen Banden der aufgetrennten Proteine wurden aus SDS-Gelelektrophoren ausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden mit 25 mM NH_4HCO_3 / 50 % Acetonitril gewaschen, mit 100 % Acetonitril entwässert, dann in einem Volumenanteil Trypsin Lösung (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Promega V511A, Madison, Wisconsin, Sigma Proteomics Grade T6567, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) rehydratisiert und 12 - 16 h bei 37 °C inkubiert.

Die nach dem Verdau vorhandenen Peptide wurden in mehreren Schritten aus den Gelstücken eluiert, entsalzt, mit Ameisensäure protoniert und dann in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt.

Die Analyse der Peptide erfolgte mit dem ESI-QqTOF, Q-Star XL (Applied Biosystem/ AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) und mit den Programmen Analyst, GPMaw (Lighthouse data, Blackburn VIC Australia) und Mascot (Matrix Science, London, Großbritannien).

2.2.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

2.2.8.1 Negativ Kontrastierungsmethode

Auf Formvar befilmte und mit Kohle bedampfte 400 Mesh Kupfer-Netzchen wurde ein 10 µl Tropfen einer steril filtrierten α -Aktinin-Lösung gegeben und nach wenigen Sekunden wieder abgesaugt. Die Netzchen wurden dann mehrfach (4 - 10-mal) mit 1%iger wässriger Uranylacetat-Lösung gewaschen. Der letzte Tropfen wurde nicht vollständig abgenommen, da das Uranylacetat zur Kontrastierung dient (Huxley, 1963). Die Präparate wurden mit einem Elektronenmikroskop (A 902 Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht.

2.2.8.2 Rotationsbedampfung

Lösungen mit Proteinkonzentrationen von 5 - 10 µg/ml, die 50 % (v/v) Glycerin enthielten, wurden mit einer Eigenbauapparatur als feiner Nebel auf frisch gebrochenen Glimmer aufgesprüht. Der Glimmer wurde mit doppelseitigem Klebeband auf die Fixierschraube des Rotors der Eppendorf Zentrifuge 5415 geklebt und dann ca. 15 Sekunden mit 13000 rpm zur Rotation gebracht (Nave *et al.*, 1989). Hierbei wurden die fädigen Proteine gestreckt, was ein späteres Ausmessen vereinfachte. Im Vakuum der Bedampfungsanlage (BAE 301, Balzer, Zürich, Schweiz) wurden die aufgesprühten Proben getrocknet und anschließend in einem Winkel zwischen 6° - 10° mit Kohle/Platin und Kohle rotationsbedampft. Die Kohle/Platin-Schicht wurde mit einem Schwingquarz gemessen. In einem Bereich von 36 - 41 Hz war eine angemessene Schichtdicke erreicht, dies entsprach ca. 7 nm. Der stabilisierende Kohlefilm wurde dann ca. 10 Sekunden bei 2400 Volt ($\cong$ 25 nm) aufgedampft.

Die Kohle/Platin-Replik wurde in Wasser ab flotiert und auf Kupfer-Netzchen (200-Mesh) aufgenommen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden am Elektronenmikroskop Philips 300 durchgeführt.

2.2.9 Längenbestimmung der hochmolekularen Proteine

Die Primärvergrößerung des Elektronenmikroskops war mithilfe eines Waffelgrids bestimmt worden. Die erhaltenen Negative wurden sekundär mit einem Diaprojektor vergrößert. Das Ausmessen der Bilder erfolgte mit dem Electronic Graphics Calculator (Numonics Cooperation, Montgomeryville, Pennsylvania).

2.3 Nachweis von Protein-Interaktionen

2.3.1 Kosedimentation

Für die Kosedimentationen wurde α -Aktinin aus Hautmuskelschläuchen von *L. terrestris* verwendet, das aus dem Wasch-Überstand, aus dem Extrakt-Überstand oder aus Gemischen hiervon gewonnen wurde. Die Endkonzentration des α -Aktinin variierte zwischen 0,125 μM und 2,5 μM .

Aktin wurde aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens präpariert (Spudich & Watt, 1971) und stand im Institut zur Verfügung. Es wurde mit Endkonzentrationen von 3 μM bis 12 μM eingesetzt. Jede Probe wurde in EM-Dialysepuffer (verändert nach Taylor & Taylor, 1994) angesetzt, das Probenvolumen variiert zwischen 50 μl und 100 μl . Durch Zugabe von Polymerisationspuffer (Meyer & Aebi, 1990) wurde Aktin in Anwesenheit von α -Aktinin bei RT für mindestens eine Stunde, teilweise über Nacht, polymerisiert.

EM-Dialysepuffer			5 x Polymerisationspuffer		
10	mM	Imidazol pH 7,0	12,5	mM	Imidazol pH 7,5
10	mM	KCl	500	mM	KCl
2	mM	MgCl ₂	10	mM	MgCl ₂
0,02	%	2-Mercaptoethanol	1	mM	ATP

Es wurde der Einfluss von Calcium auf die Interaktion getestet, indem die Ansätze entweder 2 mM Ca²⁺ enthielten oder 5 mM EGTA. Darüber hinaus wurde der Einfluss des Phospholipids Phosphatidylserin (25 $\mu\text{g/ml}$) getestet.

Im Anschluss an die Polymerisation erfolgte die Sedimentation entweder „low speed“ in einer Tischzentrifuge (Heraeus/Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) (20.000 **g**, 30 min, 4 °C; Xu *et al.*, 1998) oder „high speed“ in der Ultrazentrifuge (Ti 50.2 mit Einsätzen (Sonderanfertigung), 100.000 **g**, 2 h, 4 °C) (Kuroda *et al.*, 1994). Die SDS-Proben der Pellets

und Überstände wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und mit dem Programm UN-SCAN-IT (Silk Scientific, Orem, Utah) ausgewertet.

2.3.2 Kugelfall-Viskosimetrie

Der Einfluss der 170/185 kDa-Proteine auf die Aktin Polymerisation wurde durch Kugelfall viskosimetrische Messungen untersucht. Diese Messung eignet sich, Änderungen in der Festigkeit von Aktin-Netzwerken zu messen (Pollard, 1982).

Die 200 µl Ansätze enthielten ca. 17 µM Aktin und variierende Mengen der 170/185 kDa-Proteine. Jeder Ansatz wurde mit je 20 µl APB und Polymix versetzt, gemixt und sofort in eine 100 µl Kapillare gesogen. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Messung wurde die Kapillare in einem 55° Winkel ausgerichtet und die Zeit gemessen, die eine 1/32 Inch große Kugel benötigte, um eine Strecke von 6 cm zurückzulegen. Als Vergleichswert (100 %) diente die Differenz aus dem reinen F-Aktin-Wert und dem Wasser bzw. dem G-Aktin-Wert.

APB-Puffer 10x			Polymix 10x	
100	mM	Imidazol/HCl pH 7,5	1	M KCl
10	mM	ATP	20	mM MgCl ₂

2.3.3 Fluorometrie

Aktin besitzt einen reaktiven Cystein-Rest in Position 374, der mit N-(1-pyrene)-iodoacetamide (Molecular Probes/Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) bei hohem pH-Wert gekoppelt werden kann. Fluorometrische Messungen mit diesem Pyren gekoppeltem Aktin ermöglichen den Anteil des polymerisierten Aktins direkt zu messen, da sich das Fluoreszenzspektrum von Pyren-Aktin drastisch bei der Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin ändert, so dass bei einer entsprechenden Wahl der Emissionswellenlänge ein bis zu 20-facher Anstieg im Fluoreszenz-Signal beobachtet werden kann (Cooper & Pollard, 1982). Das Ausmaß der Polymerisation kann so durch Messung der Fluoreszenz-Änderung bestimmt werden (Kouyama & Mihashi, 1981). Der Pyren-Aktin Fluoreszenz-Assay wurde verwendet, um den Einfluss der 170/185 kDa Proteine auf F-Aktin zu bestimmen.

Bei dem Capping-Assay wurden Nukleationskeimen verwendet (Gettemans *et al.*, 1995), zu deren Herstellung 0,9 µM Aktin mit APB (1x), Polymix (1x) und 2 mM EGTA über Nacht bei

RT gelagert wurde. Da die kritischen Konzentrationen von 0,8 μM am Minus-Ende gerade überschritten waren, bildeten sich Nukleationskeime aber keine Filamente.

Je 1 ml Ansatz wurden 800 μl der Nukleationskeime mit variierenden Konzentrationen der 170/185 kDa Proteine versetzt und das Gesamtvolumen mit FL-Puffer (s. u.) auf 947 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von 53 μl der 25%igen Pyren-Aktin/Aktin-Mischung (insgesamt 3 μM) wurde sofort die Fluoreszenz-Änderung über 10 min in einem Fluorescence Spektrophotometer F3010 (HITACHI, Tokyo, Japan) mit einer Exzitation von 365 nm und einer Emission von 407 nm gemessen.

FL-Puffer

10	mM	Imidazol/HCl pH 7,5
1	mM	ATP
100	mM	KCl
2	mM	MgCl ₂
2	mM	EGTA

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und verwendete Primer

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985) diente der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen, die für das Protein α -Aktinin codieren. Als Template dienten u.a. 1 - 3 μl der λ -ZAP-Genbank, Phagen, transformierte Bakterien oder isolierte Plasmide. Die thermostabile DNA-Polymerase, der dNTP-Mix und den Polymerase-Puffer waren in dem Master Mix Y (Peqlab, Erlangen, Deutschland) enthalten. Je Ansatz wurden ein Hin- und ein Rück-Primer verwendet (Tabelle 3).

Die Standardprimer T7 und M13 R interagierten mit dem Vektor pBluescript SK(-), der zur Herstellung der cDNA Genbibliothek aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* (Giebing *et al.*, 1994) verwendet wurde. Die Primer pJET 1.2 H und pJET 1.2 R interagierten mit dem Vektor pJET 1.2/blunt (Fermentas/ Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) und wurden zur Kontrolle der Ligation bzw. Transformation eingesetzt.

Aus den im Genbank-Screening (Kap. 2.4.7) und der 5' bzw. 3' RACE (Kap. 2.4.9), ermittelten Sequenzen wurden die spezifischen α -Aktinin Primer (aA) abgeleitet und dann synthetisiert (MWG, Ebersberg, Deutschland). Die Ankerprimer waren Bestandteil des 5'/3'-RACE-Kit (2nd Generation, Roche, Basel, Schweiz).

Primer Richtung H/R Länge	Sequenz	Smp [°C]
T7 H (20)	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	53,2
M13 R (29)	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'	53,7
pJET 1.2 H (23)	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'	66,0
pJET 1.2 R (24)	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	73,6
Anker oligo-dT (36)	5'-CAGTCATGCTAGCCATACCTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'	67,9
Anker (19)	5'-CAGTCATGCTAGCCATACC-3'	56,7
5'RACE_aA-LT-R (29)	5'-CACTCGAGAAGGTCGCTAGCCATTCGTTC-3'	69,5
3'RACE_aA-LT-H (27)	5'-GAGGAAGAGGCACGAGGCGTTTGAAGG-3'	71,0
3'race2_aALt-H (29)	5'-CGCACAGGAACCTCAATGCTCTTGTTACC-3'	68,1
aALt5'E-H (20)	5'-CCAGTTTCGGACGCCTTTAC-3'	56,7
aA0H (21)	5'-ATTACCCAGGATGAGTACATG-3'	55,9
aA-Lt-Start-H (22)	5'-ATGTATTGGGAAAGGGAAGGTC-3'	58,4
aA2H (19)	5'-CTGAAGATATGGTCAACTC-3'	52,4
aA2R (19)	5'-GAGTTGACCATATCTTCAG-3'	52,4
aA3H (23)	5'-GGAAAAATGGTTTCGGATATTGC-3'	57,1
aA3R (23)	5'-GCAATATCCGAAACCATTTTCC-3'	57,1
aA4H (20)	5'-GAACGAGTCGAACAGATTGC-3'	57,3
aA4R (16)	5'-GCAATCTGTTGACTC-3'	49,2
aA6H (21)	5'-GCTTTTGATGTCGCTGAGAAG-3'	57,9
aA6R (21)	5'-CTTCTCAGCGACATCAAAGC-3'	57,9
aA5R (19)	5'-GTCTCTGCCTGTTGTGCAC-3'	58,8
aA7H (21)	5'-GAGAATCTGTGACCAATGGGA-3'	57,9
aA8H (26)	5'-AAGCTTTGATGAACTGGAGACGATAC-3'	57,9
aA-LT-Ende R (21)	5'-TTATAGGTCGCTCTCTCCGTA-3'	57,9

Tabelle 3: Verwendete Vektoren und Primer

Die PCR erfolgte nach der vollständigen Denaturierung der Ausgangs-DNA (5 min/ 96 °C). Die drei Schritte Denaturierung (1 min/ 96 °C), Hybridisation (1min) und Elongation (72 °C) wurden 35x wiederholt. Die Hybridisierung erfolgte bei einer Temperatur, die meist der Schmelztemperatur des Primers mit dem geringeren Schmelzpunkt entsprach. Die Elongationszeiten wurden je nach Größe des erwarteten Produktes variiert, je Kilobase Produkt wurde ca. eine Minute verwendet. Die finale Elongation wurde für 5 min bei 72 °C durchgeführt.

2.4.2 Reinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Sofern die erhaltenen PCR-Produkte eine ausreichende Reinheit und Konzentration aufwiesen, wurden sie mit dem QIAquick PCR Purification Kit (28104) (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und sequenziert (SeqLab, Göttingen, Deutschland).

2.4.3 Ligation und Transformation

Wenn Reinheit bzw. Konzentration nicht ausreichten, wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit dem cloneJet blunt end cloning Kit (K1213) (Fermentas/ Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) in den Vektor pJET1.2/blunt gemäß Anleitung ligiert und dann in chemisch kompetente *E. coli* One Shot TOP 10 (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) durch Hitzeschock (45 sec/ 42 °C, anschl. 2 min auf Eis) transformiert. Die transformierten Zellen wurden dann bei 37 °C für 1 Stunde (225 rpm, ThermoMixer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) kultiviert. 10 - 100 µl der Zellsuspension wurden dann auf Ampicillin-LB-Agar Platten (Kap. 2.4.7) über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.4.4 Detektion und Isolierung geeigneter Plasmide

Mittels Kolonie-PCR wurden die gewachsenen Kolonien mit geeigneten Primer Paaren nach den spezifischen α -Aktinin-Sequenzen durchsucht. Kolonien mit möglichst großen Sequenzstücken wurden dann gepickt und in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert. Aus diesen Kulturen wurden dann die Plasmide mit dem Gene JET Plasmid Miniprep Kit (K0503) (Fermentas/ Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) isoliert und das Vorhandensein der gesuchten Sequenz mittels PCR überprüft.

2.4.5 Agarosegele

Zur Überprüfung der PCR wurden 8 µl des PCR-Produktes mit 2,5 µl Ladungspuffer (6x) versetzt und in einem 1 bis 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Um die Agarose zu lösen wurde die Suspension in einer Mikrowelle ca. 1 min erhitzt. Die Elektrophoresen wurden in horizontalen Gelkammern mit TAE-Puffer mit einer Spannung von 100 V durchgeführt. 1%ige Gele ermöglichten eine gute Trennung von DNA in einem Bereich von 100 bis 10000 Basen, höher konzentrierte Gele ermöglichten eine bessere Trennung kleinerer DNA-Fragmente. Zur Dokumentation wurden die Gele mit UV-Licht ($\lambda = 254 - 366\text{nm}$) bestrahlt und fotografiert.

6x Ladungspuffer			TAE-Puffer		
0,25	%	Bromphenolblau	40	mM	Tris
0,25	%	Xylencyanol Blau FF	20	mM	Essigsäure
40	%	Glycerin	2	mM	EDTA pH 8,0
1%ige bis 1,5%ige Agarosegele					
0,5 - 0,75	g	Agarose			
50	ml	TAE-Puffer			
2,5	µl	Ethidiumbromid oder Mindori Green			
(Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland)					

Formaldehyd-Gel zur Auftrennung der RNA

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit 1%igen Formaldehyd-Agarosegelen überprüft. Die Herstellung der Gele und die Auftrennung erfolgte weitgehend wie bei den TAE-Agarosegelen, nur das anstelle des TAE-Puffers der FA-Agarosegel-Puffer verwendet wurde, und die Formaldehyd-Lösung erst nach dem Lösen der Agarose zugegeben wurde. Die Proben wurden mit RNA Lade Puffer (Peqlab; Erlangen, Deutschland) versetzt.

10x FA-Agarosegel-Puffer			FA-Agarosegel		
200	mM	MOPS	0,5	g	Agarose
50	mM	Natriumacetat	5	ml	10x FA-Agarosegel Puffer
10	mM	EDTA pH 7,0 /NaOH	44	ml	Wasser (DEPC behandelt)
			1	ml	37%ige Formaldehyd-Lösung
			2,5	µl	Ethidiumbromid oder Mindori Green

2.4.6 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer NanoDrop 2000c (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) ermittelt. Zur Abschätzung der Reinheit der DNA wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm berechnet. Eine ausreichende Reinheit war gegeben, wenn der Wert zwischen 1,6 und 1,8 lag.

2.4.7 Screening der λ -ZAP-cDNA-Genbank

Alle verwendeten Geräte und Lösungen waren autoklaviert, steril filtriert bzw. steril verpackt. Die Arbeiten wurden in einer Sterilbank durchgeführt.

Die vorhandene cDNA-Genbank ist von Giebing *et al.* (1994) erstellt worden. Sie enthält λ -ZAP-Phagen mit dem linearisierten Vektor pBluescript SK, in den die cDNA aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms integriert ist. Als Restriktionsenzyme wurden hierzu Xho I und EcoR I verwendet.

Als Wirtsorganismus für die λ -ZAP-Phagen dienten *E. coli* Y1090, die in LB•Mg-Medium mit 50 µg/ml Ampicilin und 0,2 % Maltose über Nacht kultiviert wurden (37 °C/ Schüttler mit 180 rpm). Der *E. coli* Stamm Y1090 besitzt bereits eine Ampicilin-Resistenz. Die zugegebene Maltose förderte die Bildung des Maltose Rezeptors, an den λ -Phagen binden. Das im Medium enthaltene Magnesium stabilisierte die Phagen.

Für das Genbankscreening wurden pro Ansatz 200 µl SM-Lösung, 600 µl *E. coli* Suspension der Übernachtskultur und 1 µl der λ -ZAP-Genbank für 20 Minuten bei RT inkubiert und dann auf LB•Mg-Agar ausplattiert (Ø 13 cm/ 42 °C). Hierzu wurde je Platte ein *E. coli*-Phagen Ansatz mit Topagarose (9 ml/ 48 °C) versetzt.

LB•Mg-Medium			LB•Mg-Agar	
1	%	Trypton	1,5	% Agar in LB•Mg-Medium
0,5	%	Hefeextrakt		
0,5	%	NaCl		
10	mM	MgSO ₄ pH 7,5		
SM-Lösung			LB•Mg-Topagarose	
100	mM	NaCl	0,6	% Agarose in LB•Mg-Medium
0,01	%	Gelatine		
10	mM	MgSO ₄		
10	mM	Tris/HCl pH 7,5		

Die Platten wurden zunächst bei 42 °C im Brutschrank inkubiert, bis nach drei bis vier Stunden die ersten Plaques im Bakterienrasen sichtbar wurden. Im ersten Schritt betrug die Konzentration der Phagen über 30.000 pro Platte, damit eine ausreichend hohe Wahrscheinlichkeit bestand, positive Klone zu detektieren.

Um die Expression der Proteine zu induzieren und diese zu fixieren, wurde je Platte eine mit 10 mM IPTG getränkte Nitrocellulose Membran luftblasenfrei aufgelegt und für weitere drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran markiert und mit PBS gewaschen. Die weitere Behandlung der Membranen entsprach der, der Western Blots (Kap. 2.2.4). Die Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

Nach erfolgter Antikörperreaktion wurden die Bereiche positiver Klone auf den Agarplatten ausgestochen, in 1 ml SM-Lösung aufgenommen und mit 50 µl Chloroform versetzt, um noch vorhandene *E. coli* Bakterien abzutöten. Über Nacht bei 4 °C diffundierten die Phagen aus der Topagarose. 1:100 bis 1:2000fache Verdünnungen dieser Lösungen wurden danach für das

Re-Screening eingesetzt. Durch mehrfache Wiederholungen des Ausplattierens, Detektierens und Ausstechens konnten Phagen isoliert werden, die eine Teilsequenz des α -Aktinins enthielten.

2.4.8 Isolierung von RNA

Alle Geräte und Puffer wurden so behandelt, dass sie RNase frei waren. Hierzu wurden sie entweder 4 Stunden bei 240 °C gebacken oder über Nacht mit 0,1%igem DEPC-Wasser behandelt bzw. angesetzt und anschließend autoklaviert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit TriFast (Peqlab, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben.

Von zwei auf Eis gekühlten *L. terrestris* wurden die Hautmuskelschläuche präpariert (3,8 g) und direkt in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde dann in 40 ml TriFast (Peqlab, Erlangen, Deutschland) homogenisiert (2 min/ 400 rpm). Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben.

Die Suspension wurde mit Chloroform (1 ml pro 5 ml Suspension) versetzt und nach 10 min zentrifugiert (JA20/ 12000 **g**/ 5 min). Hierdurch wurde eine Phasentrennung erreicht. In der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA, an der Phasengrenze und in der organischen Phase befanden sich die DNA und Proteine, die verworfen wurden. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen 70%igem Ethanol versetzt und nach 10 min zentrifugiert (JA20/ 12000 **g**/ 4 °C/ 10 min). Die RNA Pellets wurden zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, vereinigt und wie vorher zentrifugiert. Die gesamte RNA wurde in 800 μ l Wasser bei 60 °C gelöst.

Zur Isolierung der mRNA mittels oligo-dT-Cellulose wurde 280 mg frische oligo-dT-Cellulose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) in RNA-Elutionspuffer (30 min/ RT) aufgenommen und nach Anleitung in eine 10 ml Säule gepackt. Die Säule wurde zweimal mit 5 ml Elutionspuffer gewaschen und mit RNA-Bindungspuffer equilibriert.

Die isolierte gesamte RNA wurde mit 1 M NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,5 M NaCl eingestellt und auf die Säule aufgetragen. Dieses wurde mit dem Durchfluss zweimal wiederholt, um eine bessere Ausbeute zu erreichen. Mit dem RNA-Elutionspuffer wurde zunächst die 18S/ 28S RNA von der Säule eluiert, gefolgt von der, in einem weiteren Peak eluierenden, mRNA.

RNA-Elutionspuffer			RNA-Bindungspuffer		
10	mM	Tris/HCl pH 7,5	10	mM	Tris/HCl pH 7,5
0,1	mM	EDTA	0,1	mM	EDTA
			0,5	M	NaCl

Die mRNA enthaltenden Fraktionen wurden mit 3 M Natriumacetat pH 5,5 auf eine Endkonzentration von 300 mM eingestellt mit dem zweifachen Volumen Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt.

Die durch Zentrifugation (JA20, 15000 **g**, 45 min) pelletierte mRNA wurde in H₂O aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

2.4.9 5'/3' RACE (rapid amplification of cDNA-ends)

Um die fehlenden α -Aktinin-Sequenzstücke am 5'- und 3'-Ende zu ermitteln, wurde der 5'/3'-RACE-Kit (2nd Generation, Roche, Basel, Schweiz) nach Angaben des Herstellers verwendet. In zwei Ansätzen wurde die mRNA mittels der Transcriptor Reverse Transcriptase in cDNA umgeschrieben. Im ersten Ansatz wurde hierzu der oligo-dT-Ankerprimer aus dem Kit verwendet um die Sequenz am 3'-Ende zu ermitteln.

Zur Ermittlung der Sequenz am 5'-Ende wurde in einem zweiten Ansatz der spezifische Primer 5'RACE_aA-LT-R verwendet. An die so erhaltene cDNA wurde mithilfe der terminalen Transferase ein Poly-A-Schwanz synthetisiert, um für die folgende PCR neben dem spezifischen noch einen weiteren Primer zur Verfügung zu haben.

Zur Ermittlung der Sequenz des 3'-Endes wurde das Primer Paar 3'RACE_aA-LT-H/Anker oligo-dT in einer weiteren PCR eingesetzt und für die des 5'-Endes das Primer Paar 5'RACE_aA-LT-R/Anker oligo-dT. Da nach diesen PCRs die Konzentrationen der Amplifikate so gering war, dass im Gel keine Banden sichtbar waren, wurden Reamplifikation mit den Primer Paaren 3'RACE_aA-LT-H/Anker bzw. 5'RACE_aA-LT-R/Anker durchgeführt.

2.5 Online-Datenbanken und Computerprogramme

Online-Datenbanken

ExPASy:	www.expasy.org (Artimo <i>et al.</i> , 2012)
ProtParam tool:	http://web.expasy.org/protparam/ (Gasteiger <i>et al.</i> , 2005)
Prosite:	http://prosite.expasy.org/ (Sigrist <i>et al.</i> , 2010)
PhosphoSitePlus:	http://www.phosphosite.org/ (Hornbeck <i>et al.</i> , 2012)
SMART:	http://smart.embl-heidelberg.de/ (Schultz <i>et al.</i> , 1998; Letunic <i>et al.</i> , 2012)
Flybase	http://flybase.org (St. Pierre <i>et al.</i> , 2014)
Wormbase:	http://www.wormbase.org (Yook <i>et al.</i> , 2012; Stein <i>et al.</i> , 2001)
UniProt:	http://www.uniprot.org/ (The UniProt Consortium, 2012)
BLAST:	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (Altschul <i>et al.</i> , 1990)

Computerprogramme:

Beckman Gold	Beckman Coulter, Brea/Kalifornien, USA
UN-SCAN-IT	Silk Scientific, Orem, Utah, USA
Analyst GPMaw	Lighthouse data, Blackburn, VIC Australia
Mascot	Matrix Science, London, Großbritannien

3 Ergebnisse

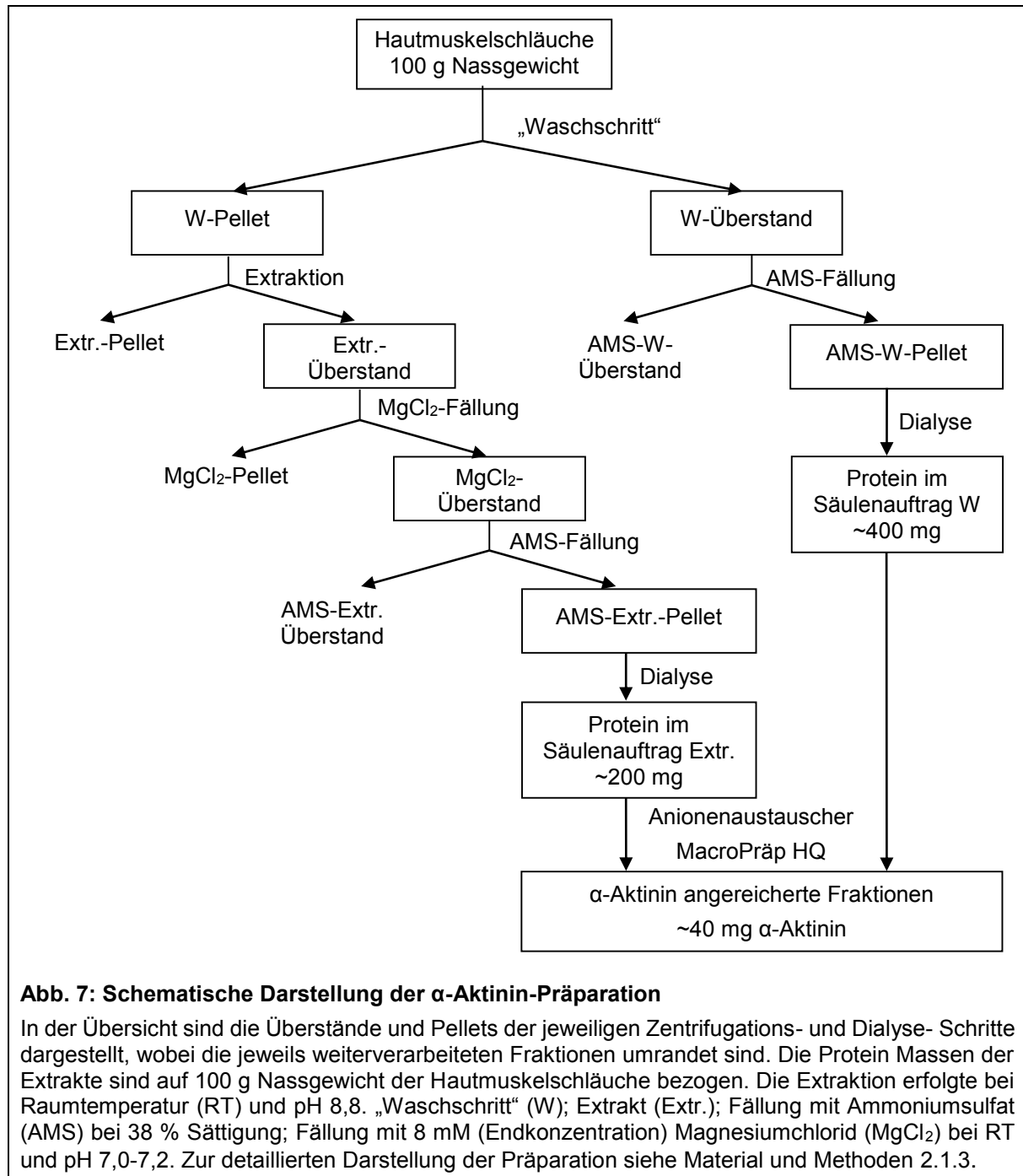
3.2 Isolierung von α -Aktinin

Die α -Aktinin Präparation aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* bestand zunächst aus folgenden Schritten: zwei Waschschritten in denen PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) als Proteasehemmer eingesetzt wurde, ein Extraktionsschritt bei 37 °C und pH 9,0, eine Magnesiumchlorid-Fällung bei 10 mM MgCl_2 und zwei Ammoniumsulfat-Fällungen (1.: 14,9 g/ 100 ml und 2.: 5,6 g/ 100 ml). Im Anschluss erfolgte die Dialyse und eine Anionenaustauscher Chromatographie (DEAE-Cellulose). Hierbei zeigte sich, dass die Ausbeute an *L. terrestris* α -Aktinin gering war (6 mg pro 100 g Hautmuskelschlauch-Nassgewicht) und dass der größere Teil davon Verunreinigungen aufwies.

In ersten Ansätzen zur Optimierung der Präparation wurden weitere Proteasehemmer verwendet, weil die Vermutung bestand, dass das α -Aktinin verdaut würde und dieses die Ausbeute reduziere. Diese Vermutung ergab sich aus der Beobachtung von D'Haese und Ditgens (1987), dass in mikroskopischen Bildern der schräggestreiften Muskulatur keine Z-Stäbe erkennbar waren, wenn in den Präparationen keine Proteasehemmer verwendet wurden. Da α -Aktinin in verschiedenen Muskeltypen als Bestandteil der Z-Elemente beschrieben worden ist (s. Einleitung), wurde vermutet, dass der Zerfall der Z-Stäbe möglicherweise auf den proteolytischen Verdau des α -Aktinins zurückzuführen sei.

Dieser erste Ansatz stellte keine Verbesserung dar, weil die Ausbeute deutlich sank und nach der Anionenaustauscher-Säule kaum bzw. kein α -Aktinin mehr zu detektieren war.

Bereits im Waschschriff der *L. terrestris* Präparation wurde in der SDS-PAGE eine deutliche 100 kDa Bande im Überstand beobachtet (Abb. 8 W-Überstand). Zunächst bestand die Vermutung, dass es sich hierbei um Paramyosin handelt, das ebenfalls eine Masse von 100 kDa besitzt und ein wesentlicher Bestandteil der Myosin-Filamente der Evertrebraten ist. Aufgrund der geringen α -Aktinin Ausbeuten stellte sich dann die Frage ob die 100 kDa Bande des Waschschriffs u. U. auch α -Aktinin enthält. Somit war zu klären, welches der 100 kDa Proteine sich im Überstand des Waschschriffs befand. Es bestand die Möglichkeit, dass hier ein erheblicher Teil des α -Aktinins verloren ging. Deshalb wurde der Wasch-Überstand mit Ammoniumsulfat (AMS) bei 38%iger Sättigung gefällt (Abb. 8 AW) und das Pellet entsprechend dem AMS-Pellet der Extraktion behandelt. Hierbei stellt sich heraus, dass tatsächlich ein erheblicher Anteil des α -Aktinins im Waschschriff herausgelöst wurde und aus dem Überstand des Waschschriffs isoliert werden konnte (Abb. 12). Somit ist der Waschschriff bei der Präparation von *L. terrestris* α -Aktinin ein erster Extraktionsschriff. Im Folgenden wird dieser erste Extraktionsschriff zur Unterscheidung weiterhin als „Waschschriff“ bezeichnet.



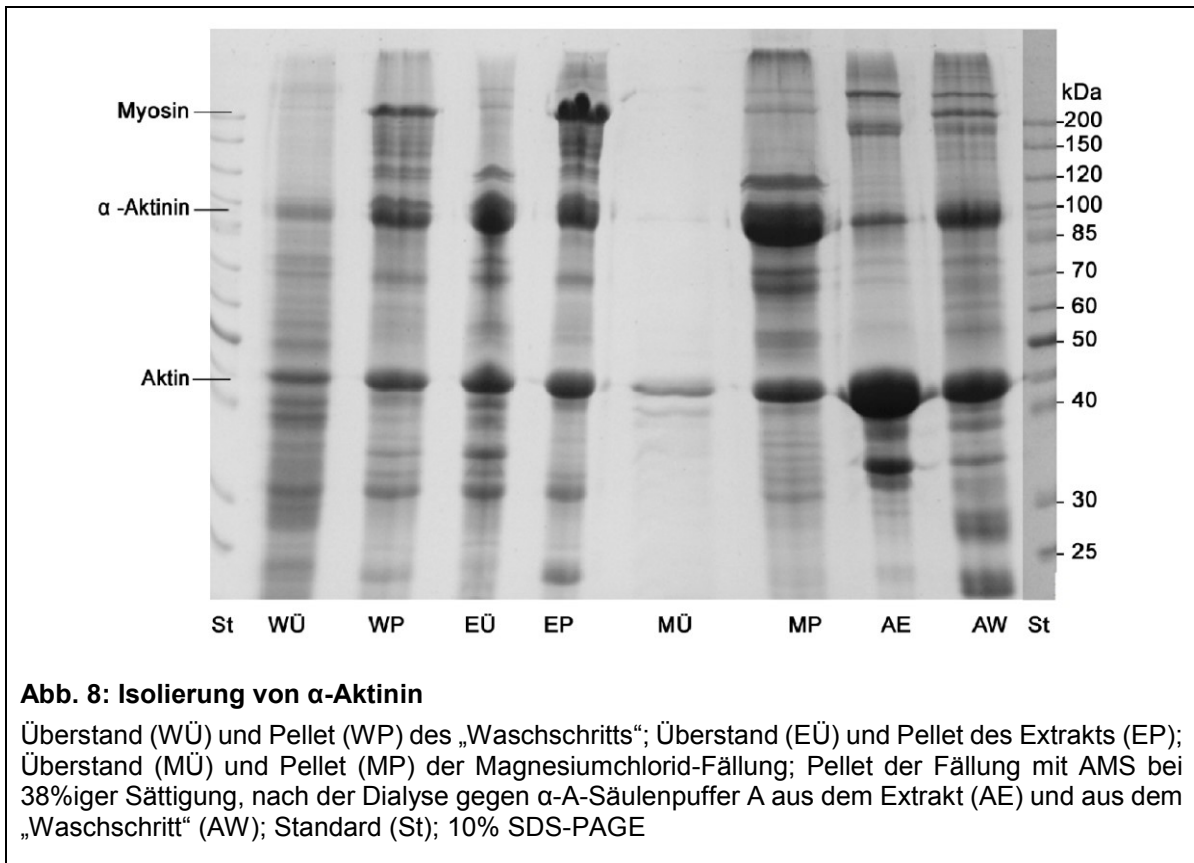
Weitere Modifikationen der ursprünglichen Präparationsvorschrift waren sinnvoll, um die Ausbeute von α -Aktinin aus dem Hautmuskelschlauch des *L. terrestris* zu erhöhen. So wurden die Extraktionsbedingungen leicht verändert (pH 8,8/ RT) und die MgCl_2 -Fällung mit einer Endkonzentration von 8 mM durchgeführt. Die beiden AMS-Fällungsschritte wurden zusammengefasst, da die erste AMS-Fällung keinen wesentlichen Reinigungseffekt hatte.

Im Extrakt waren neben weiteren Verunreinigungen zwei Banden, 42 kDa und 100 kDa, besonders stark vertreten (Abb. 8 EÜ). Die 42 kDa Bande entsprach dem Aktin, es stellte die größte Verunreinigung dar. Von der 100 kDa Doppelbande wurde vermutet, dass sie neben

dem α -Aktinin auch Paramyosin (Abb. 8 EÜ) enthielt. Ein großer Teil der Verunreinigungen konnten durch die $MgCl_2$ -Fällung abgetrennt werden (Abb. 8 MP). Bereits Feramisco & Burridge (1980) beschrieben diese Fällung als einen optionalen Reinigungsschritt, bei dem auch variierende Mengen des α -Aktinins sedimentieren, somit war ein Verlust an α -Aktinin in diesem Schritt nicht auszuschließen. Im Überstand der $MgCl_2$ -Fällung (Abb. 8 MÜ) war lediglich eine Bande, die dem Aktin zugeordnet wurde, deutlich sichtbar. Die weiteren Proteine waren so stark verdünnt, dass die entsprechenden Banden nur sehr schwach gefärbt waren. Mit der nachfolgenden AMS-Fällung bei 38%iger Sättigung wurden die Proteine konzentriert, sodass in der SDS-PAGE des dialysierten AMS-Pellets des Extrakts, das dem Säulenauftrag entsprach (Abb. 8 AE) weitere Banden zu erkennen waren. Neben der Aktin-Bande (42 kDa) war die Bande über 200 kDa auffallend (Abb. 8 AE), von der vermutet wird, dass sie Filamin enthielt, da die von Feramisco & Burridge (1980) beschriebene Präparation neben der Isolierung von α -Aktinin auch die Isolierung von Filamin (280 kDa) ermöglicht.

Die Banden zwischen 150 kDa und 200 kDa konnten zunächst keinem Protein zugeordnet werden. α -Aktinin und u. U. auch Paramyosin waren in der 100 kDa Bande enthalten und bei den Banden zwischen 30 kDa und 40 kDa, handelte es sich vermutlich um Tropomyosine (34 kDa und 37 kDa; Ditgens *et al.*, 1981).

In dem dialysierten AMS-Pellet des „Waschschriffs“ waren die beschriebenen Banden ebenfalls enthalten, allerdings war die 100 kDa Bande deutlich stärker und es waren weitere Banden zu beobachten, im niedermolekularen Bereich unter 40 kDa und vermutlich eine Myosin Bande um 200 kDa (Abb. 8 AW und Abb. 8 AE).



Die Präparation wurde so optimiert, dass bezogen auf 100 g Nassgewicht der Hautmuskelschläuche aus dem Extrakt und dem „Waschschrift“ insgesamt ~600 mg Protein auf die Säulen aufgetragen werden konnten. Der aus dem „Waschschrift“ gewonnene Proteinanteil (400 mg/100 g Nassgewicht) war größer als der aus dem Extrakt gewonnene (200 mg/100 g Nassgewicht). Ein Grund hierfür war auch der zusätzliche Reinigungsschritt der $MgCl_2$ -Fällung, wodurch der Anteil im Extrakt gelöster Proteine deutlich reduziert wurde.

Um eine bessere Trennung der Proteine aus *L. terrestris* zu erreichen, wurde abweichend von der Präparationsvorschrift von Feramisco & Burrige (1980) hier der stärkere Anionenaustauscher MacroPräp HQ (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) verwendet. Die mit α -Aktinin angereicherten Fraktionen eluierten bei 200 bis 280 mM NaCl (Abb. 9/ Abb. 10), wobei die mit höheren Salzkonzentrationen eluierenden Fraktionen mehr Verunreinigungen aufwiesen (Abb. 9 und Abb. 10).

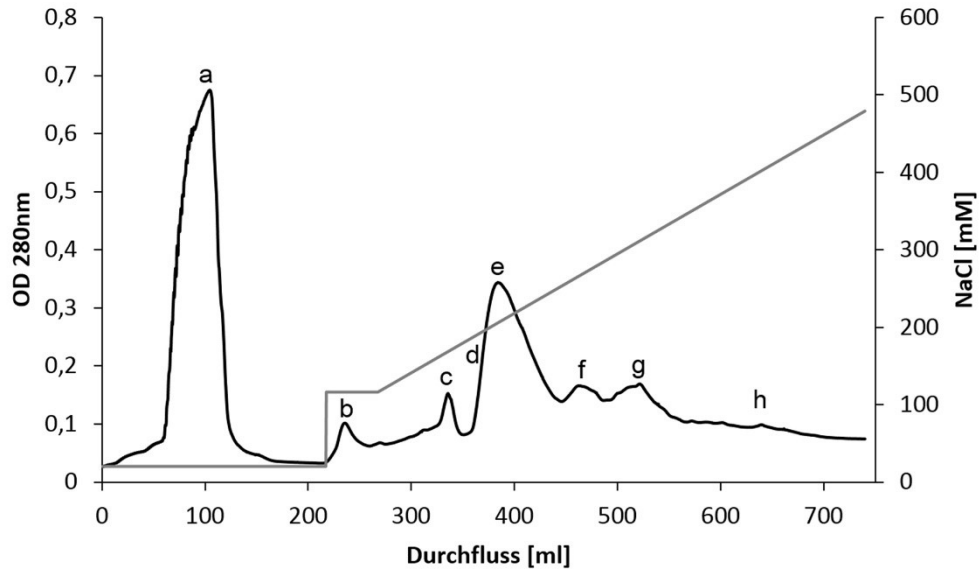


Abb. 9: Elutionsprofil der MacroPräp HQ Säule zur Reinigung von α -Aktinin (*L. terrestris*)

Für die Anionenaustauscher Chromatographie wurde eine MacroPräp HQ Säule (2,6 cm x 10 cm, ca. 50 ml) verwendet, die mit α -A-Säulenpuffer A (20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,2 mM DTT, 20 mM Tris/Acetat pH 7,6) equilibriert wurde. Aufgetragen wurden die in α -A-Säulenpuffer A aufgenommenen und dagegen dialysierten Pellets aus dem „Waschschritt“ und dem Extrakt. Das Auftragen der Probe (584 mg/ 90 ml) erfolgte mit 0,6 ml/min, die anschließende Flussrate betrug 1 ml/min. Das Elutionsprofil beginnt mit dem ersten Durchfluss während des Probenauftrags, anschließend wurde die Säule über zwei Säulenvolumen mit α -A-Säulenpuffer A gewaschen, dann folgte über ein Säulenvolumen eine 120 mM NaCl Stufe. Weitere Untersuchungen (Kap. 3.3.2) ergaben, dass mit dem NaCl Gradienten von 120 mM - 500 mM α -Aktinin zwischen 200 mM - 280 mM NaCl eluierte. Es ist der NaCl-Gehalt der eluierten Proben angegeben.

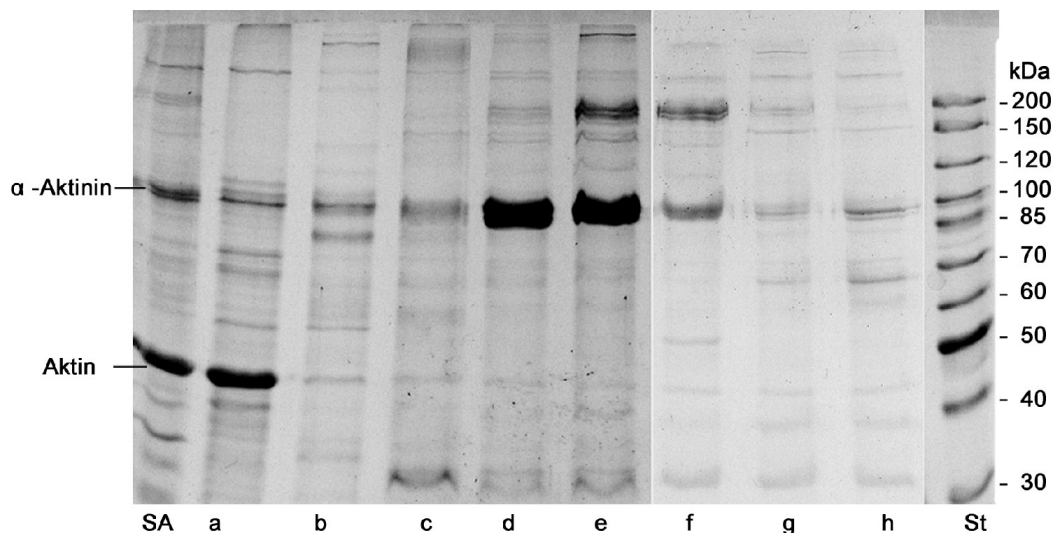


Abb. 10: Fraktionen der Chromatographie der Reinigung von α -Aktinin

Die auf den Anionenaustauscher MacroPräp HQ aufgetragenen Proteine (SA); Durchfluss (a); Stufe bei 120 mM NaCl (b); mit dem NaCl-Gradienten von 120 mM - 500 mM über 10 Säulenvolumen eluierte Fraktionen, wie sie im Chromatogramm (Abb. 9) dargestellt sind (c-h). Es wurden jeweils gleiche Volumina der eluierten Fraktionen aufgetragen; 10 % SDS-PAGE.

In weiteren Präparationen wurde versucht mit einem flacheren NaCl-Gradienten von 120 mM bis 300 mM über zehn Säulenvolumen (Abb. 11) eine bessere Abtrennung der Verunreinigungen zu erreichen. Es eluierten deutlich mehr Peaks (P0 - P6; Abb. 11 und Abb. 12), die eine Bande um 100 kDa lieferten. Diese enthielten aber weiterhin Verunreinigungen.

In dem Peak P1 war der Anteil der 100 kDa Bande an der gesamten Protein Menge am größten, dieser Anteil wurde bis zu Fraktion P3 geringer und stieg dann wieder etwas an. In dem Peak P2 war eine Doppelbande um 180 kDa deutlich sichtbar, in P4 - P6 fehlt sie, hier wurde aber eine Bande um 200 kDa sichtbar. Außerdem waren in den Peaks P2 - P6 hochmolekulare Proteine enthalten. Der Nachweis, dass es sich bei den isolierten 100 kDa Proteinen um α -Aktinin handelte bzw. nicht, erfolgte durch Gelfiltration und mit Antikörpern und wird in Kapitel 3.3.1 und Kapitel 3.3.2 dargestellt.

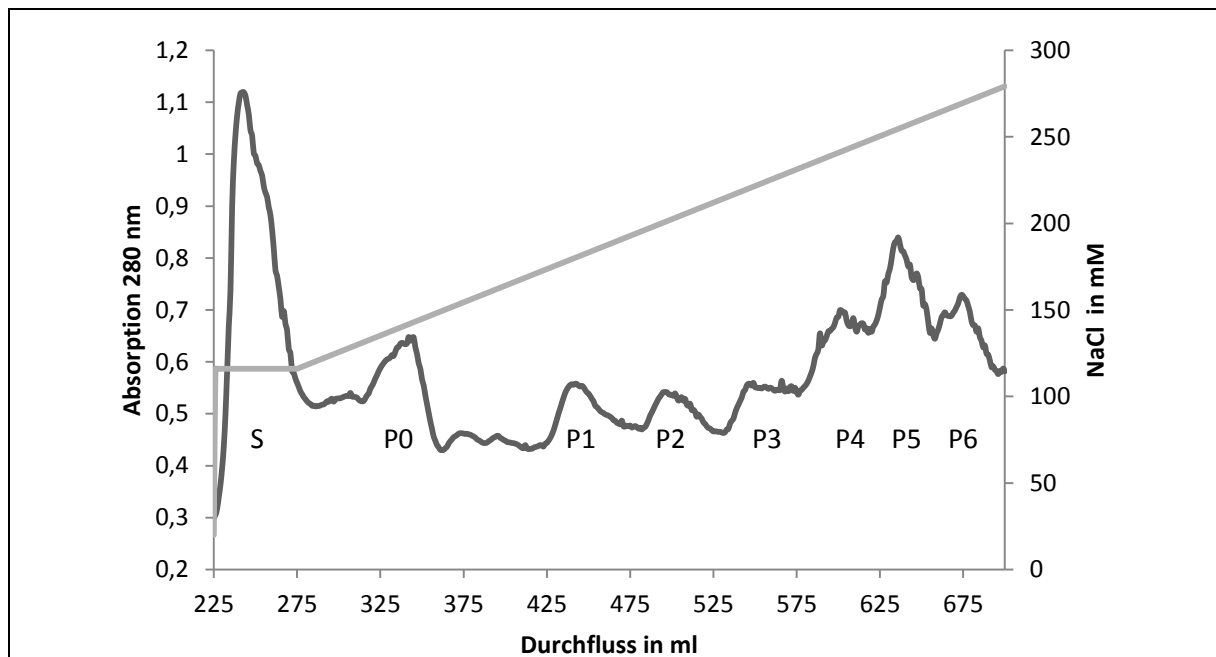


Abb. 11: Elutionsprofil der Reinigung des α -Aktinins (*L. terrestris*) aus dem „Waschschritt“

Für die Anionenaustauscher Chromatographie wurde eine MacroPräp HQ Säule (2,6 cm x 10 cm, ca. 50 ml) verwendet, die mit α -A-Säulenpuffer A (20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,2 mM DTT, 20 mM Tris/Acetat pH 7,6) equilibriert wurde. Das Auftragen der Probe (580 mg/ 50 ml) erfolgte mit 0,6 ml/min, die anschließende Flussrate betrug 1 ml/min. Die Säule wurde über drei Säulenvolumen mit α -A-Säulenpuffer A gewaschen, dann folgte über ein Säulenvolumen eine 120 mM NaCl Stufe. Mit einem NaCl Gradienten von 120 mM - 300 mM über zehn Säulenvolumen eluierte α -Aktinin zwischen 200 mM - 280 mM NaCl, die Peaks sind mit S, P0 - P6 gekennzeichnet.

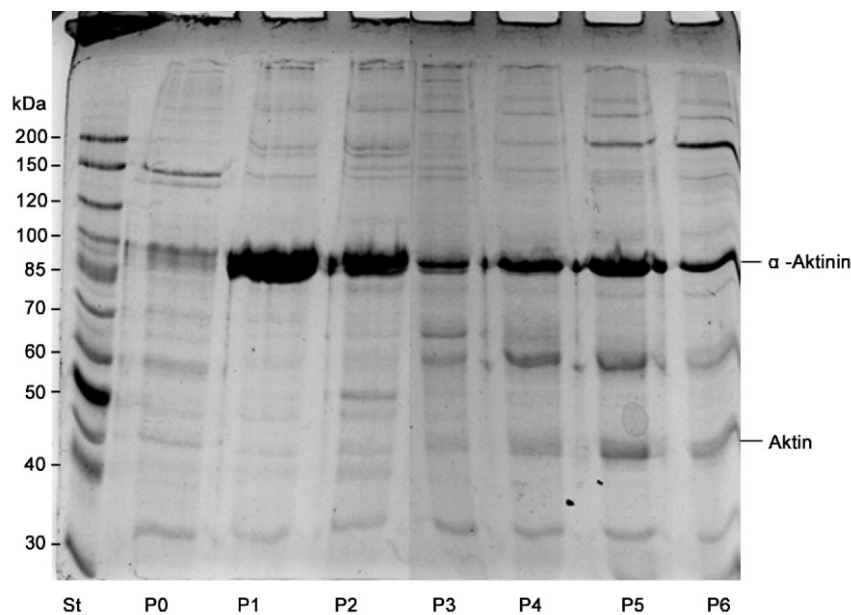


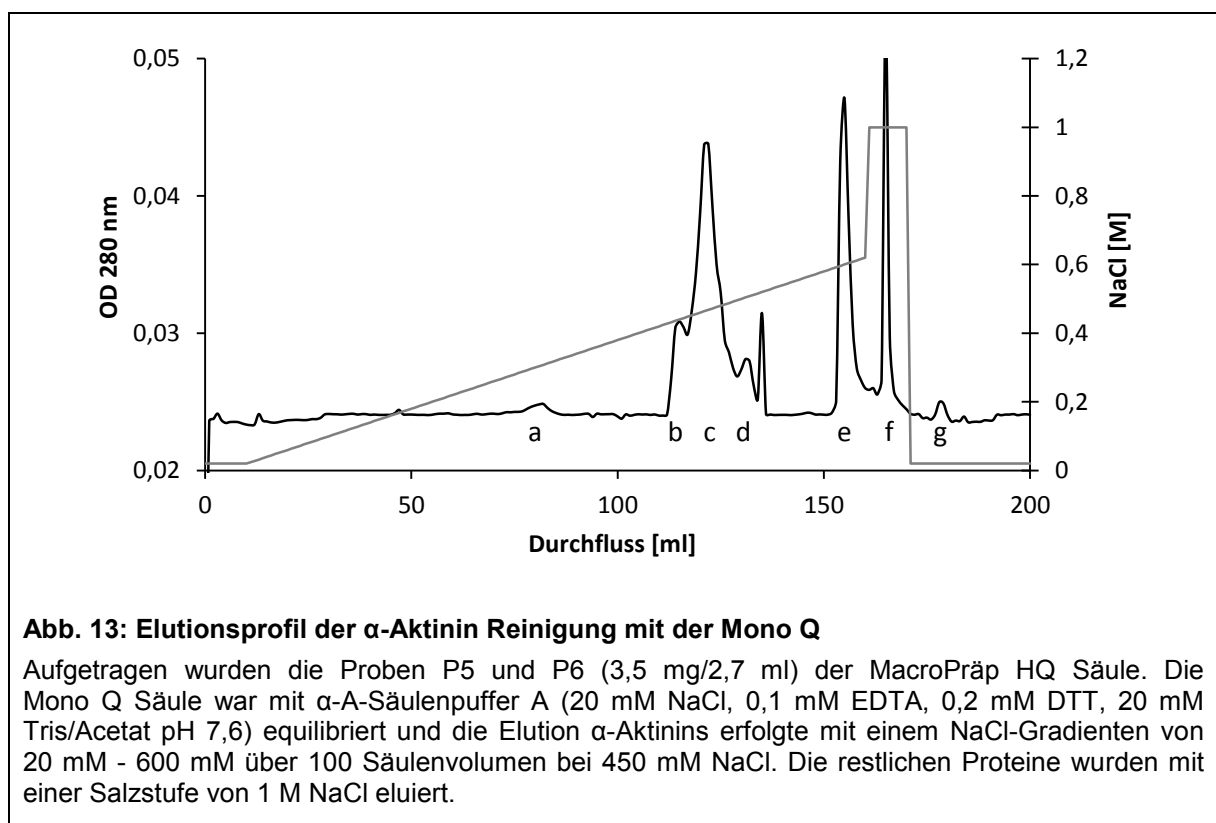
Abb. 12: Fraktionen der α -Aktinin Reinigung mit der MacroPräp HQ Säule

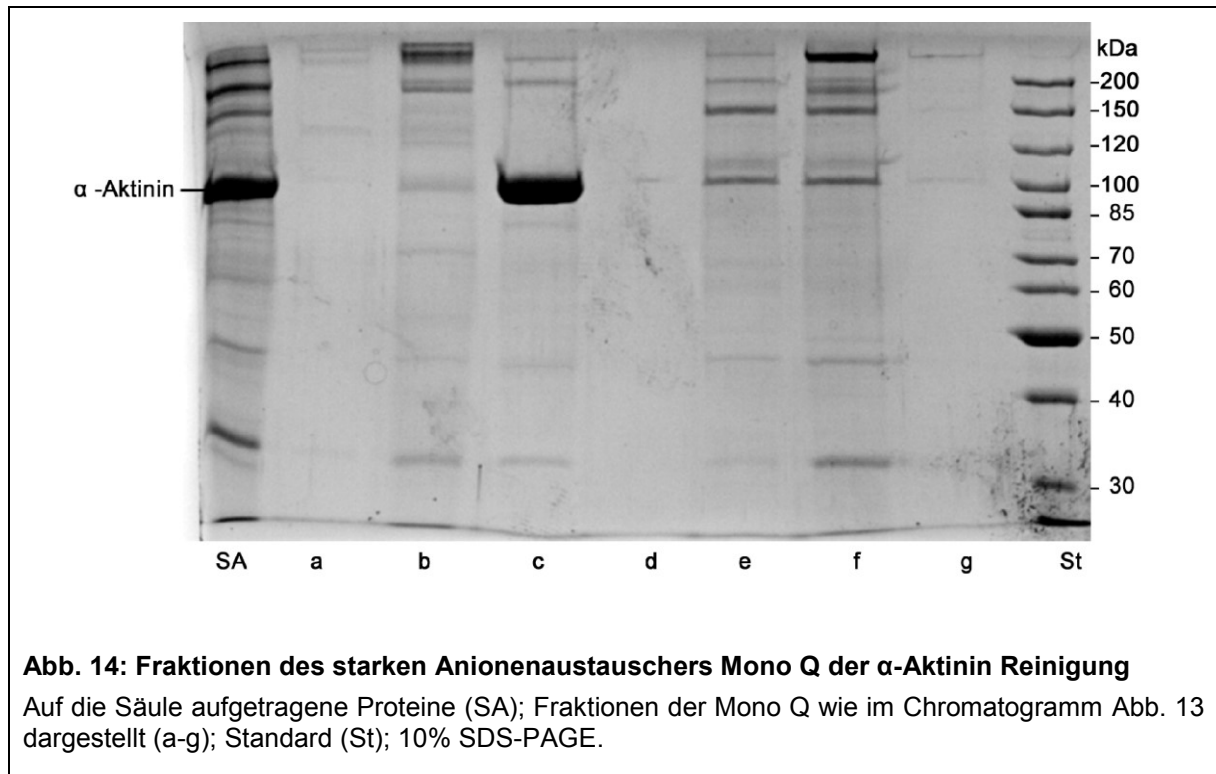
Von dem Anionenaustauscher MacroPräp HQ eluierte Fraktionen der α -Aktinin-Präparation aus dem „Waschschrift“. Mit dem NaCl-Gradienten von 120 mM - 300 mM über 10 Säulenvolumen eluierte Fraktionen, die Peaks P0 - P6 (Abb. 11) sind gepoolt und konzentriert. 10 % SDS-PAGE

In den Präparationen, in denen der Überstand des „Waschschrifts“ und der Extrakt getrennt behandelt wurden zeigte sich, dass auch nach der Reinigung über die Anionenaustauscher Säule aus dem „Waschschrift“ mehr α -Aktinin gewonnen werden konnte. Die mit α -Aktinin angereicherten Fraktionen des „Waschschrifts“ enthielten nach Abzug der Verunreinigungen (45 % mit UN-SCAN-IT bestimmt) 34 mg α -Aktinin und damit deutlich mehr als die Fraktionen der Extraktion, die insgesamt 7 mg α -Aktinin pro 100 g Nassgewicht enthielten. Die Fraktionen der Extraktion besaßen allerdings eine höhere Reinheit von 73 %. Die gesamte α -Aktinin Ausbeute aus den Fraktionen des „Waschschrifts“ und des Extrakts betrug nach der Reinigung über die MacroPräp HQ Säule ca. 40 mg, bezogen auf 100 g Nassgewicht der Hautmuskelschläuche. Die Berechnungen beziehen sich nur auf die Fraktionen in denen, wie im Folgenden (Kap. 3.3.1 und 3.3.2) erläutert, nachweislich α -Aktinin enthalten war.

Reinigung des α -Aktinins mit der Mono Q Säule

Die stark verunreinigte α -Aktinin Fraktionen der ersten Anionenaustauscher Chromatographie (MacroPräp HQ) wurden durch Ammoniumsulfat Fällung konzentriert und dann in α -A-Säulenpuffer A aufgenommen. Die Proben wurden mit einer NAPTM Säule (Sephadex GM25) entsalzt und auf den starken Anionenaustauscher Mono Q (1,7 ml) aufgetragen (Kap. 2.1.4). Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 20 mM - 600 mM, gefolgt von einer 1 M NaCl-Stufe (Abb. 13). α -Aktinin eluiert bei einer NaCl-Konzentration von ca. 450 mM. Aus ca. 3 mg Proteinen, die auf die Mono Q aufgetragen wurden, konnte 1 mg α -Aktinin isoliert werden. Zur Bestimmung des α -Aktinin Anteils sind die Banden des Coomassie gefärbte Gels densitometrisch (UN-SCAN-IT) gemessen worden. In Fraktion c war das α -Aktinin zu 95 % sauber und wies nur noch geringe Verunreinigungen von Proteinen mit molekularen Massen von 185 kDa (1 %), 170 kDa (2 %) und 30 kDa (2 %) auf (Abb. 14). Ob es sich bei den 100 kDa Banden, die in den Fraktionen e und f (Abb. 14) zu beobachten waren um α -Aktinin Isoformen handelte wurde nicht weiter untersucht.





3.3 Identifizierung und Charakterisierung von α -Aktinin

3.3.1 Bestimmung der nativen Masse mittels Gelfiltration

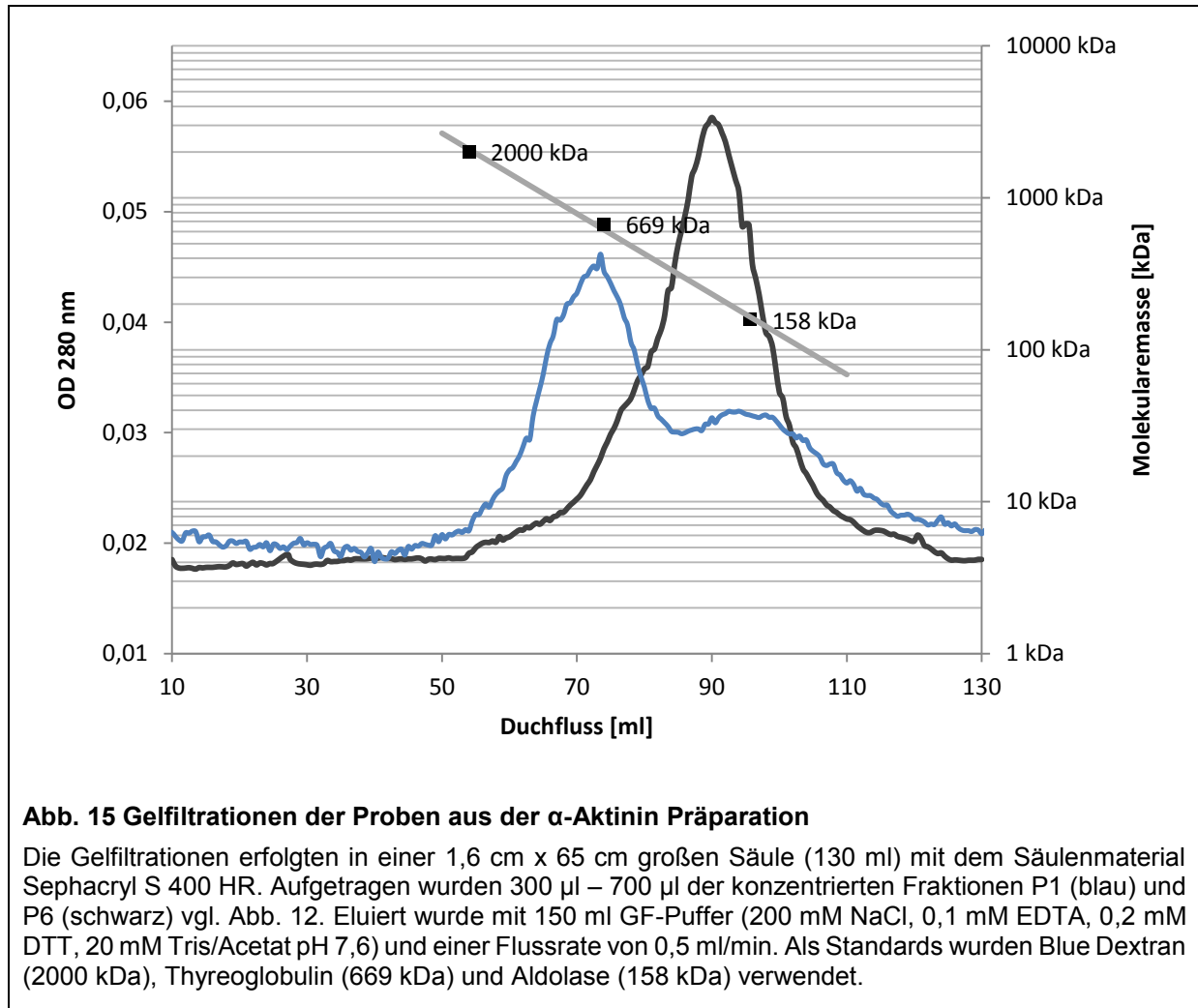
Mit der Anionenaustauscher Chromatographie (MacroPräp HQ, Abb. 11) ließen sich die Peaks P1 – P7 eluieren, die in den SDS-Gelen 100 kDa Banden lieferten (Abb. 12). Zunächst wurde angenommen, dass diese Banden alle α -Aktinin repräsentieren.

Die native Masse des α -Aktinins wurde mittels Gelfiltration mit einer kalibrierten Sephacryl S400 HR Säule (1,6 cm x 65 cm; 130 ml), die einen Trennbereich von 20 kDa - 8000 kDa (Jansohn & Rothhämel, 2012, S. 31) besitzt, bestimmt (Abb. 15). Hierbei zeigte sich, dass die Gelfiltrationen der Peaks P1 und P6 der MacroPräp HQ Säule (Abb. 15) nicht einheitlichen verliefen.

Das Maximum der Probe P6 wurde bei 90 ml erreicht, diesem Elutionsvolumen konnte eine molekulare Masse von 230 kDa zugeordnet werden. Da ein monomeres α -Aktinin eine molare Masse um die 100 kDa hat, nativ aber dimerisiert, war eine molare Masse im Bereich von 200 kDa zu erwarten und hieraus zu schließen, dass es sich um α -Aktinin handelte.

Die Probe P1 der MacroPräp HQ Säule eluierte bereits bei 72 ml, was einer nativen, molaren Masse von ca. 700 kDa entsprach.

Aus dem abweichenden Elutionsverhalten ergaben sich Zweifel, ob die 100 kDa Bande in der Proben P1 (Abb. 12) tatsächlich α -Aktinin repräsentierte, sodass weitere Untersuchungen, die in Kapitel 3.3.2 dargestellt sind, erforderlich waren.

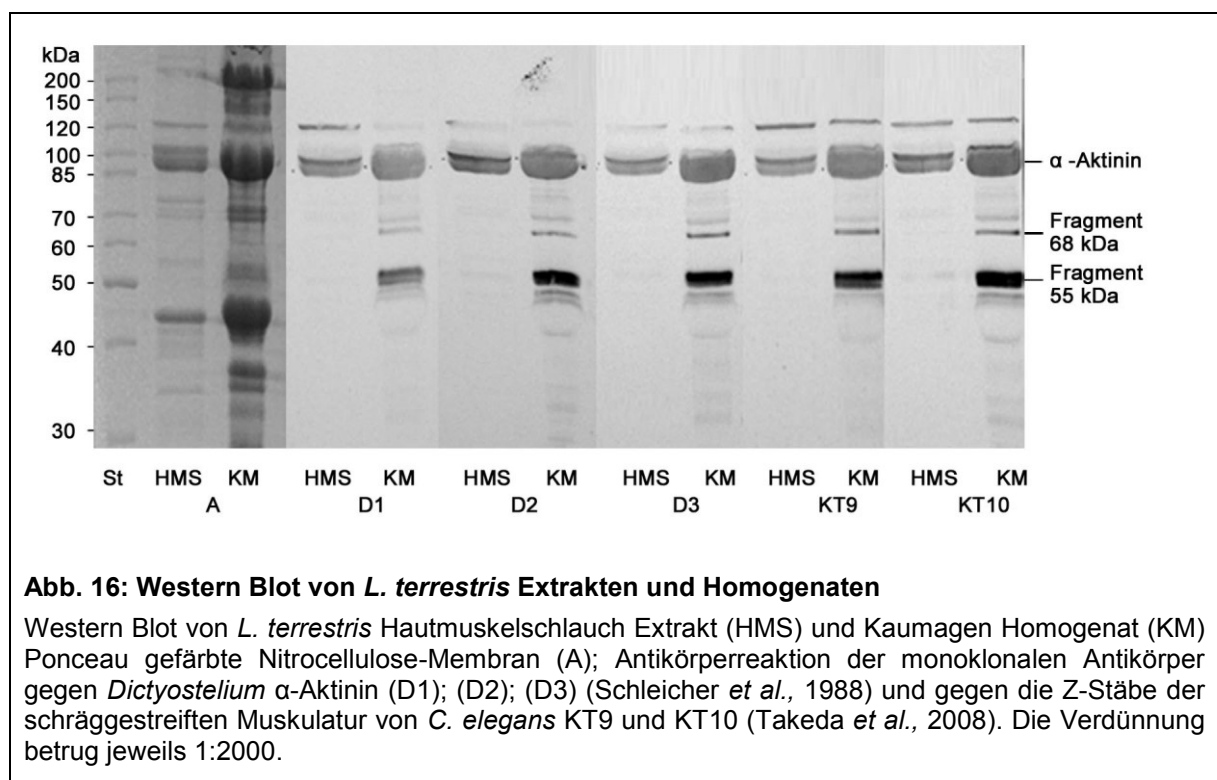


3.3.2 Nachweis von α -Aktinin mit Antikörpern

Um α -Aktinin von *L. terrestris* detektieren zu können wurden verschiedene Antikörper ausgetestet. Mit den monoklonalen IgG Antikörpern D1, D2 und D3 (Kap. 2.2.4) gegen α -Aktinin aus *Dictyostelium* (Schleicher *et al.*, 1988) traten deutliche Reaktionen mit 100 kDa Banden auf (Abb. 17, Abb. 16). Dieses führte zu dem Schluss, dass diese Banden α -Aktinin enthielten. Eben solche Reaktionen waren mit den monoklonalen IgG Antikörpern KT9 und KT10 gegen die Z-Stäbe der schräggestreiften Muskulatur im Hautmuskelschlauch von *C. elegans* (Takeda *et al.*, 2008) zu beobachten (Abb. 16). Das legt nahe, dass auch die

Antikörper KT9 und KT10 mit dem α -Aktinin interagieren, und dass dieses in den Z-Stäben der schräggestreiften Muskulatur lokalisiert ist.

In den Hautmuskelschlauch Proben in Abb. 16 war eine Doppelbande zu beobachten, ob diese Banden Isoformen oder α -Aktinin und ein Fragment darstellten blieb offen. Auch im Kaumagen-Homogenat konnte α -Aktinin mit den Antikörpern detektiert werden. Hierin waren die α -Aktinin-Banden so dominant, dass einzelnen Banden um 100 kDa nicht eindeutig unterschieden werden konnten. Allerdings waren Banden um 55 kDa und 68 kDa zu beobachten, die mit den jeweiligen Antikörpern interagierten, und vermutlich Fragmente darstellten.



Das Problem, dass in ersten Präparationen nur sehr wenig bzw. kein α -Aktinin aus den Hautmuskelschlauch-Extrakten des *L. terrestris* isoliert werden konnte, konnte mithilfe der Antikörper genauer untersucht werden. Es gab zwei Vermutungen über die Ursachen. Zum einen legte die Beobachtung, dass auch in dem Überstand des Waschschriffs ein 100 kDa Protein gelöst war nahe, dass dieses α -Aktinin sein könne. Zum anderen bestand die Befürchtung, dass das α -Aktinin während der Präparation in größerem Umfang proteolytisch verdaut wird und die zugegebenen Proteasehemmer nicht ausreichend sein könnten.

Mit Hilfe der Antikörper konnte überprüft werden, ob bereits in dem Überstand des „Waschschriffs“ ein erheblicher Teil von dem α -Aktinin enthalten war. Diese Annahme konnte

durch positive Antikörperreaktionen bestätigt werden. So wurde im Western Blot mit dem anti- α -Aktinin-Antikörper D2 die 100 kDa Bande des „Waschschriffs“ deutlich angefärbt (Abb. 17 W1).

Um die Frage zu klären ob die eingesetzten Proteasehemmer ausreichten um einen proteolytischen Verdau zu unterbinden, wurden zwei Präparationen bis zur Extraktion parallel und identisch durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Puffer der Präparation 2 zusätzlich der Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) enthielten (Kap. 2.1.3).

In dem Western Blot der Proben aus den „Wasch-“ und Extraktions-Schritten (Abb. 17) wurden von dem anti- α -Aktinin-Antikörper D2 in beiden Ansätzen, mit oder ohne zusätzliche Proteasehemmer, Banden um 100 kDa detektiert (Abb. 17 B). Es wurden aber keine der bekannten Spaltprodukte (s. Einleitung und Abb. 16) des α -Aktinins nachgewiesen. Das führte zu der Annahme, dass das α -Aktinin unfragmentiert vorlag. Auch wenn minimale Abspaltungen N- und C-terminal nicht ausgeschlossen werden können. Somit konnten die Befürchtungen einer vermehrten Fragmentierung des α -Aktinins ausgeräumt werden.

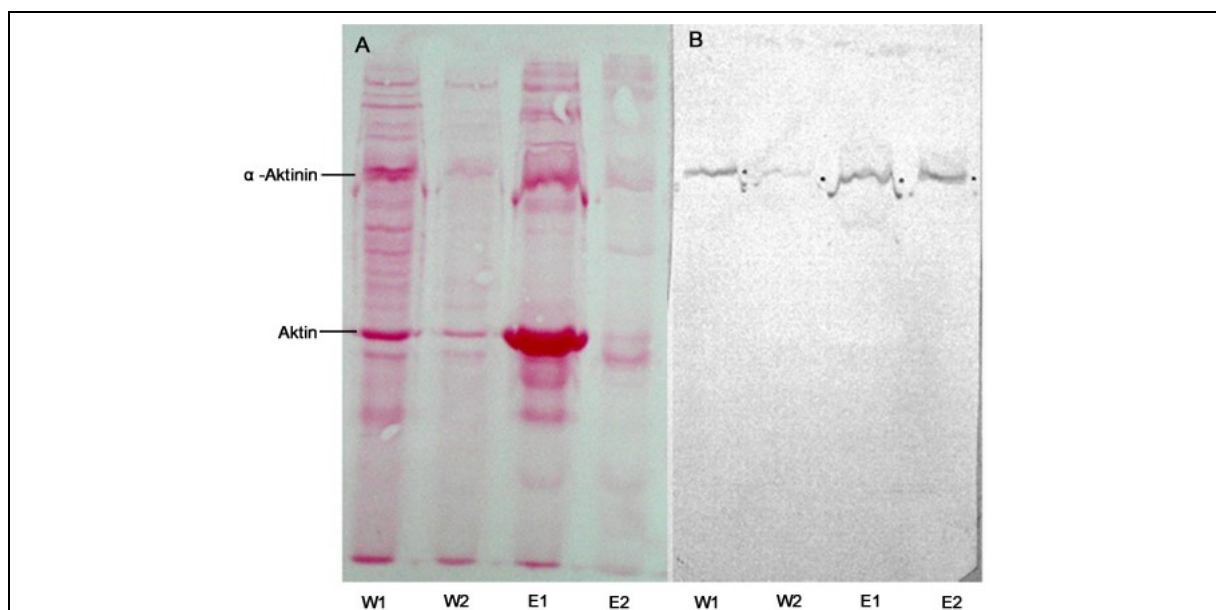


Abb. 17: Einfluss von Proteasehemmern auf die Isolierung des α -Aktinins

Western Blot des Überstandes aus dem „Waschschriff“ und dem Extrakt der α -Aktinin Präparation. Der α -Aktinin Nachweis erfolgte mit dem Erstantikörper D2 gegen *Dictyostelium* α -Aktinin (1: 2000) und dem an alkalische Phosphatase gekoppelten Zweitantikörper gegen Maus IgG.

Alle Präparationen von α -Aktinin enthielten den Proteasehemmer Pefabloc SC®, die Ansätze W2 und E2 enthielten darüber hinaus den Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Basel, Schweiz). Ponceau gefärbte Membran (A); Western Blot nach den Antikörperreaktionen (B), Überstand des „Waschschriffs“ (W); Extrakt (E); mit Pefabloc SC® (1); mit Pefabloc SC® und Protease-Inhibitor-Cocktail (2).

Der Western Blot der Überstände aus den „Waschschritten“ und den Extrakten (Abb. 17) zeigte außerdem, dass in der Präparation in der weniger Proteasehemmer eingesetzt wurden, die Konzentration der gelösten Proteine sowohl im Überstand des „Waschschritts“ als auch im Extrakt höher waren (die Proben wurden identisch behandelt und sind vergleichbar). Mit dem Protease-Inhibitor-Cocktail waren die Proteinkonzentrationen im „Waschschritt“ um die Hälfte und im Extrakt um ein Sechstel kleiner, im Vergleich zu den Proben, die ohne weitere Proteasehemmer präpariert wurden. Die Ausbeute an α -Aktinin fiel um 80 % geringer aus, wenn mehr Proteasehemmer eingesetzt wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien der zusätzliche Einsatz von Proteasehemmern weder notwendig, da Fragmentierung des α -Aktinins nicht zu beobachten war, noch sinnvoll, da hierdurch die Ausbeute erheblich reduziert wurde.

Neben den genannten monoklonalen Antikörpern wurde auch ein Antiserum aus Kaninchen gegen das Isolierte α -Aktinin aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* eingesetzt.

Dieses Serum zeigte in deutlich geringerer Konzentration (1:100.000) eine Reaktion mit den α -Aktinin-Banden (Abb. 18). Außerdem waren schwache, vermutlich unspezifische, Querreaktionen mit weiteren Banden oberhalb und unterhalb des α -Aktinins zu beobachten (Abb. 18 B). Die stärker gefärbten Banden unterhalb des α -Aktinins, z. B. in der Probe des Säulenauftrags (Abb. 18 B SA), stellen vermutlich Fragmente des α -Aktinins dar.

Mit dem Antiserum gegen *L. terrestris* α -Aktinin zeigten die 100 kDa Proteine der Peaks P0 und P1 nur eine sehr schwache Reaktion, im Gegensatz zu den 100 kDa Banden der folgenden Peaks. Diese Beobachtungen und die Ergebnisse der Gelfiltrationen führten zu der Schlussfolgerung, dass die 100 kDa Banden der Peaks P0 und P1 (Abb. 18 A) kein α -Aktinin darstellten und es sich hierbei u. U. um Paramyosin handelte. Die folgenden Fraktionen (P2 - P6) enthielten alle α -Aktinin, bis zu P5 in steigender Konzentration. Eine mögliche Fragmentierung war nur in geringem Maß zu beobachten, lediglich in P3 war eine schwache, kleinere Bande sichtbar, bei der es sich um ein Fragment handeln könnte.

Eine α -Aktinin-Doppelbande, wie sie in anderen Gelen beobachtet wurde, konnte hier nicht gezeigt werden. Ein Grund hierfür könnte die Trennung verschiedener α -Aktinin-Isoformen nach der Säulenchromatographie sein, da die Banden der Peaks minimal unterschiedliche Laufweiten aufweisen.

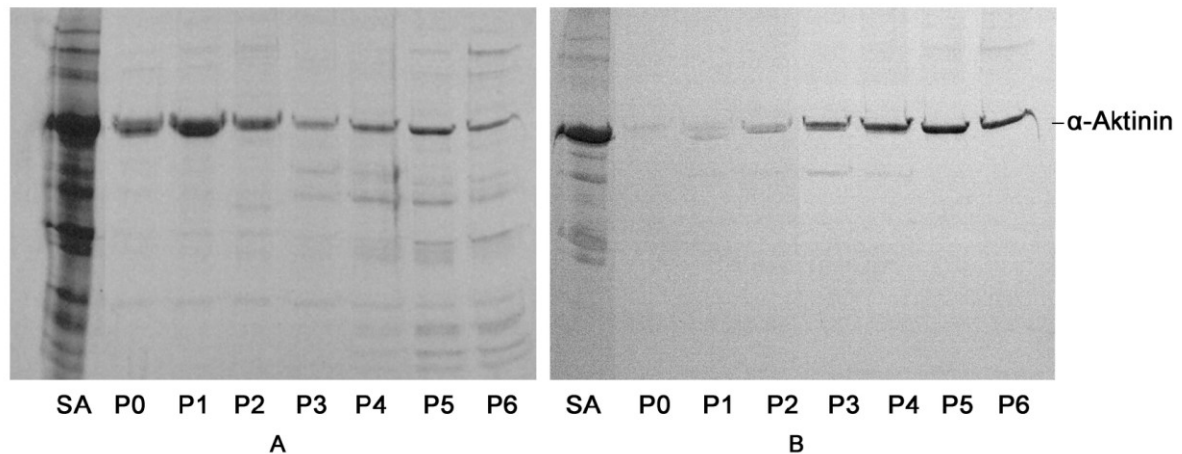


Abb. 18: Western Blot der α -Aktinin Fraktionen aus dem „Waschschrift“

Ponceau gefärbter Blot (A) und Reaktion der anti- α -Aktinin LT Antikörper (B) mit dem Säulenauftrag (SA) und den α -Aktinin-Fractionen der MacroPräp HQ Säule (P0 - P6, Abb. 11 und Abb. 12). Der polyklonale Erstantikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:100.000 eingesetzt und der Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:2500. 10% SDS-PAGE.

3.3.3 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) des α -Aktinins, das aus dem Überstand des „Waschschrifts“ gewonnen wurde, lieferte in der zweiten Dimension viele Spots mit pI-Werten zwischen 5,44 und 5,82 und molekularen Massen von 91 kDa; 95 kDa und 102 kDa (Abb. 19).

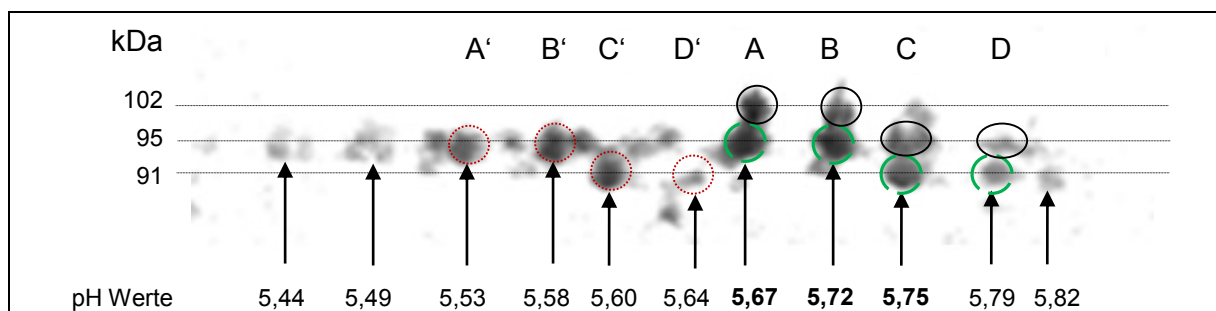


Abb. 19: Isoelektrische Fokussierung

Isoelektrische Fokussierung von α -Aktinin aus dem Hautmuskelschlauch des *L. terrestris*, das aus dem „Waschschrift“ isoliert wurde. Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension im Bereich von pH 4 - 7 und in der zweiten Dimension in einer 10 % SDS-PAGE (großes Gel), die Coomassie gefärbt wurde.

α -Aktinin Spots, die auch aus dem Extrakt dargestellt werden konnten (A, B, C, D). Die pH-Werte der dominierenden Spots sind fett hervorgehoben. Ein sich wiederholendes Muster aus vier Spots zeigten die durch schwarze, grüne und rote Kreise gekennzeichneten Gruppen.

In weiteren 2D-Elektrophoresen konnte wiederholt gezeigt werden, dass sowohl aus dem Überstand des „Waschschriffs“ als auch aus dem Extrakt isoliertes α -Aktinin deutliche Spots bei pI 5,67; 5,72; 5,75 (Abb. 19 A-C) und einen schwachen Spot bei pH 5,79 (Abb. 19 D) lieferte. Die Trennung der nahe beieinander liegenden Spots war schwierig und nicht immer vollständig. Solche Ansammlungen von Protein-Spots sind häufig in 2D-Gelen zu beobachten und stellen posttranslationale Modifikationen eines einzelnen Genprodukts dar (Packer *et al.*, 2007) oder Isoformen, die auf verschiedenen Genen beruhen oder durch unterschiedliches Spleißen zustande kommen.

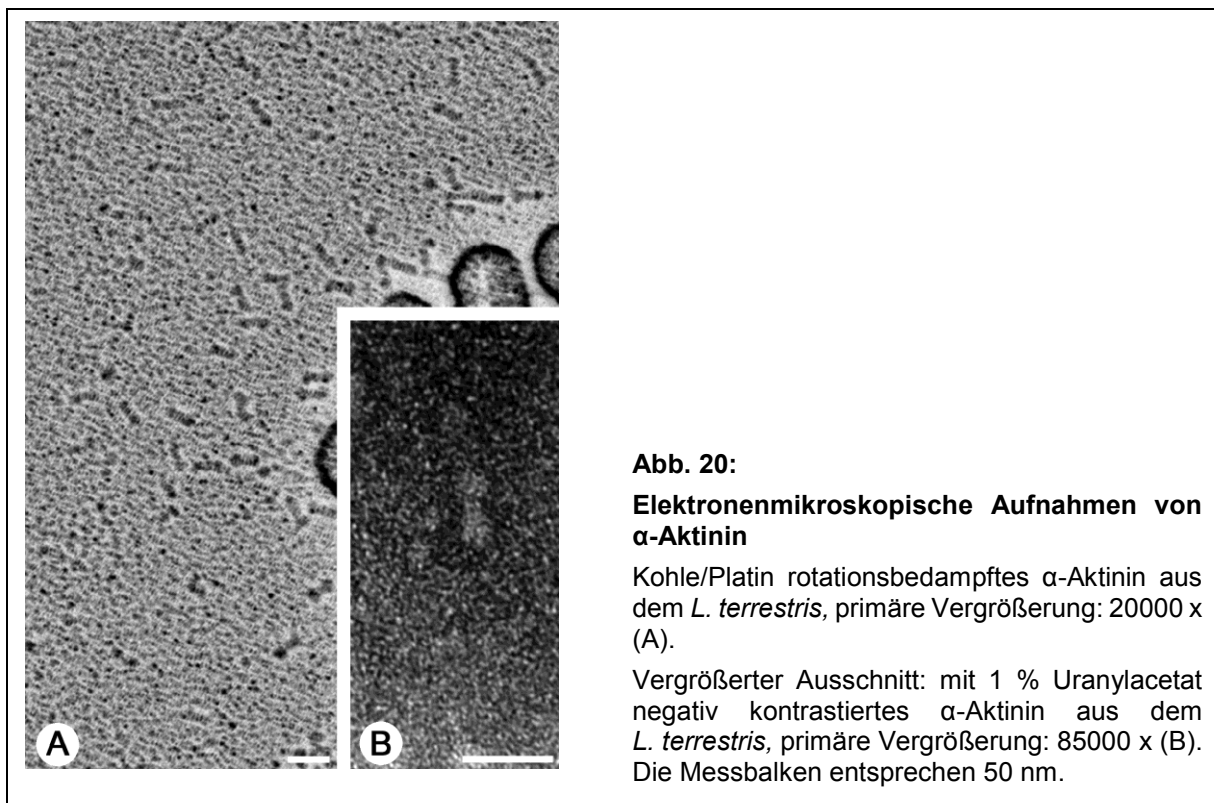
Die Konzentrationen der einzelnen Spots waren nicht einheitlich. Abhängig von den eingesetzten Mengen, waren geringer konzentrierte Spots nicht immer sichtbar.

Die aus der α -Aktinin-Sequenz (Kap. 3.3.6) berechneten Werte betragen: 5,61 pI und 103,8 kDa. Der schwarz umrandete Spot A (Abb. 19) weicht von diesen Werten nur geringfügig ab (5,68 pI; 102 kDa). Auffallend ist, dass die Spots A, B, C und D (Abb. 19) jeweils bei annähernd gleichem pI eine unterschiedliche Mobilität in der zweiten Dimension aufwiesen, schwarz und grün umrandet, was mit den in der Präparation teilweise beobachteten Doppelbanden übereinstimmt. Betrachtet man alle α -Aktinin Spots, so können sogar drei Banden unterschieden werden, wobei die mittlere am stärksten ist.

Jeweils drei (A, B, C) der vier Spots (in Abb. 19 je schwarz, grün und rot umrandet) zeigten eine große Intensität, und alle vier traten in einer ähnlichen Konstellation auf. Der pI der Spots A und B variierte um 0,05 pI und der Spot C hatte jeweils einen um 0,05 - 0,08 pI höheren isoelektrischen Punkt als Spot B. Zwischen Spot C und D lag der pI Unterschied bei 0,04 pI.

3.3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Protein, das aus dem Extrakt isoliert wurde und in SDS-Gelen eine 100 kDa Bande lieferte, wurde Kohle/Platin rotationsbedampft (Abb. 20 A). Außerdem wurde aus dem „Waschschritt“ (Abb. 12 P3) isoliertes 100 kDa Protein mit 1 % Uranylacetat negativ kontrastiert (Abb. 20 B). Beide Ansätze wurden elektronenmikroskopisch untersucht und zeigten die α -Aktinin typischen hantelförmigen Strukturen. Diese wiesen eine Länge von 35 nm auf. Die durchschnittliche Länge wurde aus der Messung von zehn α -Aktininen bestimmt.



3.3.5 Die Kosedimentation

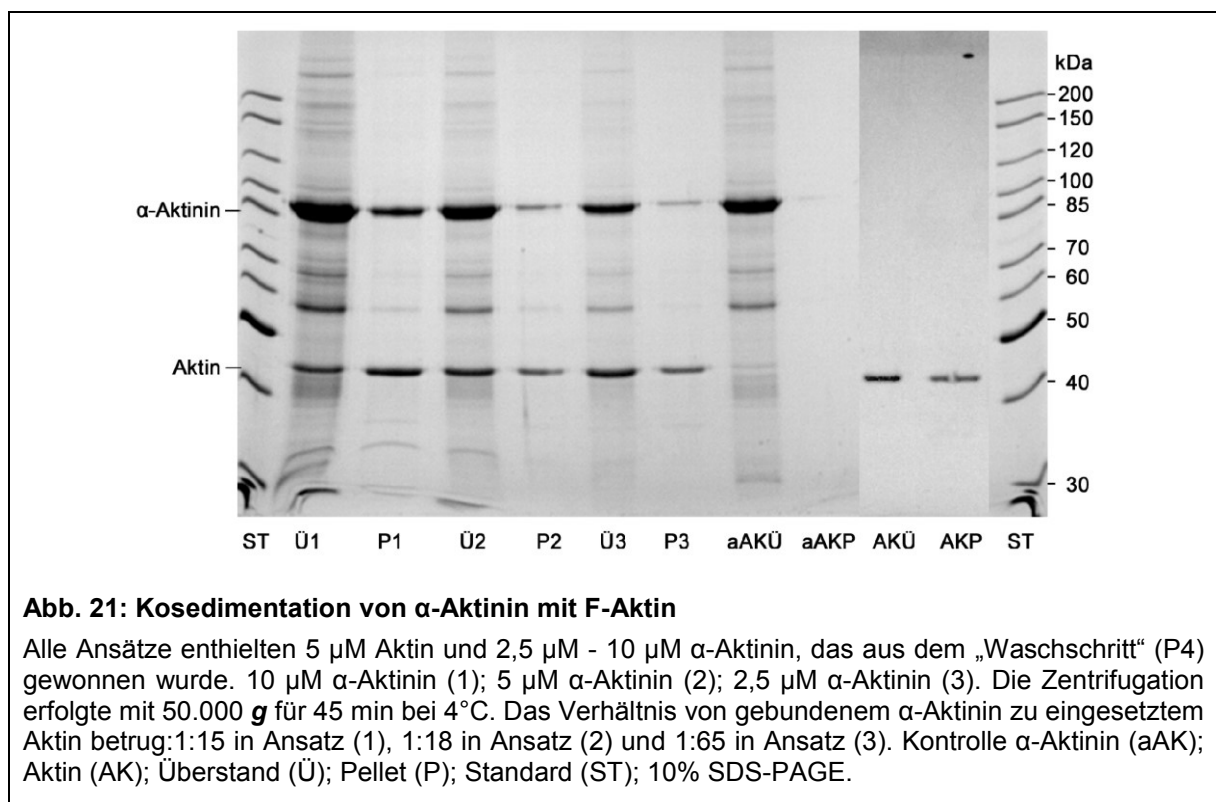
In Gegenwart von Aktin ließ sich vermehrt α -Aktinin pelletieren (Abb. 21 und Abb. 22). Eine Konzentrationsabhängigkeit dieses Effekts ließ sich ebenfalls zeigen. Wurde eine konstante Menge Aktin und eine steigende Menge α -Aktinin eingesetzt, so sedimentierten mehr α -Aktinin und Aktin. Dieses wird als Nachweis für die Interaktion von α -Aktinin mit Aktin betrachtet.

Es wurden verschiedene Kosedimentationsansätze ausgetestet. Das α -Aktinin stammte entweder aus dem Überstand des „Waschschrilles“, oder aus dem Extrakt, teilweise wurden Gemische aus beiden verwendet. Die Affinität des α -Aktinins aus dem Extrakt zum F-Aktin war

geringer, als die des α -Aktinins aus dem „Waschschrift“. Ein Gemisch von α -Aktinin aus dem „Waschschrift“ und dem Extrakt zeigte eine mittlere Affinität.

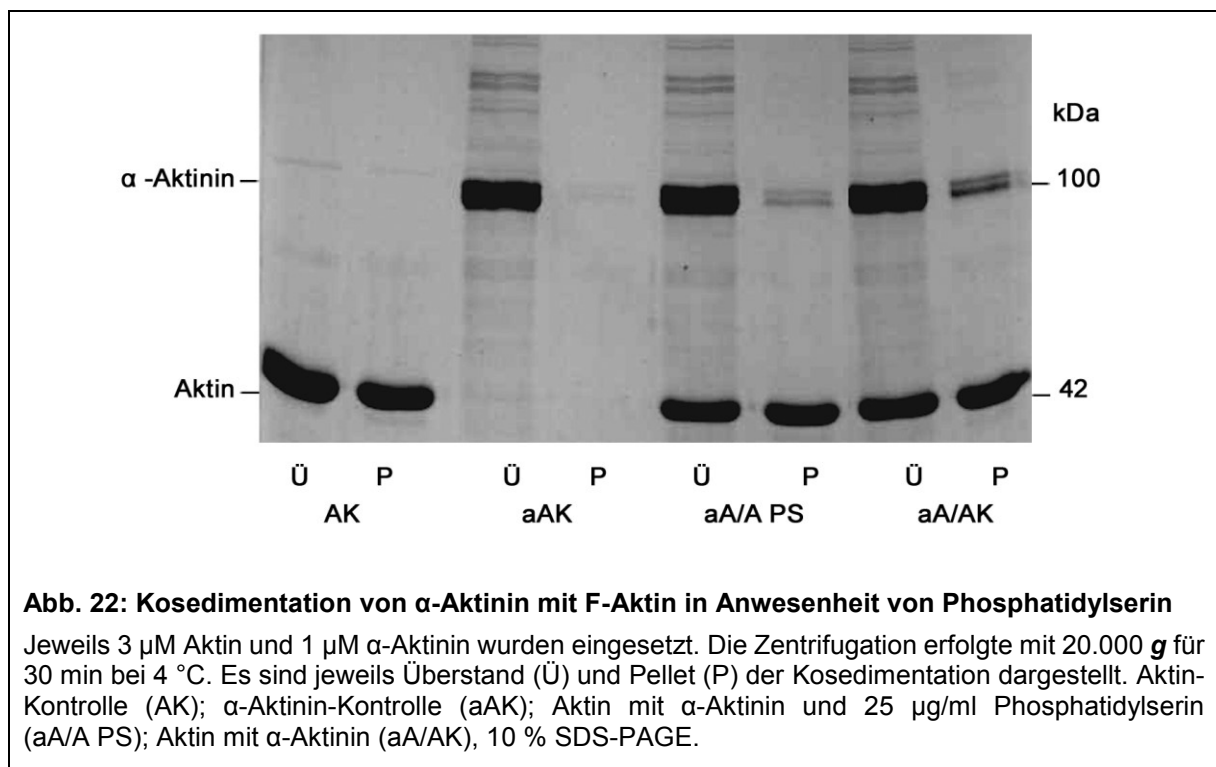
Einen Unterschied zwischen den α -Aktininen des „Waschschrifts“ und des Extraktes war auch in der isoelektrischen Fokussierung zu beobachten (Abb. 19), bei der die α -Aktinine des „Waschschrifts“ neben den mit A-D bezeichneten Spots zusätzlich auch Spots mit pH-Werten unter 5,65 lieferten (Abb. 19 A'-D'). Somit könnte die erhöhte Affinität zum Aktin auf diese Gruppe der α -Aktinine zurückzuführen sein.

Eine quantitative Auswertung der Kosedimentationen war aufgrund der breiten Streuung nicht möglich. Bei dem Versuch die Ursachen hierfür zu finden rückten folgende Beobachtungen in den Fokus. Die α -Aktinin Proben waren teilweise mit Proteinen verunreinigt, die als Doppelbanden im Bereich von 170 - 185 kDa sowohl im Überstand als auch im Pellet enthalten waren (Abb. 22 aA/AK Ü und P). In Anwesenheit dieser Proteine wurde ein höherer α -Aktinin Gehalt im Pellet beobachtet, was die Vermutung nahe legte, dass die 170 - 185 kDa Proteine an der α -Aktinin/Aktin-Interaktion beteiligt waren. Dieser Einfluss der 170 - 185 kDa Proteine, die in den Pellets der Coomassie gefärbten Gele zum Teil kaum zu beobachten waren (Abb. 21) könnte die breite Streuung in den Kosedimentations Ansätzen erklären.



Ein Einfluss von Ca^{2+} auf die α -Aktinin/Aktin-Interaktion konnte nicht nachgewiesen werden. Proben mit Ca^{2+} bzw. mit EGTA zeigten ein ähnliches Sedimentationsverhalten und auch in Harnstoff-Gelen wurde kein Effekt durch die Zugabe von Ca^{2+} beobachtet (nicht dargestellt).

Es konnte gezeigt werden, dass Phosphatidylserin einen hemmenden Einfluss auf die α -Aktinin/Aktin-Interaktion hat (Abb. 22). Die Verhältnisse von gebundenem α -Aktinin im Pellet zu eingesetztem Aktin betrugen 1:60 in der Kontrolle und 1:200 in dem Ansatz mit Phosphatidylserin. Eine Dosis-Abhängigkeit der α -Aktinin/Aktin-Interaktion von dem Phospholipid wurde nicht untersucht.



3.3.6 Ermittlung der α -Aktinin-Sequenz

Um die DNA-Sequenz von α -Aktinin aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* zu erhalten, waren verschiedene Ansätze notwendig.

Der erste Ansatz bestand in dem Screening der spezifischen *L. terrestris* Hautmuskelschlauch- λ -ZAP-Genbank (Giebing *et al.*, 1994). Mit dem polyklonalen Antikörper gegen *L. terrestris* α -Aktinin reagierten 12 Klone positiv und mit dem monoklonalen Antikörper D2 gegen *Dictyostelium* α -Aktinin konnten zwei positive Klone nachgewiesen werden. Da zu diesem Zeitpunkt keine spezifischen Primer zur Verfügung standen, und die Dichte der Plaques in diesem ersten Screening sehr groß war, waren weitere Reinigungsschritte erforderlich

(Kap. 2.4.7). Die einklonierten DNA-Stücke konnten dann durch eine PCR ermittelt werden, bei der die isolierten λ -ZAP-Phagen als Template dienten und das unspezifische Primerpaar T7/M13 R des Vektors pBluescript II SK eingesetzt wurde. Die Sequenzierungen lieferten ein 890 bp großes Stück aus der Mitte der α -Aktinin-Sequenz. Ein Vollängen-Klon oder auch weitere Sequenzstücke des α -Aktinins wurden nicht gefunden. Durch BLAST-Analysen wurde die größte Übereinstimmung mit α -Aktinin-Sequenzen von *Biomphalaria glabrata* (NCBI: AF484962.1) und *Ixodes scapularis* (NCBI: XM_002415288.1) ermittelt. Das durch das Genbankscreening gefundene Sequenzstück codiert für einen Teil der Spektrin-Repeats des *L. terrestris* α -Aktinins. Da die Methode des Genbankscreenings nur diese Teilsequenz lieferte, war ein weiterer methodischer Ansatz notwendig.

Um die gesamte codierende Sequenz zu erhalten wurde die RNA bzw. die mRNA isoliert (Kap. 2.4.8) und dann von dem bekannten Sequenzstück ausgehend, eine 5'- und eine 3'-RACE (Kap. 2.4.9) durchgeführt. Hierzu wurde aus 3,8 g frisch präpariertem Hautmuskelschlauch 2,4 mg RNA gewonnen. Dieses entspricht einer Ausbeute von 0,15 % der Ausgangsmasse.

Aus 2,2 mg der Gesamt-RNA konnten dann 3,6 μ g mRNA isoliert werden. Das entsprach einer Ausbeute von 0,16 %, bezogen auf die eingesetzte Menge der Gesamt-RNA. Der Anteil der mRNA an der Gesamt-RNA wird mit 1 - 5 % (Graw, 2010, S. 92) angegeben, hier wurde ein Zehntel des zu erwartenden Anteils isoliert. Somit war die Ausbeute relativ gering, aber die erhaltene Menge war für die Herstellung der cDNA ausreichend.

Die mRNA wurde in cDNA umgeschrieben, die dann als Template für die 5'- und die 3'-RACE Reaktionen dienten. Hierbei wurden spezifische, aus den jeweils bekannten Sequenzstücken abgeleitete Primer und Ankerprimer in der PCR eingesetzt, die an den jeweiligen Enden angehängt wurden. Die so erhaltenen Sequenzstücke ließen sich aufgrund ihrer Überlappungen letztlich zu einer vollständigen α -Aktinin-Sequenz zusammensetzen.

Außerdem konnten am 5'-Ende 156 bp und am 3'-Ende 72 bp der nicht codierenden Region ermittelt werden. Die codierende Region enthält 2679 Basenpaare, die in 893 Aminosäuren übersetzt werden konnten (ExPASy Translate Tool, Artimo *et al.*, 2012).

Aus der Sequenz (s. Anhang) wurde der isoelektrische Punkt mit pI 5,61 und die Molekularmasse mit 103,8 kDa berechnet.

An den Positionen 546. bp, 681. bp, 732. bp, 795. bp, 948. bp und 1191. bp sind sowohl Cytosin als auch Thymin Basen gefunden worden. An den Positionen 924. bp und 1020. bp wurden die Basen Guanin oder Adenin ermittelt (s. Tabelle 4). Keine dieser Variationen führt zu einem Aminosäure-Austausch, da jeweils die dritte Base des Triplets betroffen ist und beide Triplets für die gleiche Aminosäure codieren.

Im Gegensatz dazu ist die 893. Base entweder Cytosin oder Thymin. Da hier die zweite Base des Triplets betroffen ist, sind die resultierenden Aminosäuren entweder Prolin (cct) oder Leucin (ctt). Dieser Unterschied, der keinen Einfluss auf den isoelektrischen Punkt hat, weist auf einen Polymorphismus hin.

Anzahl Sequenzen	Position Base	Anzahl der Sequenzen mit der jeweiligen Base		Position der Aminosäure	Aminosäure-austausch
8	546	2 x T	6 x C	182	nein
14	681	5 x T	9 x C	227	nein
15	732	11 x T	4 x C	244	nein
15	795	8 x T	7 x C	265	nein
14	893	3 x T	11 x C	298	Leucin oder Prolin
14	924	11 x G	3 x A	308	nein
13	948	3 x T	10 x C	316	nein
13	1020	4 x G	9 x A	340	nein
4	1191	2 x T	2 x C	397	nein

Tabelle 4: Variationen in der α -Aktinin-Sequenz aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris*

Aus der Aminosäuresequenz wurde die Aminosäure-Zusammensetzung (Tabelle 5) bestimmt (ProtParam; Gasteiger *et al.*, 2005).

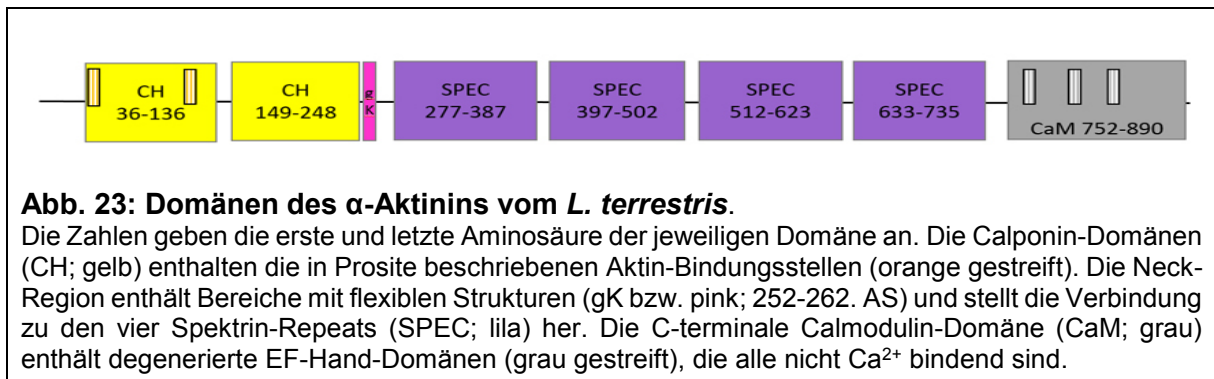
Ala (A)	7,2 %	Gly (G)	4,7 %	Pro (P)	3,1 %
Arg (R)	7,5 %	His (H)	2,6 %	Ser (S)	4,9 %
Asn (N)	5,0 %	Ile (I)	5,7 %	Thr (T)	4,5 %
Asp (D)	6,8 %	Leu (L)	10,4 %	Trp (W)	1,6 %
Cys (C)	1,3 %	Lys (K)	5,9 %	Tyr (Y)	2,9 %
Gln (Q)	5,7 %	Met (M)	2,5 %	Val (V)	4,3 %
Glu (E)	9,2 %	Phe (F)	4,1 %		

Tabelle 5: Aminosäure-Zusammensetzung von α -Aktinin aus dem Hautmuskelschlauch des *L. terrestris*

Auffallend sind hohe Anteile von Leucin und Glutamat und die geringen an Cystein und Tryptophan. Diese Verteilung der Aminosäuren ähnelt denen, die bei humanem oder *D. melanogaster* α -Aktininen gefunden wurden. Die größte Sequenzübereinstimmung, mit 72 % identischer Aminosäuren, besteht mit der adulten Isoform von *D. melanogaster* α -Aktinin (ACTN_DROME P18091).

Insgesamt enthält die α -Aktinin Sequenz von *L. terrestris* zwei Calponin homologe Domänen, die die Aktin-Bindungsstellen enthalten, die verbindende Neck-Region, vier Spektrin-Repeats

und eine Calmodulin-Domäne mit vier EF-Händen. Eine EF-Hand wurde von SMART nicht und eine EF-Hand als nicht-sensitiv identifiziert (SMART; Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2012).



Der Vergleich der α -Aktinin-Sequenz vom *L. terrestris* mit den Sequenzen konservierter Domänen ergibt, dass hierin die typischen Aktin-Bindungsstellen AKTININ_1 und AKTININ_2 und EF-Hände enthalten sind (Prosite; Sigrist *et al.*, 2010).

Die Aktin-Bindungsstellen im α -Aktinin vom *L. terrestris* entsprechen den beschriebenen Grundmustern AKTININ_1 und AKTININ_2 vollständig (Tabelle 6 A, B), somit ist die Interaktion des α -Aktinins mit dem Aktin, auch anhand der α -Aktinin-Sequenz nachzuvollziehen.

In der EF-Hand sind für die koordinative Bindung der Calcium Ionen die Liganden an den mit X; Y; Z; -Y; -X und -Z beschriebenen Positionen entscheidend (Gifford *et al.*, 2007). Von den vier Positionen X; Y; Z und -Z müssen wenigstens drei mit Asparaginsäure (D) oder Glutaminsäure (E) besetzt sein, damit eine koordinative Bindung eines Calcium Ions erfolgt (Gifford *et al.*, 2007). In allen EF-Händen des *L. terrestris* α -Aktinins kommen an zwei der genannten Positionen abweichend Aminosäuren vor (Tabelle 6 C). Der ersten EF-Hand I fehlen an den Positionen Y und Z die passenden Liganden, der zweiten an den Positionen Y; Z; und -Z und der dritten an den Positionen Z und -Z, somit sind diese EF-Hände alle nicht Ca^{2+} bindend. Dem Calmodulin entsprechend wäre eine vierte EF-Hand zu erwarten, diese ist aber in der α -Aktinin-Sequenz vom *L. terrestris* derartig degeneriert, dass sie nicht zu erkennen ist und deshalb in der Darstellung fehlt.

A) Aktin-Bindungsstelle AKTININ_1:

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Grundmuster möglicher notwendiger AS	E/ Q			A/ T/ V	F/ Y			W		N
AS die häufig vorkommen		L/ N/ Y/ H				L/ D/ A/ M	T		P/ G	
α-Aktinin LT										
AKTININ_1 36	Q	K	K	T	F	T	A	W	C	N

B) Aktin-Bindungsstelle AKTININ_2

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Grundmuster möglicher notwendiger AS	L/ I/ V/ M		S/ G/ N/ L	L/ I/ V/ M/ N	D/ A/ G/ H/ E/ N/ R/ S	S/ A/ G/ P/ N/ V/ T		D/ N/ E/ A/ G	L/ I/ V/ M		D/ E/ A/ G/ Q
α-Aktinin LT											
AKTININ_2 110	L	V	S	I	G	S	E	E	I	V	D

C) EF-Hand Motiv:

EF-Loop Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Koordinierter Ligand	X		Y		Z		-Y		-X			-Z
Kanonische Sequenz	D	K	D	G	D	G	T	I	D	F	E	E
Häufigkeit	100%	29%	76%	56%	52%	96%	23%	68%	32%	23%	29%	92%
AS die häufig vorkommen		A/ Q/ T/ V/ J/ S/ E/ R	N	K/ R/ N	N/ S		F/ K/ Q/ Y/ E/ R	V/ L	S/ T/ E/ N/ G/ Q	Y/ A/ T/ L/ E/ K	R/ K/ A/ P/ N	D
α-Aktinin LT												
EF I 761	D	K	S	R	T	R	R	L	E	P	K	D
EF II 795	D	P	N	N	F	G	F	V	T	F	E	A
EF III 824	D	N	D	T	A	E	Q	V	M	Q	S	F

Tabelle 6: A) bis C) Der Vergleich der α -Aktinin-Sequenz vom *L. terrestris* (LT) mit den Sequenzen konservierter Domänen. A) und B) Die Aktin-Bindungsstellen Aktinin_1 und Aktinin_2 der Calponin-Domänen (Prosite: PS00019 und PS00020) und C) die EF-Hand-Motive der Calmodulin-Domäne. Positionen der konservierten Sequenzen, an denen keine Aminosäuren angegeben sind, können mit beliebigen Aminosäuren besetzt sein. Die für die koordinative Bindung der Calcium Ionen entscheidenden Positionen der Liganden in dem Loop der EF-Hände werden mit X; Y; Z; -Y; -X und -Z beschrieben (Gifford *et al.*, 2007) und sind hier grau unterlegt. Die Liganden, die Ca^{2+} koordinativ binden sind fett gedruckt, sowohl in der kanonischen Sequenz (Gifford *et al.*, 2007), als auch in den EF-Händen der α -Aktinin-Sequenz vom *L. terrestris*. Die Häufigkeit bezieht sich auf die Aminosäuren der kanonischen Sequenz im Vergleich zu weiteren Ca^{2+} bindenden EF-Hand-Domänen. Die hierin vorkommenden alternativen Aminosäuren sind in der Zeile darunter dargestellt.

Bei *D. melanogaster* werden verschiedene α -Aktinin-Sequenzen angegeben, die auf Spleiß-Varianten eines Gens beruhen. Sie unterscheiden sich in der Neck-Region, die sich vom N-Terminus gesehen zwischen der zweiten Calmodulin-Domäne und dem ersten Spektrin-Repeat befindet.

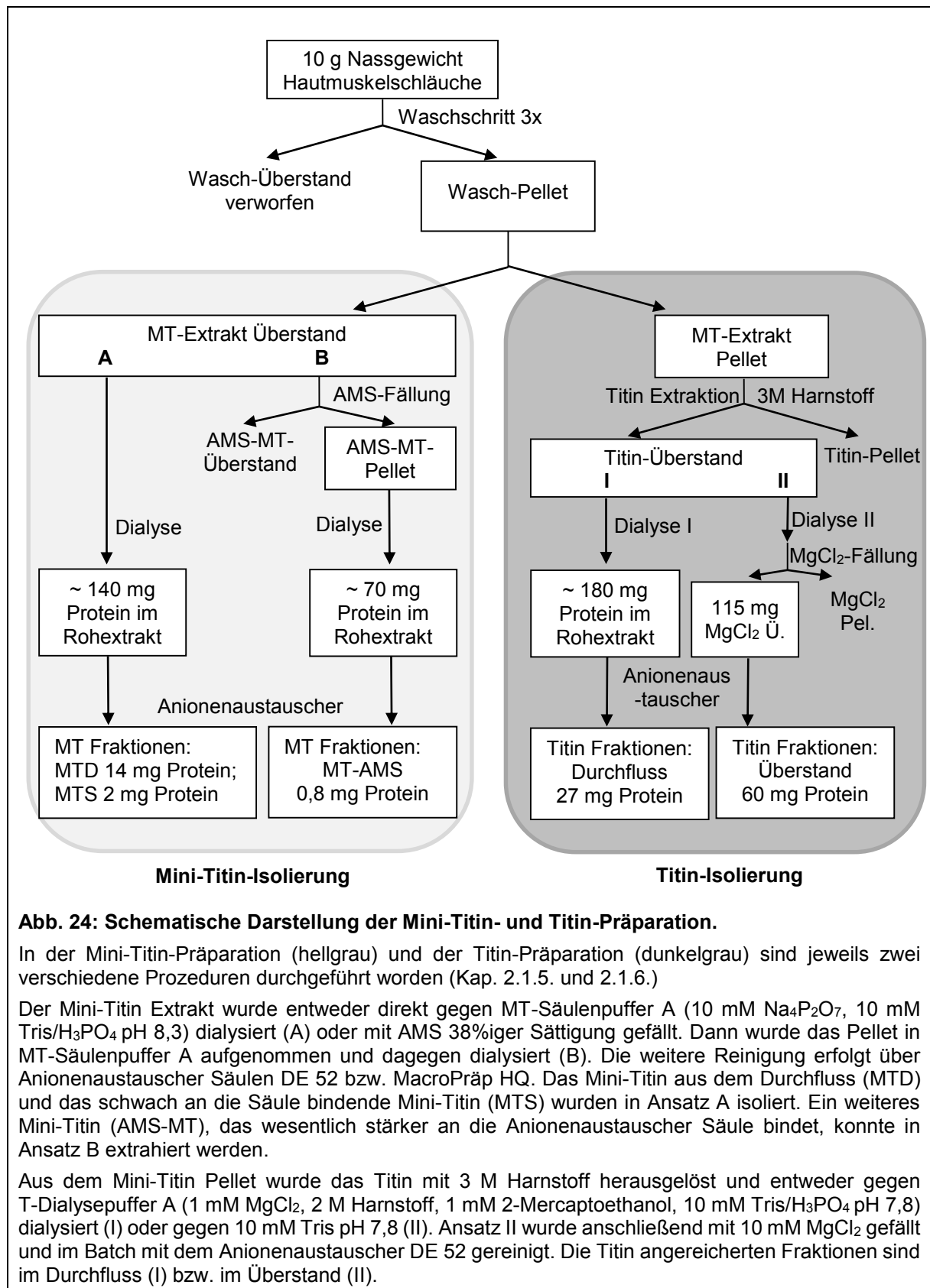
Derartige Spleiß-Varianten des α -Aktinins von *L. terrestris* konnten nicht nachgewiesen werden. Die mit spezifischen Primern synthetisierten Reamplifikate aus der muskelspezifischen Genbank bzw. der cDNA, die aus der mRNA des Hautmuskelschlauchs gewonnen wurde, lieferten wiederholt die angegebene Sequenz der Neck-Region. Ein weiterer Versuch die Sequenz der gesamten Neck-Region inklusiv u. U. vorhandener Introns aus der DNA zu erhalten, ergab nur die bekannte Sequenz.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass zumindest im Hautmuskelschlauch lediglich eine α -Aktinin-Variante bezüglich der Neck-Region vorhanden ist, da sowohl die Genbank als auch die cDNA muskelspezifisch sind. In den UTRs wurden keine Sequenz-Unterschiede gefunden, sodass auch diese Beobachtung keinen Hinweis für das Vorhandensein mehrerer α -Aktinin-Gene lieferte. Ob in Nicht-Muskelgeweben weitere α -Aktinin-Varianten vorkommen kann nicht abschließend beantwortet werden.

3.4 Isolierung titinartiger Proteine

Diese Isolierung titinartiger Proteine mit Natriumphosphat lehnte sich an die Präparation hochmolekularer Proteine aus *Locusta migratoria* von Ziegler *et al.* (1990) an und ist von Lange und D'Haese (1994) und Soika (1995) für die Isolierung aus den Hautmuskelschläuchen von *L. terrestris* beschrieben worden. Kriterien für die Titinartigkeit waren zunächst hohe Molekularmassen und eine fädige Struktur der Proteine. Der modulare Aufbau, den die Vertebraten Titinen im A-Banden assoziierten Teil besitzen, ist für die I-Banden assoziierten Titine der Evertrebraten nicht charakteristisch (vgl. Einleitung). Die große Variationsbreite in den Titin-Sequenzen der Evertrebraten erschwert eine Charakterisierung. Lediglich Immunglobulin-Domänen und unikale Titin-Sequenzen, für die aber kein bekanntes Muster beschrieben ist, sind in allen Titin-Sequenzen enthalten (Abb. 5).

Deshalb wurden die vom *L. terrestris* isolierten Proteine dann als titinartig bezeichnet, wenn ihre Molekularmassen über 500 kDa lagen und damit deutlich über denen des Myosins. Es ließen sich zwei Größenbereiche unterscheiden, zum einen Banden die in niedrigprozentigen SDS-Gelen kaum in die Matrix einliefen, diese werden Titine genannt. Solche, die Banden zwischen diesen Titinen und dem Myosin aufwiesen, mit Molekularmassen um 1000 kDa, werden als Mini-Titine bezeichnet.



3.4.1 Die Isolierung von Mini-Titinen

Zur Isolierung von Mini-Titin wurden in den Waschschritten zunächst die löslichen Zellbestandteile entfernt. Der hierzu verwendete MT-Waschpuffer (Kap. 2.1.5) entspricht den ionischen Verhältnissen in den Hautmuskelschlauch-Zellen. Zum Aufschluss der Zellen war das Detergenz Triton X-100 enthalten.

Im Überstand nach dem zweiten Waschschriff waren fast keine Proteine enthalten (Abb. 26 c), was darauf hinwies, dass der überwiegende Teil der löslichen Bestandteile mit dem ersten Reinigungsschritt entfernt, und keine weiteren Proteine herausgelöst wurden. Das Pellet (Abb. 26 b) enthielt neben den typischen Muskel-Proteinen die hochmolekularen Proteine.

Das Natriumpyrophosphat im MT-Extraktionspuffer (Ziegler *et al.*, 1990) ermöglichte die Anreicherung des Mini-Titins im Extrakt (Abb. 26 e). Neben Mini-Titin wurden noch weitere Proteine aus dem gewaschenen Homogenat herausgelöst, so waren Aktin, α -Aktinin, Paramyosin und Myosin ebenfalls im Überstand enthalten. Das Titin konnte durch das Natriumpyrophosphat nicht extrahiert werden.

Der Proteinanteil des Extrakts betrug ca. 140 mg pro 10 g des Nassgewichts der Hautmuskelschläuche. Der Extrakt ließ sich nicht steril filtrieren, da die Poren der Filtermembran verstopften. Die Vorreinigung des Extraktes für die Säule erfolgte deshalb durch Zentrifugation und Filtration durch Glaswolle.

Die Anionenaustauscher Säulen DE52 bzw. MacroPräp HQ ermöglichten eine weitgehende Trennung der einzelnen Proteine (Abb. 25). Die nicht Ammoniumsulfat gefällten Ansätze (Abb. 24 A), lieferten im Durchfluss eine mit Mini-Titin angereicherte Fraktion, im Folgenden als MTD bezeichnet, wobei die Verunreinigung zu Beginn des Durchflusses größer war als zum Ende (Abb. 26 f, g).

Mit ca. 45 mM NaCl wurde eine weitere Mini-Titin-Fraktion von der Säule gelöst, im Folgenden als MTS bezeichnet. Diese Fraktion war weitgehend sauber und enthielt nur noch ein weiteres hochmolekulares Protein, welches eine molare Masse von ca. 700 kDa besaß. Mit steigender Salzkonzentration wurden alle weiteren Proteine eluiert (Abb. 25 und Abb. 26 i-m).

Die Ausbeute an Mini-Titin im Durchfluss (MTD) betrug ca. 14 mg und die, des Mini-Titins (MTS), das an die Säule band, 2 mg pro 10 g Nassgewicht.

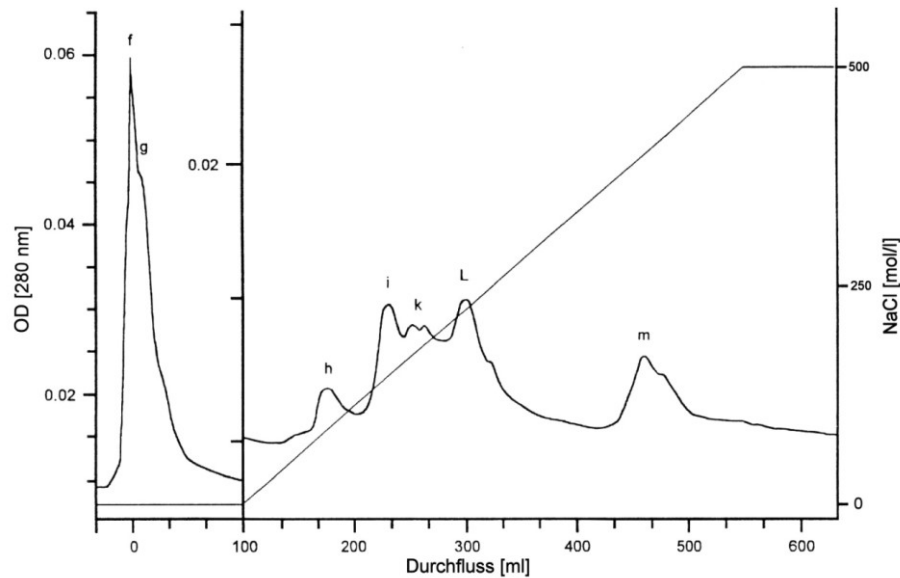


Abb. 25: Elutionsprofil der Reinigung des Mini-Titin Extraktes.

Für die Säulenchromatographie wurde eine DE 52 Säule (1,4 cm x 48 cm) verwendet, die mit MT-Säulenpuffer A (10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 10 mM Tris/ H_3PO_4 pH 8,3) equilibriert war. Die Flussrate betrug 30 ml/h. Nach Auftragen des Extraktes wurden zwei Säulenvolumen Puffer A nachgespült, gefolgt von einem NaCl-Gradienten (0 - 500 mM NaCl), der fünffaches Säulenvolumen hatte. Mini-Titin war im Durchfluss (f, g) und in dem ersten, mit dem Gradienten eluierten Peak (h) enthalten. Weitere Fraktionen (i), (k), (l), (m) (Abb. 26), die mit dem NaCl-Gradienten eluierten.

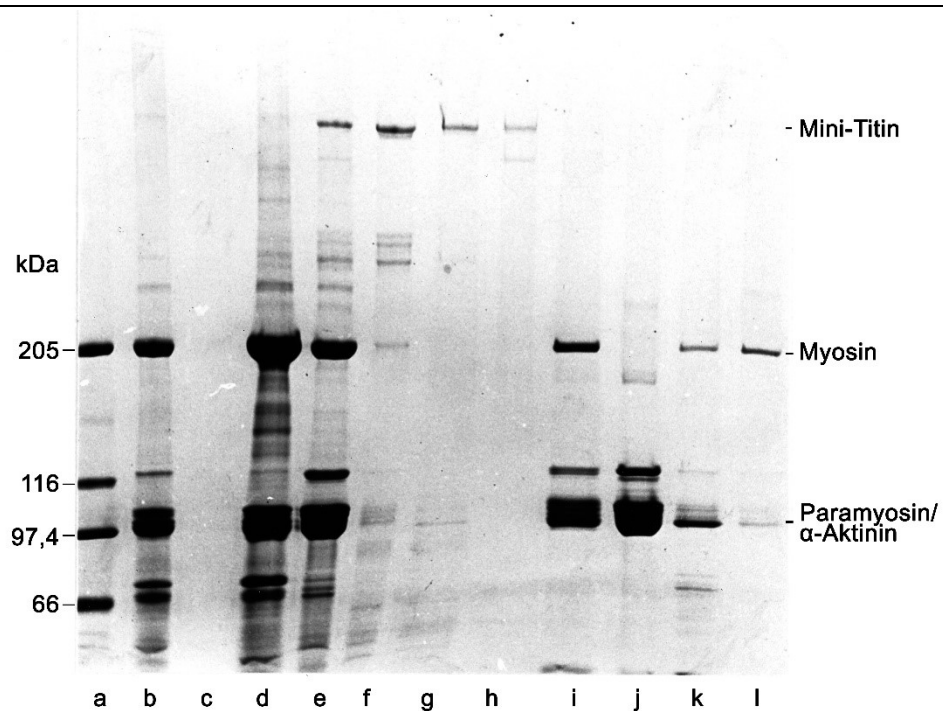


Abb. 26: Isolierung von Mini-Titin aus Hautmuskelschläuchen von *L. terrestris*.

Standard (a); Pellet des Waschschrittes (b); Überstand des Waschschrittes (c); Pellet des Extraktes (d); Der nach der Dialyse auf die Säule aufgetragene Extrakt (e); Fraktionen der DE52 Säulenchromatographie Abb. 25 (f) - (m). 2 - 10%ige SDS-PAGE. (Soika 1995)

Der Versuch, MTD und MTS durch Fällung mit AMS bei 80%iger Sättigung zu konzentrieren, scheiterte daran, dass dieses AMS-Pellet nicht mehr zu lösen war. Die in der Präparation erreichten Konzentrationen betrugen für das MTD ~0,4 mg/ml (ohne Verunreinigungen) und für das MTS ~0,15 mg/ml. Mit den Ultrafiltrationseinheiten Vivaspin® ließen sich die Proben konzentrieren.

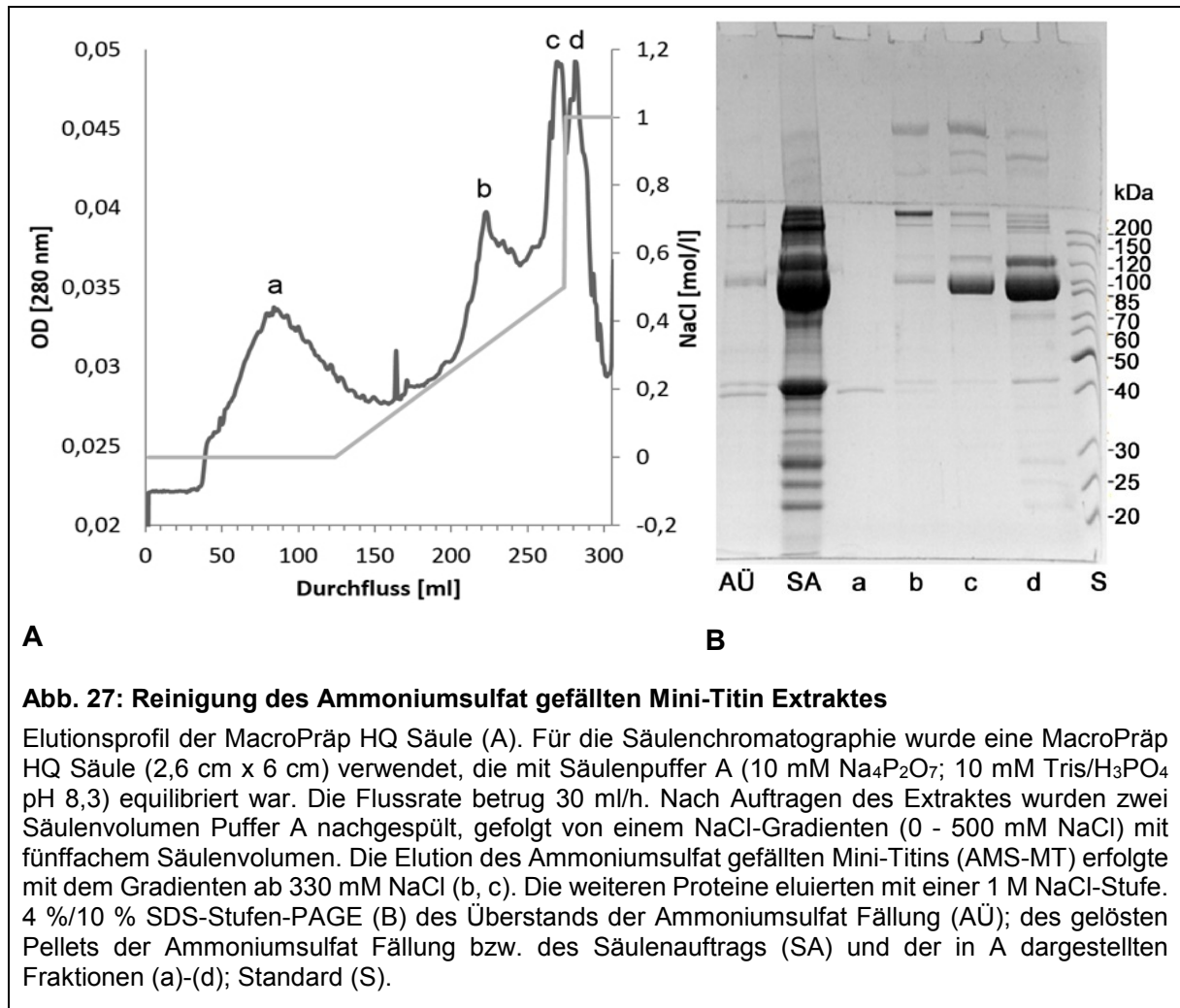
Im Gegensatz dazu wurden in den SDS-Proben der α -Aktinin-Präparation hochmolekulare Proteine nach der AMS-Fällung beobachtet. Es stellte sich die Frage, ob eine bessere Reinigung und einfache Konzentrierung der titinartigen Proteine durch eine Fällung mit AMS bei 38%iger Sättigung möglich ist.

Zur Klärung wurde die MT-Isolierung durch eine solche AMS-Fällung des Extrakts ergänzt (Abb. 24 B). Das AMS-Pellet wurde dazu in MT-Säulenpuffer A (10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 10 mM Tris/ H_3PO_4 pH 8,3) aufgenommen, dagegen dialysiert und zur Isolierung des Mini-Titins verwendet.

In den AMS gefällten Ansätzen war die Ausbeute erwartungsgemäß geringer, lediglich 75 mg pro 10 g Nassgewicht konnten auf die Säule aufgetragen werden. Der Anteil der hochmolekularen Mini-Titin Bande im Säulenauftrag war allerdings gering, den größten Anteil lieferte ein Protein mit einer Bande um 100 kDa, α -Aktinin oder Paramyosin (Abb. 27 SA).

Im Gegensatz zu der ursprünglichen Mini-Titin-Präparation (Abb. 26 A) erschien das AMS gefällte Mini-Titin (AMS-MT) nicht mehr im Durchfluss sondern eluierte bei deutlich höherer Salzkonzentration ab 330 mM NaCl. Die Ausbeute des AMS gefällten Mini-Titins (Abb. 27 b-c) betrug ohne Verunreinigungen 0,8 mg bezogen auf 10 g Nassgewicht der Hautmuskelschläuche, insgesamt konnten 1,5 mg isoliert werden. Wobei die jeweiligen Fraktionen noch zu 80% verunreinigt waren. Die geringe Ausbeute des AMS-MT und die erheblichen Verunreinigungen zeigen, dass diese Präparation nicht ausreichend optimiert ist. Ein weiterer Grund für die geringe Ausbeute könnte sein, dass es sich bei dem als AMS-MT bezeichneten Protein um ein Fragment eines hochmolekularen Titins handelt, das in geringer Menge vorhanden ist.

Dennoch handelt es sich bei dem hier isolierten Protein um ein weiteres titinartiges Protein, das sich in mindestens zwei Eigenschaften von den vorher beschriebenen Mini-Titinen (MTD und MTS) unterschied. Zum einen konnte das AMS-MT mit Ammoniumsulfat gefällt und das Pellet dann wieder gelöst werden und zum anderen band es an die Anionenaustauscher Säule und eluierte erst ab 330 mM NaCl. Dieses AMS-MT entsprach der hochmolekularen Bande, die auch in der α -Aktinin-Präparation beobachtet wurde. Diese Präparation ermöglichte somit die Anreicherung eines weiteren hochmolekularen Proteins oder Proteinfragments.



3.4.2 Die Isolierung von Titin

Die Extraktion des Titins erfolgte mit 3 M Harnstoff aus dem Pellet des Mini-Titin-Extraktionsschrittes (Kap. 2.1.6 / Abb. 24). Somit entsprachen die Homogenisations- und Waschschrte denen der Mini-Titin-Isolierung. Die Extraktion des Mini-Titins kann als weiterer Reinigungsvorgang betrachtet werden, da hier eine Reihe verunreinigender Proteine entfernt wurden, aber das Titin im Pellet erhalten blieb.

Um aus dem Titin-Extrakt das Natriumpyrophosphat zu entfernen, wurde dieser gegen eine 2 M Harnstoff-Lösung dialysiert. Hierbei fiel ein Teil des Myosins und Paramyosin aus.

In der SDS-PAGE waren im Bereich des Titins bis zu vier Banden sichtbar (Abb. 29), wobei sich die zweite und dritte Bande von oben nicht immer sauber trennen ließen.

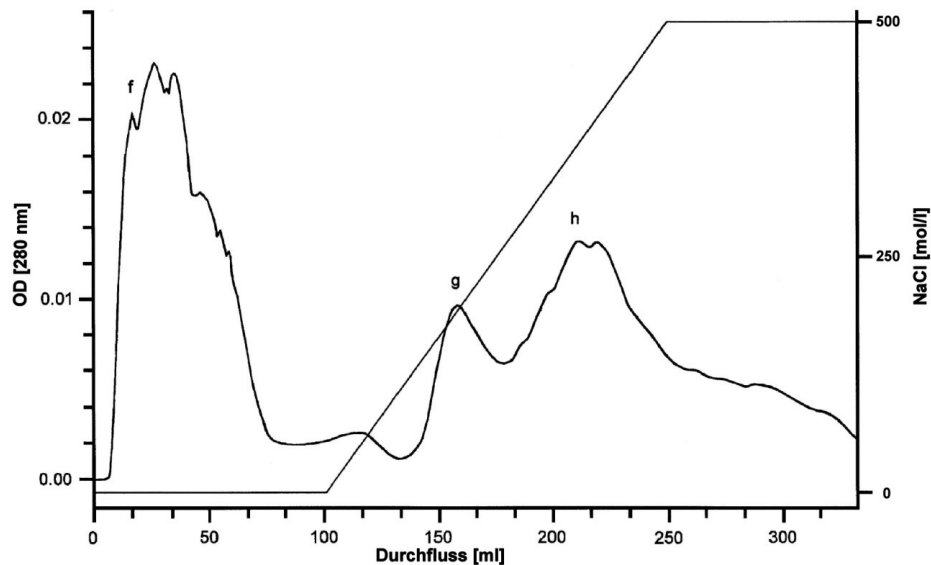


Abb. 28: Elutionsprofil der Reinigung des Titin-Extraktes.

Für die Säulenchromatographie wurde eine DE 52 Säule (2,8 cm x 7,5 cm) verwendet, die mit T-Puffer A (2 M Harnstoff; 10 mM Tris/H₃PO₄ pH 7,8) equilibriert war. Die Flussrate betrug 20 ml/h. Nach Auftragen des Extraktes wurden zwei Säulenvolumen T-Puffer A nachgespült, gefolgt von einem Phosphat-Gradienten (10 - 200 mM NaH₂PO₄), der vierfaches Säulenvolumen hatte. Titin war im Durchfluss enthalten. Durchfluss (f); mit dem Gradienten eluierte Fraktionen (g), (h)

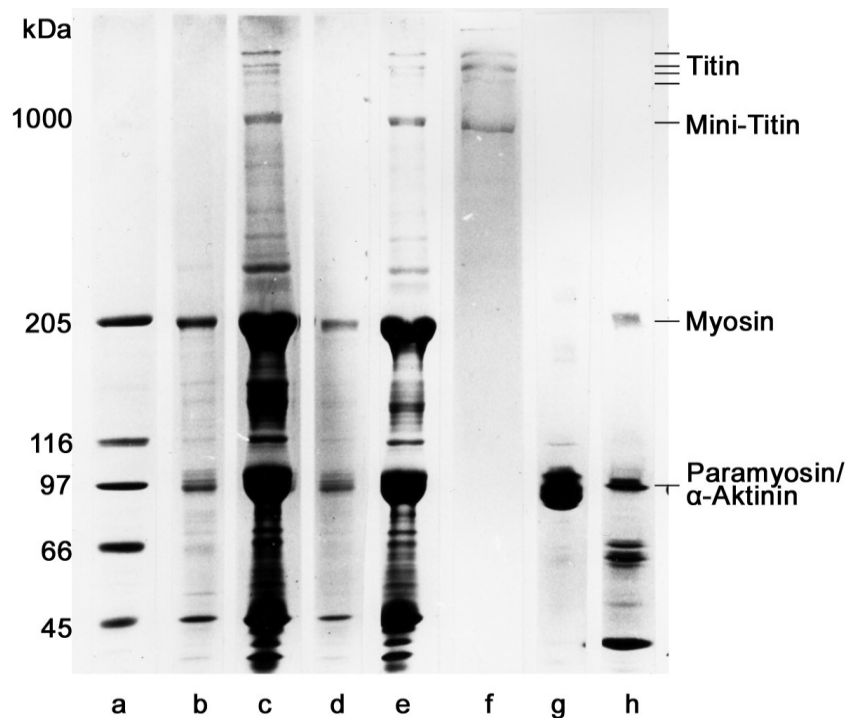


Abb. 29: Isolierung von Titin aus Hautmuskelschläuchen von *L. terrestris*

Das Titin wurde mit 3 M Harnstoff aus dem Pellet der Mini-Titin-Extraktion herausgelöst. Die Isolierungsschritte sind in einer 2 - 10%igen Gradienten-SDS-PAGE dargestellt. Standard (a); Pellet der Harnstoff-Extraktion (b); Überstand der Harnstoff-Extraktion (c); Pellet nach der Dialyse (d); auf die Säule aufgetragener Überstand nach der Dialyse (e); Durchfluss der DE 52 Säule (Abb. 28) mit Titin (f); Fraktionen der DE 52 Säule (Abb. 28) (g) und (h); (Soika 1995).

Das Titin band nicht an den Anionenaustauscher DE 52 und erschien mit einer Verunreinigung von Mini-Titin im Durchfluss. Die weiteren Proteine waren an die Säule gebunden und wurden mit dem Gradienten eluiert (Abb. 28). Es war schwierig, größere Mengen des Hautmuskelschlauch-Extraktes auf die Säule aufzutragen. Bei hohen Proteinkonzentrationen des Extraktes verstopfte die Säule schnell.

Der Durchfluss enthielt, bezogen auf 10 g Nassgewicht der Hautmuskelschläuche, 27 mg Proteine, überwiegend Titin und Mini-Titin, wobei die ersten Fraktionen die größte Reinheit aufwiesen (Abb. 29 f).

Ein Nachteil der Harnstoffextraktion war die Denaturierung der Proteine. Um den Harnstoff nach der Säulenchromatographie zu entfernen, wurden die Fraktionen, die Titin enthielten, gegen 30 mM Tris/H₃PO₄ pH 7,8 dialysiert. Das so präparierte Titin wurde bei 4 °C gelagert.

Ziel des weiteren Ansatzes (Abb. 24 II) war es die Ausbeute zu steigern und das Problem der verstopfenden Säule bei hohen Proteinkonzentrationen des Titin-Extraktes zu lösen. Da mit der Harnstoff-Extraktion ein großer Teil der Muskel-Proteine gelöst wurden (Abb. 30 TEÜ), wurde angestrebt, möglichst viel an Aktin, Myosin und Paramyosin vor dem Säulenauftrag zu entfernen. Hierzu wurde der Überstand der Titin-Extraktion über Nacht zweimal gegen zehnfaches Volumen 10 mM Tris pH 7,8 dialysiert. Das Dialysat war „quarkig“, Proteine waren deutlich sichtbar ausgefallen. Entsprechend der α -Aktinin-Präparation, in der hochmolekulare Proteine auch nach der MgCl₂-Fällung im Überstand beobachtet wurden, wurde hier die verunreinigenden Proteine aus dem Dialysat mit 10 mM MgCl₂ (Endkonzentration) gefällt. In dem Überstand der folgenden Zentrifugation war Titin angereichert, er enthielt 60 mg Protein pro 10 g Nassgewicht mit einer Konzentration von 1,2 mg/ml. Die MgCl₂-Fällung war ein einfacher und effektiver Reinigungsschritt der einen großen Teil der Verunreinigungen entfernte, wobei allerdings auch ein Teil des Titins mit sedimentierte.

Durch die weitere Reinigung im Batch wurde ein Verstopfen der Säule bei höheren Titin-Konzentrationen vermieden. Der Überstand hatte eine Konzentration von 0,7 mg/ml und enthielt insgesamt 30 mg Protein bezogen auf 10 g Nassgewicht. Durch die Bestimmung der relativen Intensitäten der Banden (UN-SCAN-IT) wurden die Verunreinigungen mit ca. 50 % abgeschätzt, sodass die Ausbeute 15 mg pro 10 g Nassgewicht der Hautmuskelschläuche entsprach.

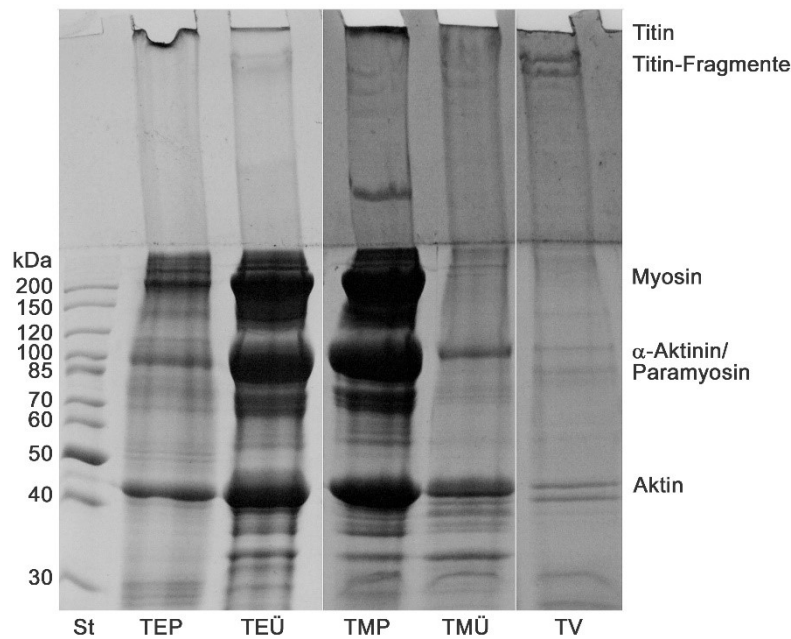


Abb. 30: Reinigung des Titin Extraktes durch MgCl_2 -Fällung

Pellet (TEP) und Überstand (TEÜ) der Titin-Extraktion. Der Harnstoff-Extrakt Überstand wurde über Nacht zweimal gegen 10 mM Tris pH 7,8 mit zehnfachem Volumen dialysiert und dann mit 10 mM MgCl_2 (Endkonzentration) gefällt, Pellet (TMP) und Überstand (TNÜ) der MgCl_2 -Fällung.

Die Titin-Banden sind in den in den Taschen des 4%/10%-Stufen Gels zu erkennen. Um zu zeigen, dass auch nach der MgCl_2 -Fällung Titin im Überstand enthalten war, wurde dieser mit Chymotrypsin verdaut (TV) und lieferte dann deutliche hochmolekulare Banden.

3.4.3 Mit dem α -Aktinin isolierte 170/185 kDa Proteine

In den SDS-Proben der α -Aktinin-Präparation war wiederholt eine Doppelbande im Bereich von 170 kDa und 185 kDa zu beobachten, die als Verunreinigung auftrat und bei der Reinigung des α -Aktinins mit der Mono Q Säule kurz vor dem α -Aktinin eluierte. Diese Fraktion enthielt neben den 170 kDa und 185 kDa Proteinen auch hochmolekulare Proteine die dem AMS-MT entsprechen (Abb. 14 b). Mit Hilfe der MS-Analysen (Kap. 2.2.7) konnte gezeigt werden, dass die 170 kDa und 185 kDa Banden Proteine bzw. Proteinfragmente mit titinartigen Sequenzen darstellen.

3.5 Charakterisierung titinartiger Proteine

3.5.1 Abschätzung der molekularen Massen

Die molekularen Massen der titinartigen Proteine aus der schräggestreiften Muskulatur von *L. terrestris* wurden durch Bestimmung der relativen Mobilitäten in 2 - 10%igen SDS-Gelen abgeschätzt (vgl. Kap. 2.2.6). Wobei ein halblogarithmischer Zusammenhang zwischen der relativen Mobilität in den SDS-Gelen und der molekularen Masse angenommen wurde.

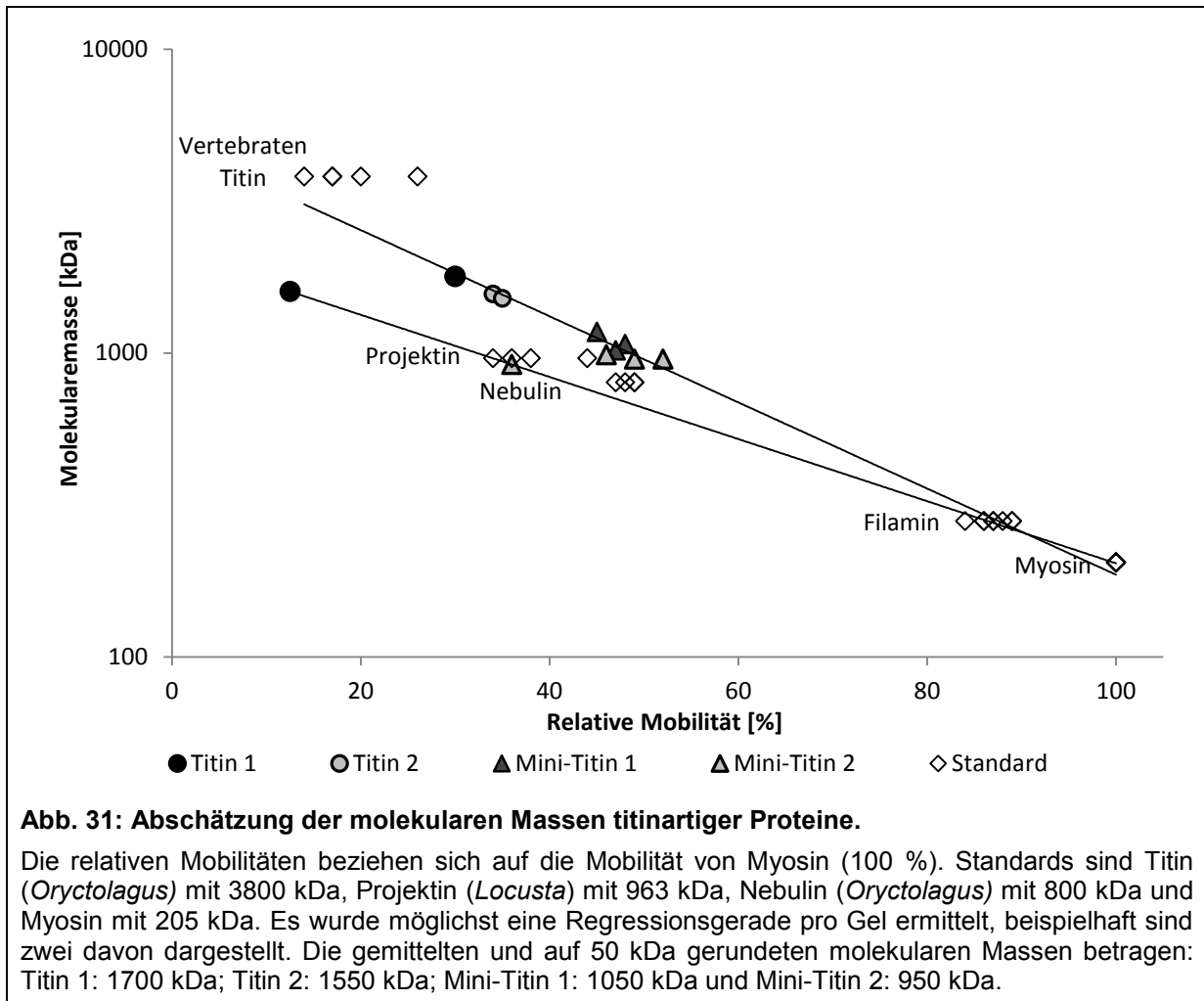
Erste Beobachtungen zeigten, dass das Kaninchen Titin die geringste Mobilität besaß und damit die höchste Molekularmasse (3816 kDa) der hier dargestellten Proteine (Abb. 31).

In den SDS-Gelen zeigten die *L. terrestris* Titine drei (Abb. 29 f) und teilweise auch vier Banden (Abb. 29 c), hier werden der Übersicht halber nur die oberen zwei Banden (Titin 1 und 2) betrachtet. Diese Titine des *L. terrestris* drangen weiter in die Gele ein, aber nicht so weit wie das *Locusta migratoria* Projektin (963 kDa). Somit liegen die molekularen Massen der *L. terrestris* Titine zwischen 3800 kDa und 1000 kDa.

Die mit Phyrophosphat isolierten Mini-Titine aus dem Hautmuskelschlauch zeigten in gut trennenden Gelen eine Doppelbande (Mini-Titin1, MT1 und Mini-Titin 2, MT2). Die Mobilität dieser Doppelbande lag im Bereich des Projektins, war geringer als die des Nebulins (800 kDa) und höherer als die des Kaninchen Titins und der *L. terrestris* Titine. Somit war für die Mini-Titine eine molekulare Masse im Bereich von 1000 kDa zu erwarten.

Die relativen Mobilitäten wurden aus sechs Gele bestimmt. Wobei Unterschiede in den Gradienten-Gele dazu führten, dass gleichen Banden unterschiedliche relative Mobilitäten zugeordnet wurden. Um Fehler zu minimieren wurde pro Gel möglichst eine Regressionsgerade ermittelt, beispielhaft sind in Abb. 31 zwei Regressionsgeraden dargestellt. Mit Hilfe der jeweiligen Regressionsgeraden wurden die Molekularmassen abgeschätzt. Die gemittelten und auf 50 kDa gerundeten Werte betrugen für das Titin 1 1700 kDa und für das Titin 2 1550 kDa. Dem Mini-Titin 1 (MT1) konnte ein Wert von 1100 kDa zugeordnet werden und dem Mini-Titin 2 (MT2) einer von 950 kDa. Die aus sechs verschiedenen Gelen ermittelten Werte wiesen eine Streuung von bis zu 5 % auf.

Die molekularen Massen der mit Ammoniumsulfat gefällten Mini-Titine (AMS-MT; Abb. 24 B) wurden in diesem Ansatz nicht untersucht. Der Vergleich der AMS-MT und der mit Phyrophosphat isolierten Mini-Titine zeigte, dass jeweils eine Bande des AMS-MT unterhalb und oberhalb der anderen lag (Abb. 35). Deshalb sind die molekularen Massen der AMS-MT kleiner als 950 kDa, es werden ca. 900 kDa angenommen, und größer als 1100 kDa.



3.5.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Im elektronenmikroskopischen Bild liefern titinartige Proteine lange fädige Strukturen. Für das Titin und die Mini-Titine MTD und MTS aus dem *L. terrestris* konnten solche Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 32/ Abb. 33).

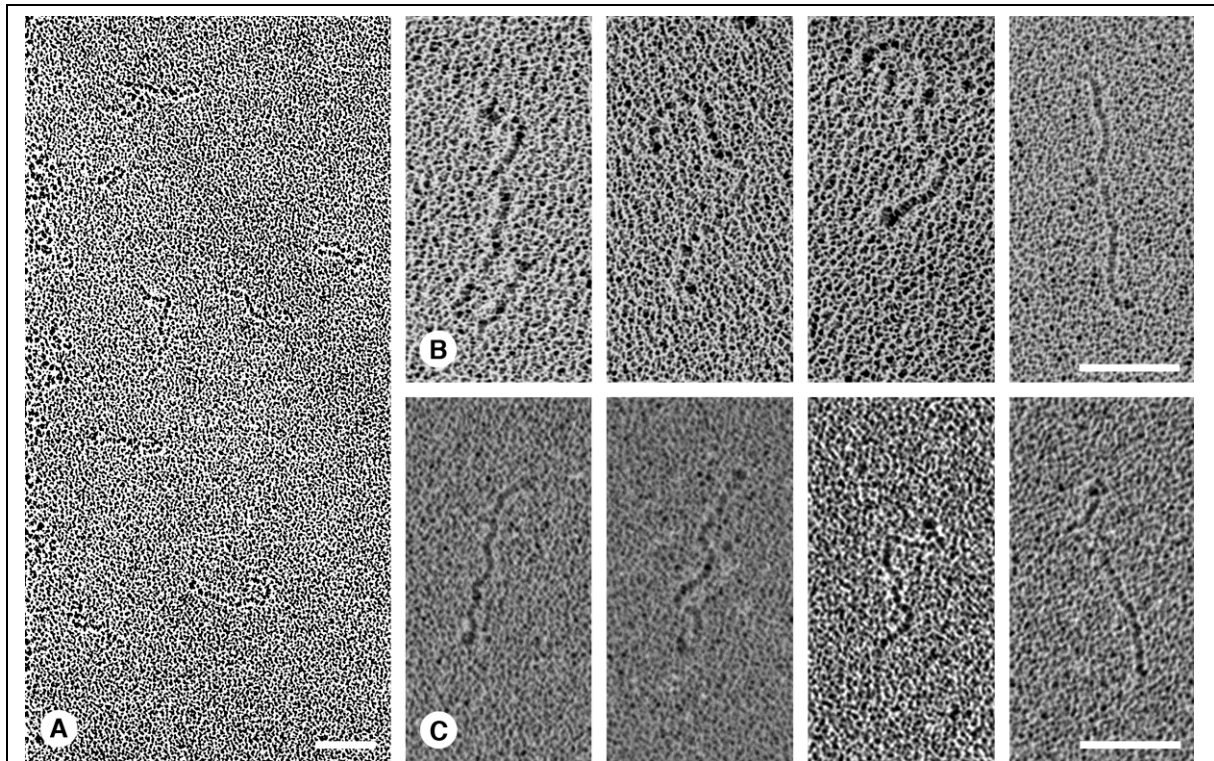
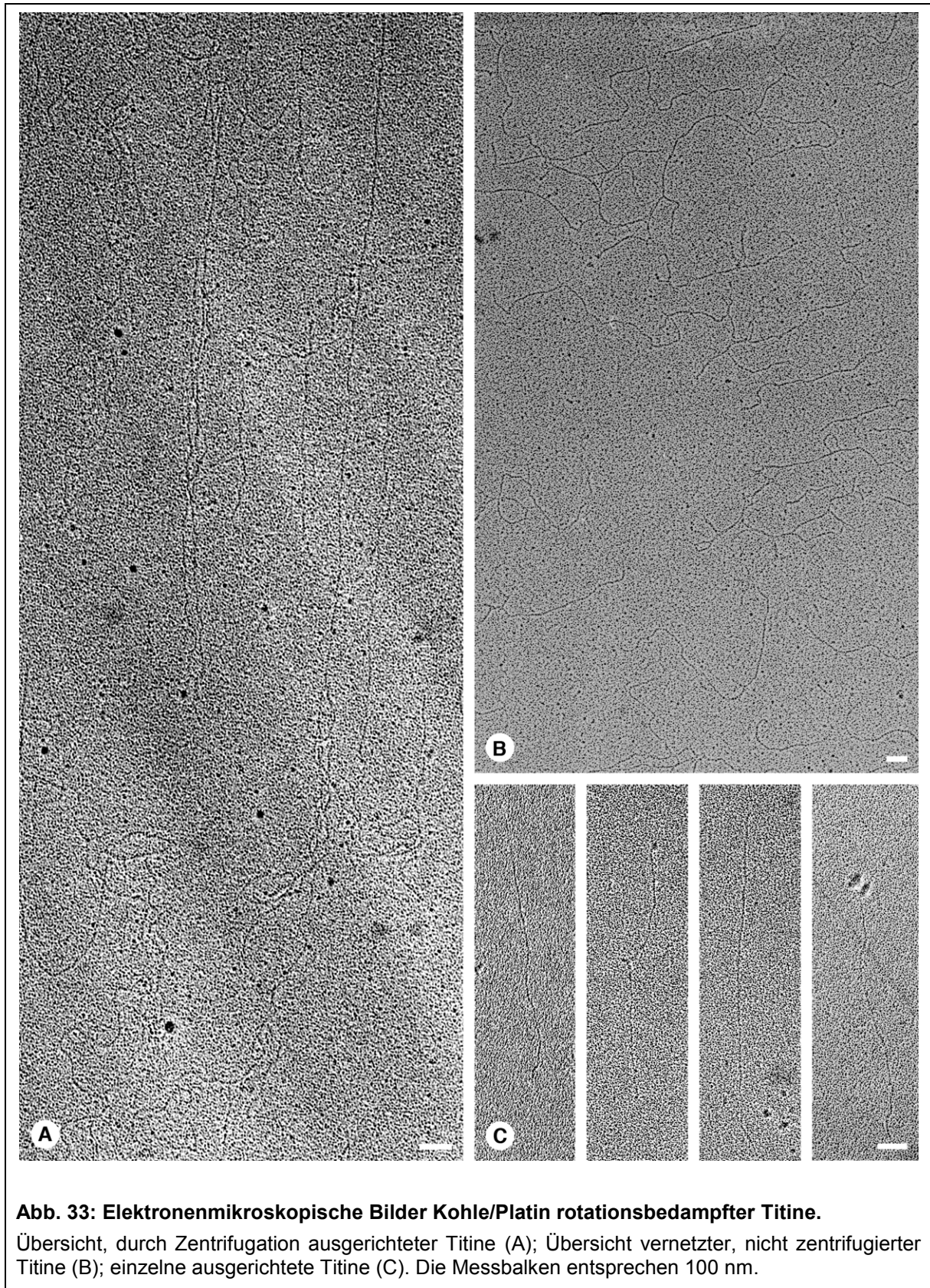


Abb. 32: Elektronenmikroskopische Bilder Kohle/Platin rotationsbedampfter Mini-Titine.

Mini-Titine des Durchflusses (MTD) in der Übersicht (A) und einzelne Moleküle (B). Einzelne an die DE 52-Säule gebundene Mini-Titine (MTS) (C). Die Messbalken entsprechen 100 nm.

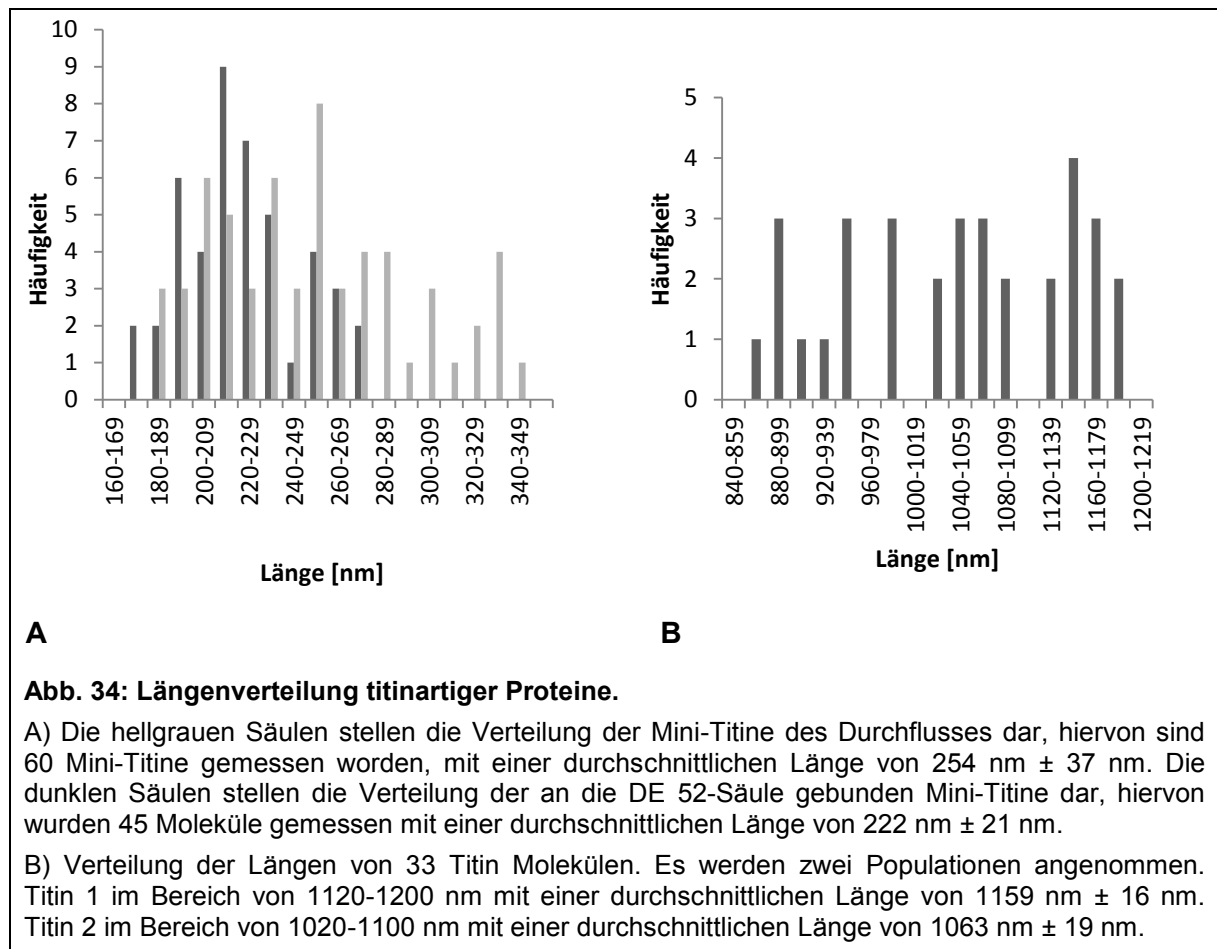
Zur genaueren Charakterisierung der titinartigen Proteine wurden deren Längen bestimmt. Hierzu wurden 105 Mini-Titine vermessen, wobei 60 aus dem Durchfluss stammten und 45 aus der an die Säule gebundenen Fraktion (Abb. 32 und Abb. 34 A). Bei den Mini-Titinen des Durchflusses (MTD) lagen die gemessenen Längen im Bereich von 180 nm bis 350 nm mit einer durchschnittlichen Länge von $254 \text{ nm} \pm 37 \text{ nm}$. Die Längen der an die Säule gebundenen Mini-Titine (MTS) lagen in einem Bereich von 170 nm bis 280 nm, die durchschnittliche Länge betrug $222 \text{ nm} \pm 21 \text{ nm}$. Insgesamt waren die Mini-Titine des Durchflusses länger als die an die Säule gebundenen. Unter der Annahme, dass das längere Mini-Titin das vollständige Molekül und das kürzere ein Fragment ist, wäre die Differenz von 30 nm die Länge des fehlenden Stücks.

Eine Schwierigkeit der Längenbestimmung der Titine bestand darin, die Titine als einzelne Fäden darzustellen. In vielen Fällen lagen die Moleküle überlagert vor (Abb. 33 B).



Es wurden 33 Titine vermessen. Diese wiesen eine sehr breite Streuung der Längen auf, die zwischen 840 nm und 1250 nm lagen. Die verwendeten Titin-Fractionen konnten in der SDS-

Elektrophorese in drei bis vier Banden aufgetrennt werden. Aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte lassen sich aber keine vier Populationen erkennen. Lediglich zwei Populationen mit durchschnittlichen Längen von ca. 1160 nm und 1060 nm deuten sich an (Abb. 34 B). In dem Bereich von 840 nm bis 1020 nm waren keine weiteren Populationen zu differenzieren.



Unter der Annahme, dass Titine aus sich wiederholenden Einheiten aufgebaut sind, sollte das Verhältnis Masse pro Länge konstant sein. Der Quotient aus der molekularen Masse und den durchschnittlichen Längen müsste demnach, bei Titinen ähnlichen Aufbaus wie z. B. Fragmenten oder Isoformen, die gleiche Größe aufweisen. Erhebliche Abweichungen des Quotienten weisen auf unterschiedliche Strukturen der Proteine hin, Quotienten gleicher Größe legen einen gleichartigen Aufbau nahe.

Die Titine 1 und 2 weisen Quotienten von $1,5 \text{ kDa/nm}$ auf und die Mini-Titine 1 und 2, beide sowohl aus MTD als auch MTS gewonnen, einen von $4,4 \text{ kDa/nm}$ bzw. $4,3 \text{ kDa/nm}$ (Tabelle 7). Innerhalb jeder Gruppe liegen die Werte in einer Größenordnung, die Werte der Titine weichen aber deutlich von denen der Mini-Titine ab. Den modularen, weitgehend gleichartigen Aufbau der Titine angenommen, zeigt der Unterschied in dem Masse/Längen-Quotienten die

Verschiedenartigkeit der Titine und Mini-Titine. Diese Unterschiede müssten strukturell bedingt sein und legen nahe, dass es sich bei diesen Mini-Titinen (MTD/ MTS bzw. 1 und 2) nicht um Fragmente des Titins handelt, da sie die dreifache Masse pro Länge besitzen.

Protein	Molekularmasse in kDa	Länge in nm	Quotient in kDa/nm
Titin 1	1700	1160	1,5
Titin 2	1550	1060	1,5
Mini-Titin 1	1100	250	4,4
Mini-Titin 2	950	220	4,3

Tabelle 7: Zusammenstellung der Molmassen, Längen und der sich daraus ergebenden Quotienten der hochmolekularen Proteine von *L. terrestris*. Die Mini-Titine 1 und 2 entsprechen den durch Längenmessung ermittelten Populationen aus MTD und MTS.

Wird für die dargestellten hochmolekularen Proteine eine stabförmige Struktur mit einem kreisförmigen Querschnitt angenommen, müsste bei einer annähernd konstanten Massenverteilung der Aminosäuren in der Primärstruktur der Durchmesser und damit die Breite des Mini-Titins um das 1,7 fache größer sein als die des Titins. Abschätzungen anhand der elektronenmikroskopischen Bilder bestätigen die größere Breite der Mini-Titine.

Nicht geklärt werden konnte, ob das Titin 2 ein Fragment des Titin 1 bzw. das Mini-Titin 2 ein Fragment des Mini-Titin 1 ist, oder ob Isoformen vorliegen.

Unter der Annahme einer Fragmentierung ergeben die jeweiligen Differenzen die Molmassen theoretisch möglicher Bruchstücke mit 150 kDa/ 100 nm für das Titin und 100 kDa/ 30 nm für das Mini-Titin.

3.5.3 Nachweis titinartiger Proteine mit Antikörpern

Die These, dass die mit Phyrophosphat isolierten Mini-Titine (MTD/MTS) keine Fragmente der hochmolekularen Titine sind ließ sich durch Antikörperreaktionen bestätigen. Mit Hilfe der Antikörper 528 und 529 gegen *L. migratoria* Projektin und der Antikörper gegen *C. elegans* Twitchin wurden diese Mini-Titin-Banden im Immunoblot deutlich angefärbt (Abb. 35 a, hier nur MTS dargestellt). Die Projektin-Antikörper zeigten keine weiteren Reaktionen, auch nicht mit den Titin Banden, somit können die Mini-Titine (MTD/ MTS bzw. 1 und 2) keine Fragmente der Titine sein.

Das AMS-Mini-Titin, das in der α -Aktinin-Präparation als hochmolekulare Bande auftrat, ließ sich durch die Projektin und Twitchin-Antikörper, ebenso wie das Titin, nicht detektieren (Abb. 35 b). Dieses abweichende Verhalten zwischen den mit Phyrophosphat isolierten Mini-Titinen und dem AMS-MT unterstützt die Annahme, dass es sich um unterschiedliche hochmolekulare Proteine bzw. Fragmente handelt.

Die Beobachtung, dass der Twitchin-Antikörper bei langen Inkubationszeiten sehr schwach mit den hochmolekularen Titin-Banden (Soika 1995) und den 170 kDa und 185 kDa Banden (Abb. 35 b II) reagierte, führte zu der Frage, ob diese 170 kDa und 185 kDa Banden möglicher Weise Fragmente der hochmolekularen Titine darstellen.

Der Versuch mit Hilfe Titin spezifischer Antikörper diese Annahme zu unterstützen scheiterte. Die Titin-Antikörper T41; T42 und T44, die im Bereich der M-Linie binden, und der Antikörper 9D10, der mit der PEVK-Region interagiert (Raynaud *et al.*, 2005), zeigten keine Reaktion mit den Proteinen von *L. terrestris* (nicht dargestellt).

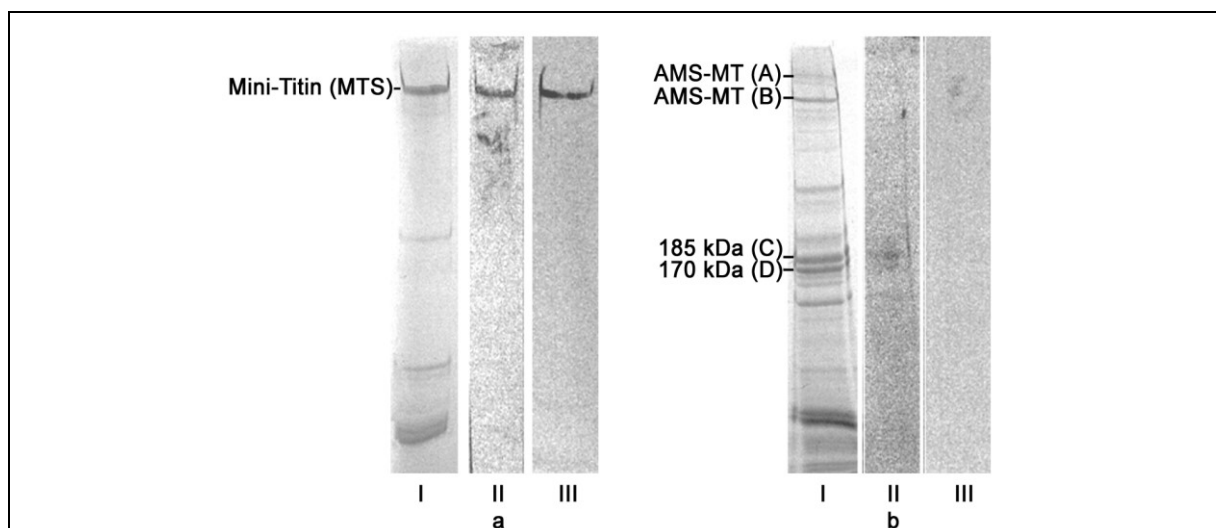


Abb. 35: Immunoblot verschiedener Mini-Titine

Untersucht wurden die Immunoreaktion von dem mit Phyrophosphat extrahierten Mini-Titin MTS (a) und den hochmolekularen Banden AMS-MT, die in der α -Aktinin Präparation (P2, Abb. 12) beobachtet wurden (b).

Die Proben wurden in 5%igen SDS-Gelen aufgetrennt und mit Comassie gefärbt (I). Die Immunoreaktionen der auf Nirocellulosemembran geblotteten Proteine erfolgte mit dem polyklonalen Twitchin-Antikörper 562 (II) und Projektin-Antikörpern 528+529 (III).

Die Verdünnungen betrugen jeweils 1:2500. Die genannten Antikörper reagierten mit dem Mini-Titin (MTS). Der Twitchin-Antikörper zeigte außerdem eine schwache Reaktion mit der 170/185 kDa Doppelbande (II b, C und D).

3.5.4 MS-Analyse

Aus den Antikörperreaktionen ergaben sich zwei Fragen:

1. Um welche Art von Titinen handelt es sich bei den in der α -Aktinin-Präparation aus dem „Waschschrift“ beobachteten Banden A und B (Abb. 35 b) mit Molmassen um 1000 kDa?
2. Weisen die Banden C – D (Abb. 35 b), die ebenfalls in der α -Aktinin-Präparation aus dem „Waschschrift“ beobachtet wurden, titinartige Sequenzen auf, da sie ebenso wie das hochmolekulare Titin eine schwache Reaktion mit dem Twitchin Antikörper zeigten?

Zur Klärung dieser Fragen wurden die genannten Banden A - D massenspektroskopisch untersucht (Abb. 36). Bei der MS-Analyse sind pro Probe mindestens fünf Sequenzen ermittelt worden. Die Peptid-Sequenzen (Tabelle 8, fett gedruckt) konnten bis auf eine Ausnahme mithilfe der BLAST Analyse alle Titinen unterschiedlicher Organismen zugeordnet werden. Lediglich eine Sequenz wurde als Projektin-Sequenz identifiziert. Projektin wird ebenfalls der Gruppe titinartiger Proteine zugeordnet.

Die MS-Analyse zeigte, dass es sich bei den Proben A - D um titinartige Proteine bzw. Fragmente davon handelt. Die Banden A und B entsprechen den Proteinen, die bisher als Ammoniumsulfat gefällte Mini-Titine (AMS-MT) bezeichnet wurden. Die hiervon untersuchten Sequenzen ließen sich alle den hochmolekularen Titinen zuordnen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten ist anzunehmen, dass es sich bei den als AMS-MT bezeichneten Proteinen um Fragmente oder Spleiß-Varianten der Titine mit molekularen Massen über 1500 kDa handelt. Entsprechendes wird für die Banden C und D vermutet. Die Sequenzähnlichkeit der Bande C mit dem Projektin scheint dieser Annahme allerdings entgegen zu stehen.

Werden die ermittelten Peptid-Sequenzen der vier Proben untereinander verglichen, zeigt sich, dass einige Übereinstimmungen zwischen den Proben A und B (Tabelle 8 violett) und zwischen den Proben C (185 kDa) und D (170 kDa) (Tabelle 8 grün) auftraten.

Sequenz	Gefunden in	Protein
---------	-------------	---------

Fragmente der obere hochmolekulare Bande (A):

xxx-ESEVTI-xxxK	<i>C. elegans</i> G4SLH0_CAEEL	Titin
xxx-VTSSE-xxxTK	<i>D. melanogaster</i> Q9I7U4 TITIN_DROME	
xxx-PYESL-xxxGEIEPR	<i>Camponotus floridanus</i> E2ARB2_CAMFO	
xxx-DVIEG-xxxR	<i>Homo sapiens</i> Q8WZ42 TITIN_HUMAN	
xxx-VEVVD-xxxK	<i>Pediculus humanus</i> E0VID6_PEDHC	

Fragmente untere hochmolekulare Bande (B):

xxx-DVIEG-xxxR	<i>H. sapiens</i> Q8WZ42 TITIN_HUMAN	Titin
xxx-VEVVD-xxxK	<i>P. humanus</i> E0VID6_PEDHC	
xxx-KSVLT-xxxK	<i>Saccoglossus kowalevskii</i> XP_002739923.1	
xxx-VSVTE-xxxK	<i>D. melanogaster</i> Q9I7U4 TITIN_DROME	
xxx-SLxSTVAGE-xxx	<i>H. sapiens</i> Q8WZ42 TITIN_HUMAN	

Fragmente der Bande um 185 kDa (C):

xxx-MSA-xxxASIPR-xxx-NPPK	<i>D. melanogaster</i> Q9I7U4 TITIN_DROME	Titin
xxx-QNISIK-xxx	<i>C. elegans</i> G4SLH0_CAEEL	
KTVKLL-xxx-K	<i>D. melanogaster</i> Q9I7U4 TITIN_DROME	
AADIASIASAAQ-xxxK	<i>Tribolium castaneum</i> XP_971502.2	Projektin
MDQPIQNAEITE-xxxR	<i>D. melanogaster</i> Q9I7U4 TITIN_DROME	Titin
xx-ERESA-xxR	<i>Oryctolagus cuniculus</i> XP_002712264.1	
xxx-SLHLPEVF-xxxR	<i>Danio rerio</i> A5X6X5_DANRE	

Fragmente der unteren Bande um 170 kDa (D):

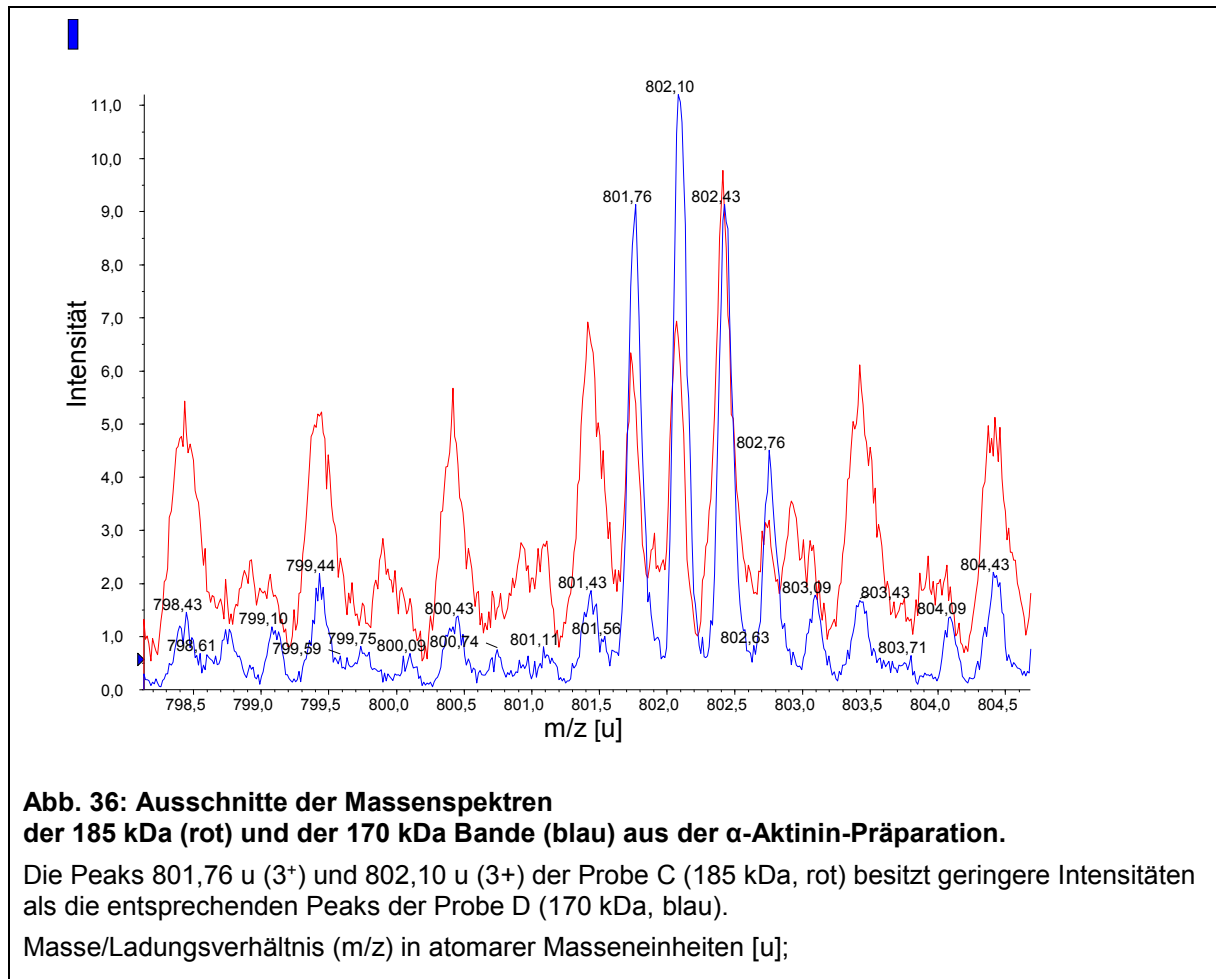
MDQPIQNAEITE-xxxR	<i>D. melanogaster</i> Q9I7U4 TITIN_DROME	Titin
xx-ERESA-xxR	<i>O. cuniculus</i> XP_002712264.1	
xxx-SLHLPEVF-xxxR	<i>D. rerio</i> A5X6X5_DANRE	
ISAIGDVYSLDNLSAL-xxx-R	<i>Culex quinquefasciatus</i> B0W5W8_CULQU	
xxIMIDE-xxxK	<i>P. humanus</i> E0W001_PEDHC	
xxx-QEGKIIPR-xxxR	<i>P. humanus</i> E0W001_PEDHC	

Tabelle 8: In der MS-Analyse ermittelte Fragmente der zwei hochmolekularen Protein-Banden A und B im Bereich von 1000 kDa, der 185 kDa Bande C und 170 kDa Bande D. Die fett gedruckten Bereiche einer Sequenz sind in Titin-Sequenzen verschiedener Organismen vorhanden. Violett sind die Fragmente dargestellt, die in den beiden hochmolekularen Banden A und B (Abb. 35 b) vorhanden sind. Grün sind die Fragmente dargestellt, die in beiden Banden C und D (Abb. 35 b) enthalten sind.

In den Massenspektren der Probe C (Abb. 36, rot) und D (Abb. 36, blau) wurden über acht identische Peptide identifiziert. Lediglich einzelne Abweichungen in den Intensitäten der Peaks bestimmter Massen-Ladungsverhältnisse, wie sie in Abb. 36 dargestellt sind, waren zu beobachten.

So besitzen die Peaks mit 801,76 u und 802,10 u der 170 kDa Probe D, die insgesamt eine geringere Masse besitzt, deutlich höhere Intensitäten als die der 185 kDa Probe C (Abb. 36).

Solche kleinen Unterschiede belegen geringfügige Variationen im Aufbau der Proteine. Diese treten zwischen Isoformen ebenso auf, wie zwischen einem Protein und dem dazugehörigen Fragment. Erstaunlich ist, dass hier die kleinere Probe D ein intensiveres Signal liefert, was bei einer angenommenen Fragmentierung eher von der größeren Bande C zu erwarten wäre, da hier die längere Protein-Sequenz vorhanden ist und somit weitere Peptide und damit Peaks im Spektrum zu erwarten sind.



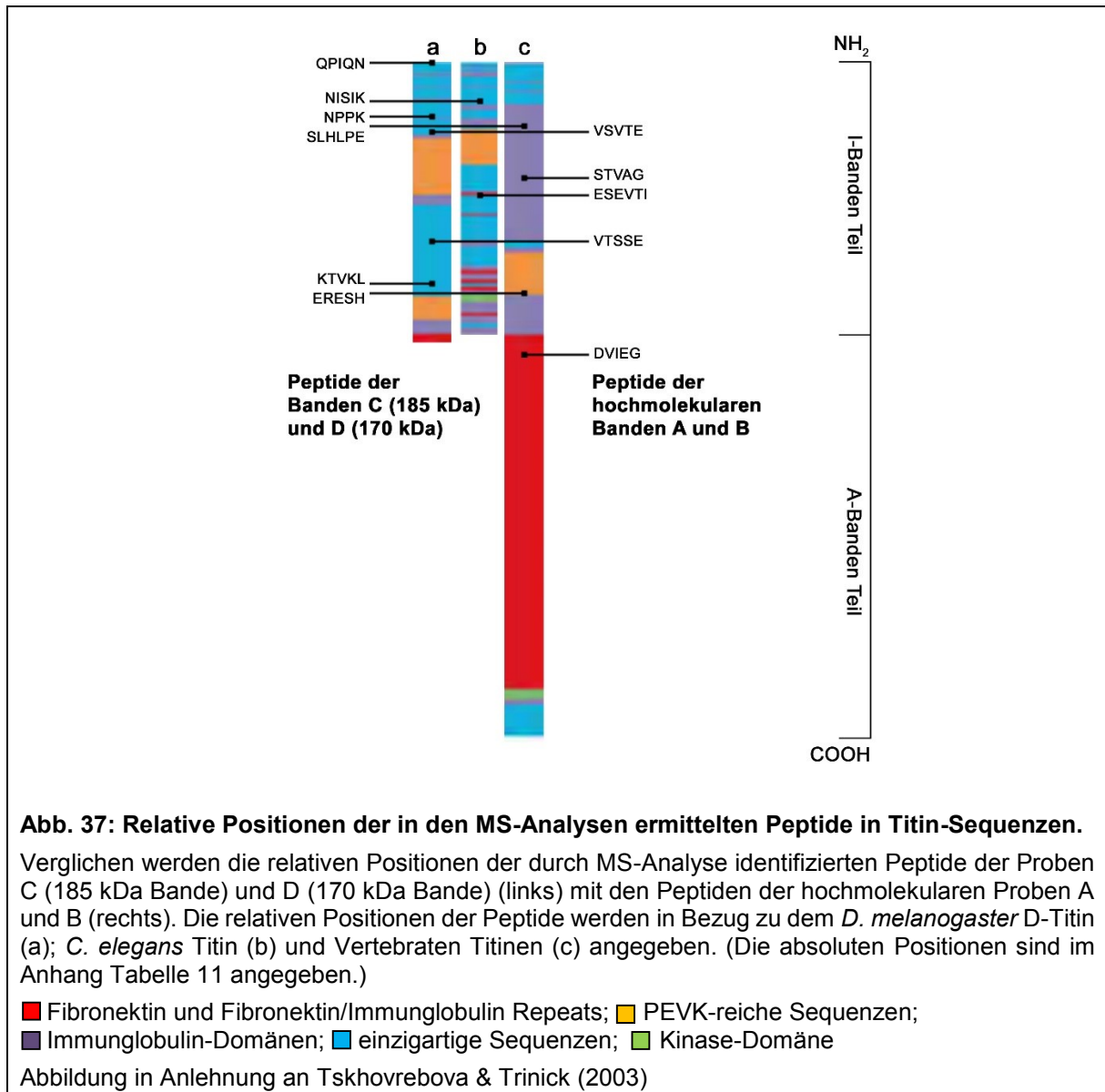
Aufgrund der Komplexität der Spektren und der fehlenden Gesamtsequenz des Titins von *L. terrestris* kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Probe D ein Fragment von C repräsentiert. Allerdings sprechen die geringfügigen Unterschiede in den Spektren der Proben C und D dafür, dass es sich um zwei Fragmente von verschiedenen Titin-Isoformen handelt, da zwar große, aber nicht vollständige Übereinstimmungen zu beobachten sind. Entsprechendes gilt für die Proben A und B.

Die in der MS-Analyse ermittelten Peptid-Sequenzen konnten zum Teil Titinen zugeordnet werden, deren Sequenzen vollständig bekannt sind. Hierzu gehören u. a. die Sequenzen von *D. melanogaster* (Q9I7U4 TITIN_DROME mit 2,1 MDa), *C. elegans* (G4SLD6_CAEEL mit 2,1 MDa) und *H. sapiens* (Q8WZ42 TITIN_HUMAN mit 3,8 MDa). Dieses ermöglichte die absoluten Positionen der Peptide in den Proteinen zu ermitteln (s. Anhang Tabelle 11). Die Betrachtung der Positionen der Peptid-Sequenzen in vollständigen Titinen (Tabelle 11) zeigte, dass bis auf eine Ausnahme alle Peptide der N-terminalen Hälfte der Vertebraten Titine bzw. den I-Banden assoziierten Titinen der Evertrebraten zugeordnet werden konnten. Eine Sequenz der hochmolekularen Proben A und B liegt in dem Übergangsbereich zwischen der A- und I-Bande der Vertebraten Titine.

Da die zum Vergleich herangezogenen Titine unterschiedliche Größen aufweisen, wurden die relativen Positionen in Bezug auf den jeweiligen I-Banden Anteil (100 %) ermittelt (Abb. 37). Von den Peptiden der Proben C und D liegen vier im N-terminalen ersten Fünftel der zum Vergleich herangezogenen Titine, lediglich zwei Peptide lagen weiter C-terminal. Insbesondere die absolute Position der Sequenz „QPIQN“ im D-Titin (187.-191. AS von 18141 AS) weist darauf hin, dass die Banden C und D N-terminale Titin-Anteile darstellen.

Von den Banden A und B sind keine Peptid-Sequenzen in dem beschriebenen N-terminalen Titin Teil vorhanden, diese sind alle weiter C-terminal angeordnet (Abb. 37).

Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass die 170 kDa und 185 kDa Bande den N-terminalen Teil des Titins repräsentieren, währenddessen die hochmolekularen Banden A und B ein weiteres, I-Banden assoziiertes Stück darstellen, das u. U. in den A-/I-Banden-Übergang hineinreicht.



3.6 Interaktion von α -Aktinin mit titinartigen Proteinen

Die Beobachtung, dass bei den Kosedimentationen von α -Aktinin mit Aktin schwache Banden um 170-185 kDa mit dem α -Aktinin im Pellet auftraten (Abb. 21 und Abb. 22), führte zu der Vermutung, dass diese Banden Interaktionspartner des α -Aktinins oder des Aktins darstellen. Für diese 170-185 kDa Proteine wurden mit Hilfe der MS-Analysen (Kap. 2.2.7) die Titinartigkeit ebenso nachgewiesen, wie für die mit Ammoniumsulfat gefällten hochmolekularen Proteine (AMS-MT), die während der α -Aktinin-Isolierung beobachtet wurden. Diese hochmolekularen Banden (AMS-MT) unterschieden sich von den mit Phyrophosphat isolierten Mini-Titine MTD bzw. MTS, da AMS-MT nicht mit dem Twitchin- und den Projektin-Antikörpern reagierte (Abb. 35).

Um in einem ersten Schritt zu untersuchen, welche der titinartigen Proteine mit α -Aktinin und Aktin interagieren, wurden die Fraktionen der α -Aktinin Isolierung AMS gefällt, die neben α -Aktinin auch Aktin, die 170/ 185 kDa Proteine und das AMS-MT enthielten (Abb. 12 P2). Die hiermit durchgeführte Kosedimentation (100.000 **g**/ 2 h) lieferte ein deutlich sichtbares Pellet, das in der SDS-PAGE eine Vielzahl an Banden lieferte (Abb. 38 b, c).

Die weiteren Betrachtungen erfolgten unter der Annahme, dass die im Pellet befindlichen Proteine miteinander interagierten und deshalb sedimentiert werden konnten.

Im Pellet der Ultrazentrifugation waren die Anreicherung von AMS-MT, den 170-185 kDa Banden, α -Aktinin, einer Bande um 80 kDa, Aktin und einer Bande um 30 kDa, die vermutlich Tropomyosin darstellt besonders auffallend (Abb. 38). Die Interaktionen von Aktin mit α -Aktinin und Aktin mit Tropomyosin unter polymerisierenden Bedingungen sind vielfach beschrieben (s. Einleitung). Die Beobachtung, dass sowohl die hochmolekularen, als auch die titinartigen 170-185 kDa Banden im Pellet erschienen ist bemerkenswert, mögliche Interaktionspartner könnten sowohl Aktin als auch α -Aktinin sein.

Mit dem α -Aktinin-Antikörper (aALt) wurde das α -Aktinin nachgewiesen (Abb. 38 e) und ausgeschlossen, dass die Bande um 100 kDa Paramyosin darstellte. Außerdem zeigte sich hierbei, dass die Bande um 80 kDa kein Fragment des α -Aktinins darstellt, da diese Bande nicht angefärbt wurde (Abb. 38 e). Im Gegensatz zu der Bande um 55 kDa, die eine deutliche Reaktion zeigte, ein α -Aktinin Fragment ist, und vermutlich die Spektrin-Repeats enthält. Da diese Fragmente keine Bindungsstelle für Aktin besitzen stellt sich die Frage mit welchen Proteinen diese Fragmente interagieren könnten. Ein möglicher Partner sind die titinartigen Proteine.

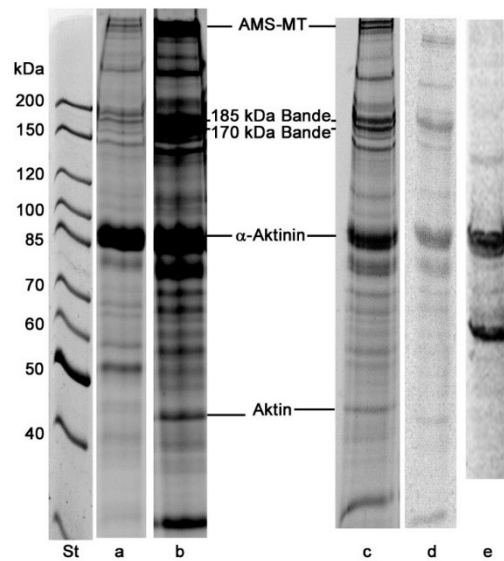


Abb. 38: Ultrazentrifugation von α -Aktinin mit titinartigen Proteinen.

Die Ammoniumsulfat gefällte Probe P2 der α -Aktinin Präparation (Abb. 12) wurde in EM-Dialyse Puffer aufgenommen und dagegen dialysiert. Sie enthielt sowohl α -Aktinin als auch die titinartigen Proteine AMS-MT und die 185/170 kDa Banden. Nach Zugaben von Polymerisationspuffer (Endkonzentration: 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 und 1 mM ATP, 10 mM Imidazol pH 7,5) über Nacht auf Eis inkubiert und anschl. zentrifugiert (100000 **g**/ 2 h).

Überstand (a) und Pellet (b und c, in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen) der Ultrazentrifugation von α -Aktinin mit titinartigen Proteinen. Ponceau gefärbte Nitrocellulose Membran (d) Reaktion mit dem Antikörper aALt (1:100000) (e). Standard (St).

Kosedimentations-Ansätze mit α -Aktinin und Fraktionen in denen die Titin-Fragmente (170 kDa und 185 kDa) angereichert waren lieferten nach der Zentrifugation (50000 **g**/ 45 min) nur geringe Pellets (Abb. 39), in denen aber der Anteil an sedimentiertem α -Aktinin und der titinartigen Fragmente im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war. Diese Beobachtung unterstützte die Annahme, dass α -Aktinin mit den 185 kDa und 170 kDa Titin-Fragmenten, die den N-terminalen Teil des Titins darstellen, interagieren könnten.

Der Anteil an sedimentierten Proteinen war allerdings so gering, dass abschließende Aussagen über die Interaktion nicht getroffen werden können.

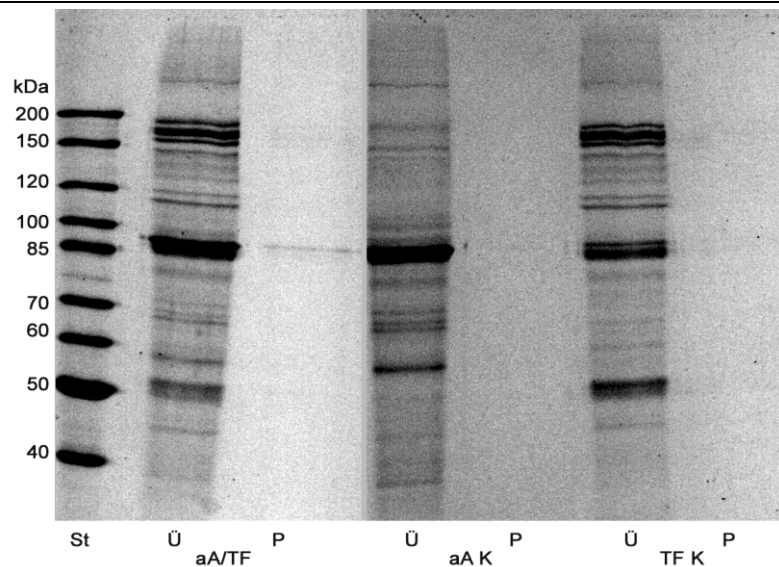
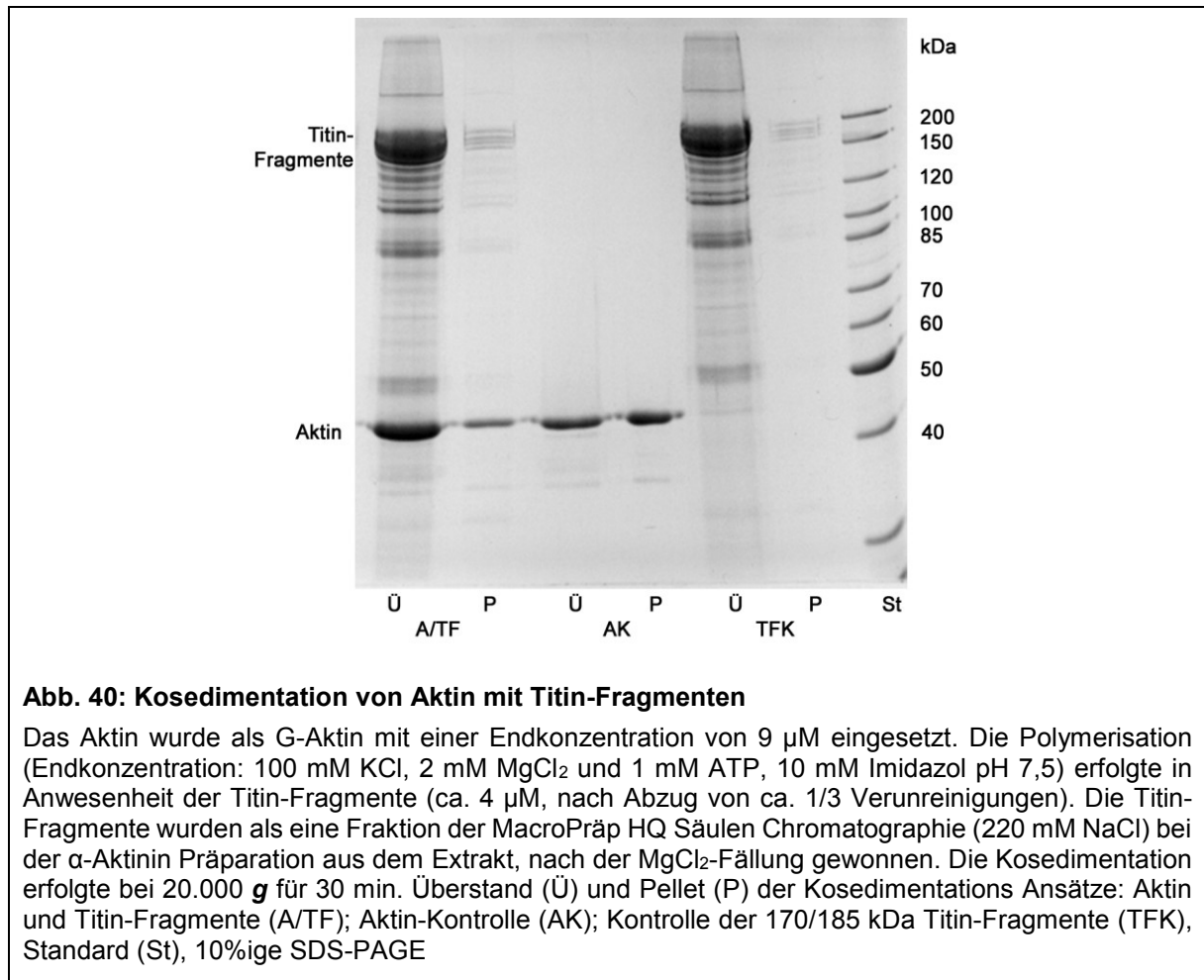


Abb. 39: Kosedimentation von α -Aktinin mit 170/185 kDa Titin-Fragmenten.

Verwendet wurden das α -Aktinin (Abb. 12 P4, hier aA) und die mit den 170/185 kDa Titin-Fragmenten (TF) angereicherte Fraktion der α -Aktinin-Präparation. Nach Zugaben von Polymerisationspuffer (Endkonzentration: 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 und 1 mM ATP, 10 mM Imidazol pH 7,5) wurde der Ansatz über Nacht auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (50000 g / 45 min). Die Pellets weisen nur geringe Protein-Konzentrationen auf, lediglich in dem Ansatz mit höherem α -Aktinin Anteil und den Titin-Fragmenten (170/185 kDa) sind α -Aktinin und sehr schwache Banden der Titin-Fragmente im Pellet zu erkennen. In den Kontrollen fehlen entsprechende Banden. Es sind jeweils Überstand (Ü) und Pellet (P) des Ansatzes mit α -Aktinin und den Titin-Fragmenten (aA/TF), der α -Aktinin Kontrolle (aA K) und der Kontrollen der mit Titin-Fragmenten angereicherten Probe (TF K) dargestellt. Standard (St).

3.7 Interaktion von Aktin mit den 170/185 kDa Titin-Fragmenten

Die Interaktion von Aktin mit den Titin-Fragmenten (170/185 kDa) wurde genauer untersucht. Zunächst wurde auch bei der Kosedimentation von Aktin mit den Titin-Fragmenten (170/185 kDa) festgestellt, dass diese nur in geringem Maße sedimentierten. Im Vergleich zur Kontrolle, waren die Titin-Fragmente (170/185 kDa) aber dennoch vermehrt im Pellet enthalten (Abb. 40). Außerdem pelletierte in Anwesenheit der Titin-Fragmente deutlich weniger F-Aktin (- 55 %) bei der Zentrifugation (20.000 g / 30 min) als in der Aktin-Kontrolle (Abb. 40). Diese Beobachtung kann mit der Interaktion der 170/185 kDa Titin-Fragmente mit Aktin und einer Beeinflussung der Aktin-Polymerisation erklärt werden.



Um diesen Einfluss der 170/185 kDa Titin-Fragmente auf den Polymerisations-Zustand des Aktins näher zu untersuchen, wurden weiterführend Viskositäts-Tests und fluorometrische Messungen durchgeführt.

Bei den Kugelfall viskosimetrischen Messungen (Abb. 41) hatten die Proben, bei denen das Aktin in Anwesenheit der 170/185 kDa Titin-Fragmente polymerisiert wurde, eine deutlich geringere Viskosität als die Kontrolle, die nur F-Aktin im Gleichgewichtszustand enthielt. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig (Abb. 41)

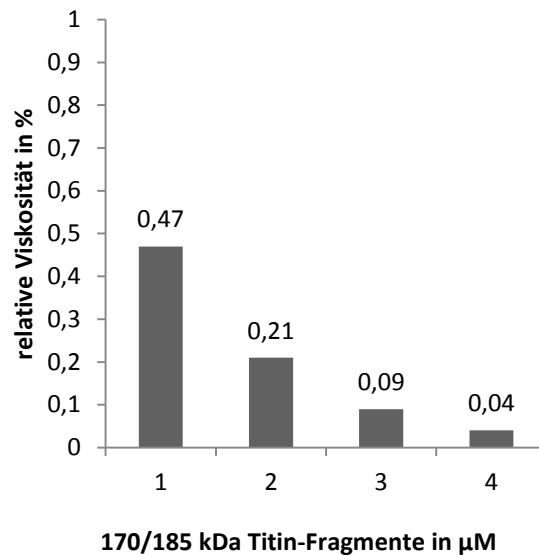


Abb. 41: Relative Viskositäten von F-Aktin in Gegenwart von 170/185 kDa Titin-Fragmenten.

Bestimmung der relativen Viskosität durch Kugelfall von F-Aktin in Anwesenheit der 170/185 kDa Titin-Fragmente. Der Wert für die relative Viskosität der reinen Aktin-Filamente wurde nach Abzug des Wertes für Wasser/G-Aktin auf 100 % festgelegt (Kap. 2.3.2). In Anwesenheit der Titin-Fragmente ist konzentrationsabhängig eine deutliche Abnahme der relativen Viskosität zu beobachten.

Die Titin-Fragmente (Abb. 40 TFK) wurden bei der α -Aktinin Präparation aus dem Extrakt, nach der MgCl_2 -Fällung und der chromatographischen Trennung als eine Fraktion der MacroPräp HQ Säule (220 mM NaCl) gewonnen. Sie wurden mit Konzentrationen von 1, 2, 3 und 4 μM und das G-Aktin mit einer Endkonzentration von 17 μM eingesetzt. Die Polymerisation wurde durch Polymix und AP-Puffer gestartet (Endkonzentration: 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 und 1 mM ATP, 10 mM Imidazol pH 7,5) und erfolgte über Nacht bei RT.

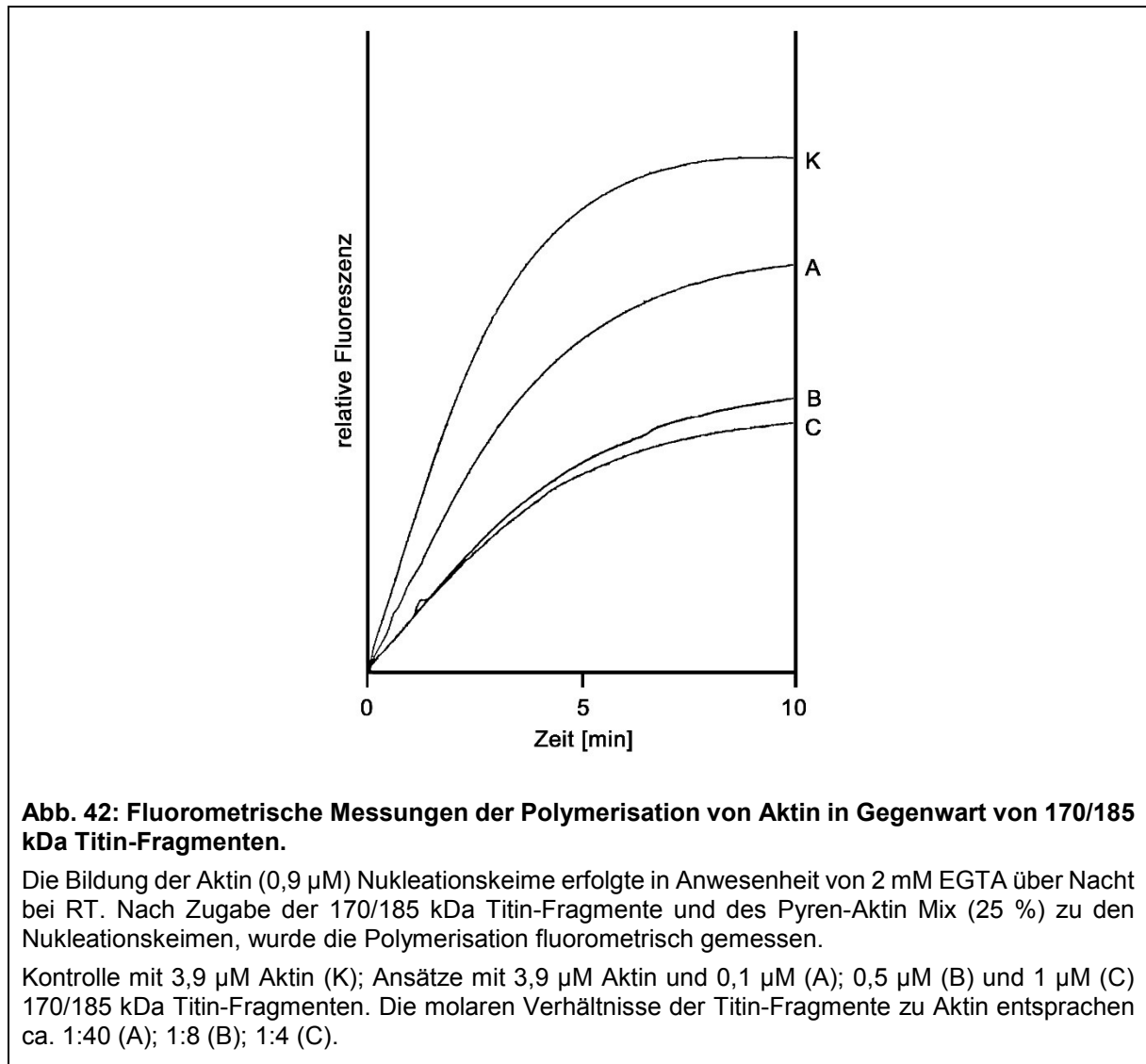
Der deutlichen Verringerung der relativen Viskositäten von F-Aktin in Gegenwart von 170/185 kDa Titin-Fragmenten könnte entweder eine Fragmentierung oder ein Capping der Aktin-Filamente zugrunde liegen. Sowohl das Zerschneiden der Aktin-Filamente, als auch das Blockieren des Plus-Endes würde zu kürzeren F-Aktinen bzw. einem geringeren Anteil an polymerisiertem Aktin führen und damit zu einer Erniedrigung der Viskosität.

Um den Anteil an polymerisiertem Aktin direkt messen zu können wurden fluorometrische Messungen mit Pyren gekoppeltem Aktin durchgeführt, dessen Fluoreszenzspektrum sich drastisch bei der Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin ändert (Kap.2.3.3).

Dies erlaubt eine genaue Beobachtung der Polymerisations-Depolymerisations-Dynamik durch zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenz.

Mit dem hier gewählten Ansatz konnte gezeigt werden, dass, ausgehend von Nukleationskeimen (Gettemans *et al.*, 1995) die Polymerisation durch die titinartigen 170/185 kDa Fragmente gehemmt wird (Abb. 42).

Bei einem Konzentrationsverhältnis von Aktin zu Titin-Fragmenten von ca. 40:1 war nach 10 Minuten die Fluoreszenz um 20 % niedriger als in der Aktin Kontrolle. Bei einem Konzentrationsverhältnis von ca. 4:1 war die Fluoreszenz nach 10 Minuten um 52 % niedriger. Somit polymerisiert in Anwesenheit der Titin-Fragmente, konzentrationsabhängig, weniger Aktin als in der Kontrolle. Je größer die eingesetzte Menge an 170/185 kDa Titin-Fragmenten war, desto niedriger war die Polymerisations-Geschwindigkeit (Abb. 42).



Die Ursache für die beobachtete Fluoreszenzabnahme kann das Cappen des Plus-Endes der Aktin-Filament durch die Titin-Fragmente sein. Das Blockieren der Nukleationskeime am schnell wachsenden Plus-Ende führt zu einer Verlangsamung der Polymerisations-Geschwindigkeit. Der Grund für diese Verlangsamung liegt dann zum einen darin, dass das Filamentwachstum auch bei G-Aktin Überschuss nur an einem Filament-Ende möglich ist. Zum anderen unterscheidet sich die kritische Konzentration für das Plus-Ende (0,1 μM Aktin)

deutlich von der des Minus-Endes ($0,8 \mu\text{M}$ Aktin). Sind all Plus-Enden blockiert steigt somit die kritische Konzentration.

Da in Anwesenheit der Titin-Fragmente der Polymerisations-Grad des F-Aktins nach 10 Minuten deutlich unter dem in der Kontrolle liegt, ist die Schlussfolgerung, dass das schnell wachsende Plus-Ende in diesen Ansätzen blockiert wurde.

Die maximale Reduktion der Fluoreszenz lag bei 52 %. Bei hohen Konzentrationen der Titin-Fragmente (Abb. 42 B und C) setzt ein Sättigungs-Effekt ein. Höhere Konzentrationen an Titin-Fragmenten hatten dann kaum noch einen Einfluss auf den Anteil an F-Aktin. Möglicherweise bewirken die Titin-Fragmente neben dem Cappen des Plus-Endes eine Stabilisierung kurzer Filamente, die durch die Länge der Titin-Fragmente bestimmt werden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollten α -Aktinin und titinartige Proteine aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* isoliert und charakterisiert werden, um dann die Interaktionen mit Aktin und untereinander untersuchen zu können. Ziel war es, eine Vorstellung zu entwickeln, welche der titinartigen Proteine in den Z-Stäben verankert sind.

4.1 α -Aktinin aus der schräggestreiften Muskulatur

Die hier durchgeführte Isolierung des α -Aktinins aus Hautmuskelschläuchen von *L. terrestris* ist im Vergleich zu der Isolierung aus dem Hühnermagen (Feramisco & Burridge 1980) vereinfacht und angepasst worden. Eine Schwierigkeit bestand darin, sicher zu stellen, dass das isolierte Protein tatsächlich α -Aktinin ist und nicht Paramyosin, das ebenfalls eine molekulare Masse um 100 kDa besitzt. Eine eindeutige Zuordnung der in SDS-Gelen auftretenden 100 kDa Banden konnte durch den Einsatz spezifischer Antikörper erreicht werden (Kap. 3.3.2).

Bei *L. terrestris* erfolgt bei niedriger Ionenstärke, insbesondere ohne Proteasehemmer, ein schneller Zerfall der Z-Stäbe (D'Haese & Ditzgens 1987). Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um α -Aktinin zu isolieren, das wesentlicher Bestandteil der Z-Stäbe ist. Ein großer Teil des α -Aktinins wurde bereits in dem ersten „Waschschritt“ mit 0,5 mM PMSF und 3 mM Tris pH 7,0 extrahiert. Dieser Effekt wurde durch Zugabe weiterer Proteasehemmer unterbunden und führte dann zu 80 % geringeren Ausbeuten. Bullard *et al.*, (1990) erzielten durch einen Calpain induzierten Verdau isolierter Z-Scheiben aus der Flugmuskulatur von *Lethocerus* einen entsprechenden Effekt. Dieser Verdau bewirkte, dass α -Aktinin vermehrt freigesetzt wurde, selbst aber weitgehend unverdaut blieb. Bullard *et al.* (1990) vermuteten, dass hierfür der Verdau von Proteinen über 100 kDa verantwortlich ist. Auch im Skelettmuskel fördert Calpain den Abbau der Z-Scheiben, ohne dass dabei α -Aktinin oder Aktin verdaut werden (Goll *et al.*, 1991).

Das α -Aktinin aus dem mit Ammoniumsulfat (AMS) gefällten Überstand des „Waschschriffs“ zeigte im Vergleich zu dem aus dem Extrakt keinen Unterschied in der Laufweite in der SDS-PAGE (Abb. 17). Proteolytische α -Aktinin-Fragmente von 34 kDa, 55 kDa, 68 kDa und 87 kDa, wie sie von Fukami *et al.* (1996) beschrieben sind (Kap. 3.1.1), traten in der Präparation aus dem Hautmuskelschlauch zunächst nicht auf. In den Proben aus den Kaumägen, die immer erst nach den Hautmuskelschläuchen präpariert wurden und somit vermehrt Proteasen ausgesetzt waren, war die Fragmentierung von α -Aktinin im Immunoblot deutlich zu erkennen (Abb. 16). Außerdem war eine Bande über der des α -Aktinins auffällig, die von den Antikörpern

KT9 und KT10 und auch von den Antikörpern gegen *Dictyostelium* α -Aktinin detektiert wurde. Von Kuroda *et al.* (1994) ist das Auftreten einer solchen Bande oberhalb der des α -Aktinins nach gezieltem Verdau von Skelettmuskel- α -Aktinin aus dem Hühner Brustmuskel beschrieben worden. Kuroda *et al.* (1994) identifizierten diese Bande als dimerisierte 55 kDa Fragmente der Spektrin-Repeats.

In Immunoblots zeigten die Proben des Säulenauftrags der MacroPräp HQ mit dem polyklonalen α -Aktinin-Antikörper LT ebenfalls Banden mit 87 kDa, 68 kDa und 55 kDa (Abb. 18 SA). Von diesen Fragmenten wurde in den α -Aktinin-Fractionen (Abb. 18 P3) lediglich das, dass die 68 kDa Bande lieferte schwach angefärbt. Fukami *et al.* (1996) beschrieben, dass die 68 kDa Bande dem C-terminalen Teil des α -Aktinins, nach Abspaltung der Calponin-Domäne (34 kDa), entspricht.

In der hier dargestellten Präparation des α -Aktinins ist eine erhebliche Fragmentierung auszuschließen, da das isolierte α -Aktinin in der SDS-PAGE im Wesentlichen Banden um 100 kDa lieferte (Abb. 18).

Einige α -Aktinin Proben (z. B. Abb. 16 und Abb. 22) zeigten eine Doppelbande um 100 kDa. Von der Säule eluiertes α -Aktinin lieferte bis zu vier Peaks. Darüber hinaus wiesen die Spots in der 2D-Elektrophorese unterschiedliche Laufweiten zwischen 102 kDa und 91 kDa auf. Als Ursache hierfür sind neben einem proteolytischen Abbau auch verschiedene α -Aktinin-Isoformen denkbar, wie sie für das α -Aktinin aus dem Kaninchen-Skelettmuskel beschrieben sind (Kobayashi *et al.*, 1983). Da in der Kosedimentation mit Aktin (Abb. 22) beide Banden im Pellet enthalten waren, ist davon auszugehen, dass die Aktin-Bindungsstellen intakt waren, und der N-terminale Teil des α -Aktinins nicht abgespalten wurde. C-terminal ist die Abspaltung der calmodulinartigen Domäne mit 13 kDa beschrieben (Kuroda *et al.*, 1994; Fukami *et al.*, 1996), das hierbei entstehende größere Fragment von ca. 90 kDa könnte der unteren Bande der Doppelbanden (Abb. 16) bzw. den Spots mit 91 kDa (Abb. 19) entsprechen.

4.1.1 Optimierung der Präparation

Der Proteingehalt der mit α -Aktinin angereicherten Fraktionen nach der Anionenaustauscher Chromatographie konnte deutlich erhöht werden, indem neben dem Extrakt auch die im „Waschschritt“ gelösten Proteine mit Ammoniumsulfat gefällt und gereinigt wurden. Nur so konnte eine Ausbeute von ca. 40 mg α -Aktinin (Fraktionen nach der MacroPräp HQ Säule nach Abzug der Verunreinigungen) pro 100 g Hautmuskelschläuchen erreicht werden. Für das α -Aktinin aus der glatten Muskulatur des Hühnermagens wird nach vergleichbaren

Reinigungsschritten der Proteingehalt mit ca. 48 mg/ 100 g angegeben (Feramisco & Burridge 1980).

Bei der Präparation der Proteine aus dem „Waschschritt“ wurde auf die reinigende $MgCl_2$ -Fällung verzichtet, weil in den Proben relativ wenig Aktomyosin enthalten war und damit ein derartiger Reinigungsschritt zunächst nicht notwendig erschien. Außerdem hätte eine $MgCl_2$ -Fällung die Ausbeute reduziert. Auch Feramisco & Burridge (1980) beschrieben die $MgCl_2$ -Fällung als einen optionalen Reinigungsschritt, den sie z. B. bei der Isolierung von α -Aktinin aus dem Hühnerbrustmuskel nicht anwendeten. Das Fehlen dieses Reinigungsschrittes führte aber dazu, dass neben anderen Verunreinigungen Paramyosin im Überstand und im Säulenauftrag enthalten war und auch die α -Aktinin Fraktionen mehr Verunreinigungen enthielten. Im Sinne einer besseren Reinigung sollten die im Waschschritt gelösten Proteinen $MgCl_2$ gefällt werden, da das Problem der geringen Ausbeuten durch die Präparation aus dem „Waschschritt“ gelöst werden konnte.

Die Chromatographie mit dem stärkeren Anionenaustauscher MacroPräp HQ ermöglichte eine bessere Trennung des α -Aktinins und die Reinigung im größeren Maßstab. Allerdings war die Reinigung für die mit höheren Salzkonzentrationen eluierenden α -Aktinin Fraktionen nicht ausreichend.

Die bei niedrigen Salzkonzentrationen eluierenden α -Aktinin Fraktionen (Abb. 10 d) enthielten relativ sauberes α -Aktinin. Im weiteren Verlauf waren die α -Aktinin Fraktionen durch 150 - 200 kDa Proteine (Abb. 10 e), Aktin, 60 kDa Proteine und über 200 kDa große Proteine (Abb. 12 P5/P6) verunreinigt. Diese Verunreinigungen konnten nicht mit dem Anionenaustauscher MacroPräp HQ vollständig vom α -Aktinin getrennt werden.

Eine zweite Säulenchromatographie mit dem stärkeren Anionenaustauscher Mono Q erwies sich als sinnvoll und lieferte zu 95% reines α -Aktinin in hoher Konzentration. Die Gelfiltration erwies sich zur Reinigung weniger geeignet, da das Protein stark verdünnt eluierte, so dass eine Reinigung über die Mono Q effizienter war.

4.1.2 Charakterisierung des isolierten 100 kDa Proteins

Das in dieser Arbeit aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* isolierte Protein, das wie bereits dargestellt in der SDS-PAGE Laufweiten von ca. 100 kDa aufwies und positiv mit anti- α -Aktinin-Antikörpern reagierte, wurde außerdem elektronenmikroskopisch und durch Gelfiltration, isoelektrische Fokussierung und Sequenzierung charakterisiert.

Im elektronenmikroskopischen Bild ist ein hantelförmiges Protein von 35 nm Länge zu erkennen (Abb. 20). Diese Form und Länge entspricht den Angaben in der Literatur zu α -Aktininen anderer Arten, die ebenfalls anhand elektronenmikroskopischer Bilder ermittelt wurden. Condeelis *et al.* (1984) haben α -Aktinin von *Dictyostelium* und *Gallus* als hantelförmige Struktur mit einer Größe von ca. 40 nm beschrieben. Taylor und Taylor (1993) gaben die Länge der α -Aktinine mit 34,5 nm an, und Hampton *et al.* (2007) bestimmten die Länge zwischen den Zentren der Aktin-Bindungsdomäne mit $33,9 \pm 2,5$ nm.

In der SDS-PAGE lieferte das isolierte Protein eine Bande von ca. 100 kDa. Das entspricht dem vom α -Aktinin zu erwartenden Verhalten, da α -Aktinin in der SDS-PAGE als Monomer vorliegt (Kap. 3.1.1). Die native Molekularmasse des dimerisierten α -Aktinins beträgt ca. 200 kDa. Diese Größenordnung konnte durch die Gelfiltration bestätigt werden.

Es wurde mithilfe der Gelfiltration und durch fehlende Antikörperreaktionen gezeigt, dass die in der SDS-PAGE bei 100 kDa erscheinende Bande aus dem Peak P1 (Abb. 18) kein α -Aktinin darstellte, sondern ein anderes aggregierendes Protein, das nativ größere Komplexe lieferte. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Paramyosin, da dieses in großer Menge in der schräggestreiften Muskulatur vorkommt.

Die für das α -Aktinin von *L. terrestris* ermittelten isoelektrischen Punkte von pI 5,61 und 103,8 kDa aus der Sequenz und einem pI von 5,68 und 102 kDa aus der 2-D Elektrophorese (Abb. 19, schwarzer Spot A) stimmen gut überein. Für α -Aktinin aus dem Hühnermagen sind elf isoelektrische Punkte im Bereich von pI 5,46 bis zu pI 6,60 bestimmt worden (Endo & Masaki, 1982). Izaguirre *et al.* (1999) haben für α -Aktinin 4 aus humanen Thrombozyten gezeigt, dass posttranslationale Modifikationen den pI von 5,2 deutlich verbreitern auf pI 4,9 bis 5,8. Somit ist es typisch für α -Aktinin, dass bei der Fokussierung viele isoelektrische Punkte ermittelt werden. Diese erklären auch, warum das α -Aktinin in der Präparation nicht in einem einzelnen Peak von der MacroPräp HQ Säule eluiert.

Ursache für die vielen Spots sind zum einen verschiedene Isoformen (Kap. 1.3) und zum anderen posttranslationale Modifikationen. Evertbraten haben im Gegensatz zu den Vertebraten nur ein α -Aktinin Gen, das aber verschiedene Spleiß-Varianten liefert, so werden z. B. für *C. elegans* vier Spleiß-Varianten mit 107,2 kDa/6,02 pI; 104,1 kDa/5,82 pI; 98,7 kDa/6,26 pI und 95,6 kDa/6,07 pI beschrieben (Wormbase atn-1;

Abb. 43). Die aus den Sequenzen berechneten Massen von *C. elegans* α -Aktininen variieren um bis zu 12 kDa und die isoelektrischen Punkte um bis zu 0,44 pI. In einer entsprechenden Variationsbreite befinden sich auch die Werte der *L. terrestris* α -Aktinine.

Für das humane Muskel- α -Aktinin werden insgesamt 29 Modifikationen angegeben, davon sind der überwiegende Teil (22) Phosphorylierungen. Darüber hinaus werden zwei Ubiquitierungen, drei Acetylierungen und zwei Methylierungen beschrieben (PhosphoSitePlus: ACTN 2). Vergleicht man die Sequenzen des humanen α -Aktinins 2 mit der des *L. terrestris* findet man 11 Positionen, die derart konserviert sind, dass hier entsprechende posttranslationale Modifikationen denkbar sind (Abb. 45 c). Dieses sind sieben Phosphorylierungen, zwei Ubiquitierungen und jeweils eine Methylierung und eine Acetylierung.

Eine Phosphorylierung erhöht die negative Ladung und erniedrigt damit den pI um 0,02 - 0,03 pI-Einheiten. Der Verlust einer positiven Ladung z. B. durch Acetylierung der ϵ -Amino-Gruppe des Lysins erniedrigt den pI um 0,1 bis 0,2 pI-Einheiten (Packer *et al.*, 2007). Die einzelnen Spots der isoelektrischen Fokussierung wurden nicht weiter analysiert. Grundsätzlich ist zu vermuten, dass auch beim *L. terrestris* verschiedene α -Aktinin Isoformen durch unterschiedliches Spleißen gebildet werden. Fraglich ist ob diese auch alle aus dem Hautmuskelschlauch isoliert werden können, da verschiedene α -Aktinin Isoformen z. B. von *D. melanogaster* unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien zugeordnet werden (Fyrberg *et al.*, 1990; Roulier *et al.*, 1992).

Posttranslationale Modifikationen sind auch für *L. terrestris* α -Aktinine zu erwarten. Nach theoretischen Überlegungen könnten die saureren, rot umrandeten Spots (Abb. 19), aufgrund des pI-Unterschieds von 0,14 pI, acetylierte α -Aktinine der grün umrandeten Spots repräsentieren. Da von den schwarz umrandeten Spots keine Varianten mit einem kleineren pH-Wert gefunden wurden, könnte es sich hierbei um eine α -Aktinin-Isoform handeln, bei der ein Lysin gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wurde, und deshalb eine entsprechende Acetylierung nicht möglich ist. Somit werden zwei α -Aktinin Isoformen, die vermutlich auf Spleiß-Varianten beruhen, im Hautmuskelschlauch angenommen. Diese weisen unterschiedliche posttranslationale Modifikationen auf. Die jeweils sauren Spots innerhalb der gekennzeichneten Gruppen (Abb. 19 schwarz, rot, grün) könnten auf Phosphorylierungen zurückzuführen sein. Die funktionelle Bedeutung dieser Modifikationen ist für Muskel- α -Aktinine offen, genauere Untersuchungen liegen nur von Nicht-Muskel- α -Aktininen vor, bei denen gezeigt wurde, dass Phosphorylierungen im Bereich der Calponin-Domänen die Interaktion zum Aktin hemmen (Kap. 3.1.1).

Sowohl die monoklonalen Antikörpern gegen *Dictyostelium* α -Aktinin (D1, D2, D3) als auch die *C. elegans* Antikörper (KT9, KT10) reagierten übereinstimmend mit der 100 kDa Bande im Western Blot (Abb. 16). Somit ist anzunehmen, dass auch diese an α -Aktinin binden. Takeda *et al.* (2008) konnten zeigen, dass die Antikörper KT9 und KT10 in *C. elegans* spezifisch mit dem Hautmuskelschlauch interagieren und dort die Z-Stäbe detektieren.

Die Lokalisation in den Z-Elementen des Muskels im Allgemeinen und in den Z-Stäben der schräggestreiften Muskulatur z. B. von *Eisenia*, *C. elegans* und anderen ist für α -Aktinin beschrieben (zusammenfassend in: Sjöblom *et al.*, 2008 und in Hooper & Thuma, 2005). Diese Aspekte unterstützen die Annahme, dass α -Aktinin auch in den Hautmuskelschläuchen von *L. terrestris* Bestandteil der Z-Stäbe ist.

α -Aktinin ist auch in Nicht-Muskelzellen sowohl der Vertebraten als auch der Evertbraten (Roulier *et al.*, 1992) nachgewiesen worden und dort an der Verankerung der Aktin-Filamente an der Membran beteiligt (Hampton *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass KT9 und KT10 muskelspezifisch sind und in anderen *C. elegans* Geweben keine Reaktion zeigen (Takeda *et al.*, 2008), ist erstaunlich, da bei *C. elegans* nur ein α -Aktinin-Gen bekannt ist, von dem verschiedene Spleiß-Varianten beschrieben sind. Somit ist anzunehmen, dass die monoklonalen Antikörper mit einem muskelspezifischen Teil des α -Aktinins interagieren, da sonst auch α -Aktinine in anderen Geweben angefärbt werden müssten.

Ein Vergleich der *C. elegans* α -Aktinin-Sequenzen (Wormbase: atn-1 WP_CE06539 (a); WP_CE21256 (b); WP_CE46675 (c); WP_CE46756 (d) im Weiteren mit a-d bezeichnet) liefern in zwei Bereichen Abweichungen.

Zum einen sind in den Varianten a und b die N-terminalen Bereiche um 71 Aminosäuren größer als in den Varianten c und d. Diese ersten 71 Aminosäuren enthalten die Aktin-Bindungsstelle 1 (ABS 1, Kap. 3.1.2), weshalb es fraglich ist, ob die Spleiß-Varianten c und d tatsächlich intakte α -Aktinine repräsentieren. Derartige α -Aktinine würden aufgrund der fehlenden ersten Bindungsstelle vermutlich eine verminderte Affinität zum Aktin aufweisen.

Zum anderen variieren die Neck-Regionen zwischen der zweiten Calponin homologen Domäne und dem ersten Spektrin-Repeat, wobei die Varianten a und c eine längere (Abb. 43, unterstrichen) und die Varianten b und d eine zweite kürzere (Abb. 43, fett) Neck-Region aufweisen.

Die weiteren Sequenzen sind in allen vier Varianten identisch. Da die Antikörper spezifisch an das Muskel- α -Aktinin binden, ist anzunehmen, dass die muskelspezifischen Eigenschaften in einem der variierenden Bereiche zu finden ist, vermutlich eher in der Neck-Region, da die längere N-terminale Sequenz die für die Funktion des α -Aktinins notwendige Aktin-Bindungsstelle enthält.

```

WP_CE06539-a      MVDYYQQPPSYHQPGYDYTQEEEDWDREGLLDPWEKQKKFTAWCNSHLRKAGTSIDT 60
WP_CE46675-c      -----
WP_CE21256-b      MVDYYQQPPSYHQPGYDYTQEEEDWDREGLLDPWEKQKKFTAWCNSHLRKAGTSIDT 60
WP_CE46756-d      -----

WP_CE06539-a      IEEDFRNGLKMLLLEVISGEPLPKPDRGKMRFHKIANVNKALEYIESKGVKLVSIGAEE 120
WP_CE46675-c      -----MLLLEVISGEPLPKPDRGKMRFHKIANVNKALEYIESKGVKLVSIGAEE 49
WP_CE21256-b      IEEDFRNGLKMLLLEVISGEPLPKPDRGKMRFHKIANVNKALEYIESKGVKLVSIGAEE 120
WP_CE46756-d      -----MLLLEVISGEPLPKPDRGKMRFHKIANVNKALEYIESKGVKLVSIGAEE 49
                      *****

WP_CE06539-a      IVDGNVKMTLGLIWTIILRFAIQDINVEELSARDGLLLWCQKRTAPYNNVNVQNFHNSWK 180
WP_CE46675-c      IVDGNVKMTLGLIWTIILRFAIQDINVEELSARDGLLLWCQKRTAPYNNVNVQNFHNSWK 109
WP_CE21256-b      IVDGNVKMTLGLIWTIILRFAIQDINVEELSARDGLLLWCQKRTAPYNNVNVQNFHNSWK 180
WP_CE46756-d      IVDGNVKMTLGLIWTIILRFAIQDINVEELSARDGLLLWCQKRTAPYNNVNVQNFHNSWK 109
                      *****

WP_CE06539-a      DGLAFCALIHRHRPDLDDYSQLHKGDPIHNLNLAFDIAEKHLDIPKMLDAEDVSR-HPDE 239
WP_CE46675-c      DGLAFCALIHRHRPDLDDYSQLHKGDPIHNLNLAFDIAEKHLDIPKMLDAEDVSR-HPDE 168
WP_CE21256-b      DGLAFCALIHRHRPDLDDYSQLHKGDPIHNLNLAFDIAEKHLDIPKMLDAEDMANSQPDE 240
WP_CE46756-d      DGLAFCALIHRHRPDLDDYSQLHKGDPIHNLNLAFDIAEKHLDIPKMLDAEDMANSQPDE 169
                      *****:..:***

WP_CE06539-a      KSTMTYVSCFYHAFRNM RDPPPVIRQPPQVVVAPP PPRDWRKDAETAANRICRVLKV 299
WP_CE46675-c      KSTMTYVSCFYHAFRNM RDPPPVIRQPPQVVVAPP PPRDWRKDAETAANRICRVLKV 228
WP_CE21256-b      KAVMTYVSCYYHYFSGMR-----KAETAANRICRVLKV 273
WP_CE46756-d      KAVMTYVSCYYHYFSGMR-----KAETAANRICRVLKV 202
                      *: .*****: * * . * * .*****

```

Abb. 43: Vergleich der vier N-terminalen α -Aktinin-Sequenzen von *C. elegans*

Die α -Aktinin-Sequenzen von *C. elegans* bis zum ersten Spektrin-Repeat, die folgenden Sequenzen sind identisch und nicht dargestellt. Unterschiede ergeben sich durch Abspaltung der ersten 71 AS und der Spleiß-Varianten im Bereich der Neck-Region (unterstrichen bzw. fett gedruckt). Aktin-Bindungsstellen 1-3 grau unterlegt (Sjöblom *et al.*, 2008).

(Wormbase: atn-1 WP_CE06539 (a); WP_CE21256 (b); WP_CE46675 (c); WP_CE46756 (d))

Da das *L. terrestris* α -Aktinin von den Antikörpern KT9 und KT10 detektiert wird, ergibt sich die Frage mit welcher der *C. elegans* Sequenzen die größten Übereinstimmungen vorliegen. Der Sequenzvergleich lieferte im N-terminalen Bereich die größere Übereinstimmung mit den *C. elegans* α -Aktinin Varianten a und b. Diese beiden Varianten unterscheiden sich in der Neck-Region. Die Neck-Region der Variante b weist eine ähnliche Größe auf wie die des *L. terrestris* α -Aktinins, während die Variante a eine längere Neck-Region besitzt. Beide *C. elegans* Sequenzen zeigen aber im Vergleich zur Sequenz von *L. terrestris* im Bereich der Neck-Region einige Sequenzabweichungen, so dass hier nicht auf eine spezifische Bindungsstelle für die Antikörper im Bereich der Neck-Region geschlossen werden kann.

Bei weiteren Organismen variieren die Verbindungssequenzen zwischen der Aktin-Bindungsstelle und den Spektrin-Repeats ebenfalls. *D. melanogaster* besitzt ein Gen für α -Aktinin, das fünf Spleiß-Varianten liefert. Die Isoformen wurden verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben zugeordnet (Roulier *et al.*, 1992; UniProt: P18091). Da nur ein Gen in *D. melanogaster* für α -Aktinin vorhanden ist und α -Aktinine die Erfordernisse in den verschiedenen Geweben erfüllen müssen, ist zu erwarten, dass in der Gesamtsequenz alle

α -Aktinin-Variationen enthalten sind. Die gewebspezifischen Unterschiede sollten dann in den herausgeschnittenen Stücken zu finden sein. Die *Drosophila* Isoformen variieren im Bereich der 228. - 286. Aminosäure, der Neck-Region. Innerhalb dieses Bereichs befindet sich eine 25 Aminosäuren große Sequenz, die in der „langen“ *Drosophila* Isoform mit Abwandlungen doppelt vorkommt (Abb. 44).

Die α -Aktinine der Vertebraten werden durch verschiedene Gene codiert. Die humanen Isoformen α -Aktinin 2 und 3 sind in Muskelzellen, α -Aktinin 1 und 4 sind in Nicht-Muskelzellen lokalisiert. Im glatten Muskel befindet sich α -Aktinin 1 (Kap. 1.3). Auch diese α -Aktinine zeigen gewebsabhängige Variationen in ihren Sequenzen, neben denen in den Calmodulin-Domänen, auch im Bereich der Neck-Region (Abb. 44).

ACTN2_CHICKskm	NTPKPDERAIMTYVSCFYHAFAGAEC	-----	264
ACTN2_HUMANskm	NTPKPDERAIMTYVSCFYHAFAGAEC	-----	261
ACTN3_HUMANskm	NTPKPDEKAIMTYVSCFYHAFAGAEC	-----	268
ACTN1_CHICKnm	-----	IVGTARPDEKAIMTYVSSFYHAFSGAQK	255
ACTN1_CHICKsm	-----	IVGTARPDEKAIMTYVSSFYHAFSGAQK	255
ACTN1_HUMANnm	-----	IVGTARPDEKAIMTYVSSFYHAFSGAQK	254
ACTN4_CHICKnm	-----	IVNTARPDEKAIMTYVSSFYHAFSGAQK	266
ACTN4_HUMANnm	-----	IVNTARPDEKAIMTYVSSFYHAFSGAQK	273
ACTN_DROME nm	-----	QTALPDERAVMTYVSSYYHCFSGAQK	254
ACTN_DROME-lang	NTPKPDERAIMTYVSCFYHAFAGAEC	VGNN TALPDERAVMTYVSSYYHCFSGAQK	286
ACTN_DROME-lvm	NTPKPDERAIMTYVSCFYHAFAGAEC	VGNNV-----HVPEPTRQYTYVPNNYN	279
ACTN_DROME-adtm	NTPKPDERAIMTYVSCFYHAFAGAEC	-----	257
aALT	NSVKPDERSVMTYVSAFYHAFAGAEC	-----	257
CAEEL WP_a	VSRHPDEKSTMTYVSCFYHAFRNMRD	-----PPPPVIRQPPQRVVVAPPPERDWRKD	285
CAEEL WP_b	-----	MANSQPDEKAVMTYVSCYYHYFSGMRK	259
ACTNA_DICDI	--	MLDVVRPDEKSVMTYVAQYYHFFSASRK	236
AIN1_SCHPOa	-----	VCDVDRPDEKSIIMTYVAEYFHAFSTLDK	224

Abb. 44: Vergleich verschiedener α -Aktinin Neck-Regionen

aus unterschiedlichen Organismen und Geweben.

Zuordnung von Geweben und Entwicklungsstadien: Skelettmuskulatur (skm); glatte Muskulatur (sm); larvalen Muskulatur (lvm); adulten Muskulatur (adtm); Nicht-Muskelgewebe (nm). Darüberhinaus ist eine weitere Sequenzen mit einer längeren Neck-Region von *D. melanogaster* beschrieben (lang). Organismen: *H. sapiens* (HUMAN); *G. gallus* (CHICK); *D. melanogaster* (DROME); *C. elegans* (CAEEL); *L. terrestris* (LT); *D. discoideum* (DICDI); *S. pombe* (SCHPO).

Die weiteren Bezeichnungen geben die jeweiligen Isoformen an. Die blauen Bereiche in den Sequenzen zeigen die konservierten, übereinstimmenden Aminosäuren. Die variierenden, die sich bei Muskel- α -Aktininen wieder finden, sind gelb markiert, währenddessen die Aminosäuren, die in Nicht-Muskel- α -Aktininen zu finden sind, grün gekennzeichnet sind. Grau eingefärbte Aminosäuren kommen an dieser Position in zwei Varianten vor und sind nicht eindeutig einem Gewebe zuzuordnen.

Der Vergleich ermöglicht gewebsspezifische Muster der Neck-Region abzuleiten. Es gibt fünf definierte Positionen von Aminosäuren innerhalb der Neck-Region, die je nach Gewebe von spezifischen Aminosäuren besetzt werden (Abb. 44 gelb und grün). So ist in Muskel- α -Aktininen (mit Ausnahme der glatten Muskulatur) folgendes Muster erkennbar:

T-P-K-P-D-E-{R/K}-A-{I/V}-M-T-Y-V-S-C-{F/Y}-Y-H-A-F-A-G-A-{E/Q}-Q.

In allen anderen Geweben ist dieses Muster zu finden:

T-A-R-P-D-E-{R/K}-A-{I/V}-M-T-Y-V-S-S-{F/Y}-Y-H-A-F-S-G-A-{E/Q}-K.

In dem betrachteten 25 Aminosäuren langen Abschnitt der Neck-Region sind in der ermittelten *L. terrestris* α -Aktinin-Sequenz von den fünf muskelspezifischen Aminosäuren nur drei vorhanden, allerdings keine der nicht-muskelspezifischen. Die Sequenzen von *C. elegans* weichen in diesem Bereich insoweit von dem beschriebenen Muster ab, als dass lediglich zwei nicht-muskelspezifische Aminosäuren in der Isoform b und d vorkommen und in allen Isoformen (a-d) eine muskelspezifische Aminosäure zu finden ist. Dennoch finden sich in der Neck-Region auch hier die konservierten Bereiche mit den Variationen an genau den fünf gewebsspezifischen Positionen. In den *C. elegans* Isoformen a und c ist die beschriebene Neck-Region (25 AS) ebenso wie in der larvalen Isoform von *Drosophila* darüber hinaus noch verlängert.

Bezieht man weitere α -Aktinine bzw. α -Aktinin-artige Proteine in diesen Vergleich mit ein, lassen sich auch diese in muskuläre und nicht-muskuläre α -Aktinine einordnen. Z. B. können so das α -Aktinin von *Dictyostelium* wie auch das α -Aktinin-artige Protein der Spaltheife (*S. pombe*) den nicht-muskulären α -Aktininen zugeordnet werden (Abb. 44).

4.1.3 Funktionen der Neck-Region

Die Sekundärstruktur der Neck-Region ist unbekannt (Hampton *et al.*, 2007), somit kann über die Auswirkung der Variation der Aminosäuren nur spekuliert werden. Wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde, weisen α -Aktinine eine hohe Flexibilität in der Vernetzung von Aktin-Filamenten auf. Für α -Aktinin aus der glatten Muskulatur, deren Neck-Region der Nicht-Muskel-Variante entspricht, ist sowohl eine bevorzugt antiparallele Anordnung der Aktin-Filamente (Meyer & Aeby 1990) beschrieben, wie eine bevorzugt parallele Anordnung in Anwesenheit einer Lipid-Schicht (Taylor *et al.*, 2000), ebenso wurden beide Anordnungen gemeinsam beobachtet (Hampton *et al.*, 2007). Die nicht-muskelspezifischen Varianten lassen möglicherweise eine größere Variabilität in der Orientierung zu, während in den Z-Scheiben der Muskeln die Aktin-Filamente antiparallel vernetzt werden. Für die

gewebsspezifische Orientierung der Aktin-Bindungsstelle scheint die Neck-Region von besonderer Bedeutung zu sein.

Es ist zu vermuten, dass es auch beim *L. terrestris* weitere Varianten der Neck-Region gibt, die einer Nicht-Muskel-Variante entsprechen. Obwohl in ersten DNA-Analysen keine möglichen Spleiß-Varianten der Neck-Region-Sequenz gefunden wurden sollten diese Untersuchungen fortgesetzt werden.

4.1.4 Interaktionen von α -Aktinin und ihre Bedeutung

Eine grundlegende Eigenschaft des α -Aktinins ist die Quervernetzung von Aktin-Filamenten. Die Interaktion des hier isolierten α -Aktinins mit Aktin konnte in Kosedimentations-Experimenten qualitativ nachgewiesen werden. Innerhalb eines Ansatzes konnte eine Konzentrationsabhängigkeit gezeigt werden, eine quantitative Auswertung scheiterte aber an der breiten Streuung der Werte. Die Ansätze mit α -Aktinin, das aus dem „Waschschritt“ bzw. aus dem Extraktionsschritt gewonnen wurde, verhielten sich unterschiedlich (nicht dargestellt). Eine Mischung aus beiden wies ein gemittelttes Sedimentationsverhalten auf, was vermuten lässt, dass es sich um verschiedene Isoformen oder Modifikationen des α -Aktinins mit unterschiedlichen Affinitäten zum Aktin handelt. So könnte ein N-terminal verkürztes α -Aktinin, wie es den *C. elegans* Sequenzen c und d entsprechen würde, eine verminderte Affinität zum Aktin aufweisen. Das α -Aktinin des „Waschschritts“ wurde bereits durch das Homogenisieren und die Zugabe des Waschpuffers, der lediglich 3 mM Tris und PMSF enthielt, gelöst. Somit war die Affinität dieser α -Aktinin Population bei niedriger Ionenstärke gering. Bereits Kuroda *et al.* (1994) beschrieben, dass die α -Aktinin/F-Aktin-Interaktion stark von der Ionenstärke abhängt und, dass bei geringen Salzkonzentrationen (10 mM KCl) nur wenig α -Aktinin gebunden wird.

Ein zweiter Teil des α -Aktinins aggregierte mit weiteren Muskel-Proteinen und ließ sich durch Zentrifugation pelletieren. Erst durch die Extraktionsbedingungen wurden diese Aggregate gelöst. Die Affinität des extrahierten α -Aktinins zu Aktin war in den Kosedimentations-Experimenten geringer als die des aus dem „Waschschritt“ gewonnenen α -Aktinins.

Weitere Ursachen für die variierenden Affinitäten können neben proteolytischen Effekten auch posttranslationale Modifikationen, z. B. im Bereich der Aktin-Bindungsstellen, sein. So liegt in den von Sjöblom *et al.* (2008) beschriebenen Aktin-Bindungsstellen ABS 1 bis 3 bei dem humanen α -Aktinin 2 (ABS 1: 40. - 49.; ABS 2: 114. - 140.; ABS 3: 146. - 164. Aminosäure) eine Phosphorylierungsstelle (S 147p) (PhosphoSitePlus).

In humanem α -Aktinin 4 konnten Shao H. *et al.* (2010) zeigen, dass die Phosphorylierung (Y 31p) im Bereich der Aktin-Bindungsstelle 1 die Affinität zum Aktin reduziert. Da die Sequenzen in diesen Bereichen hochkonserviert sind und an den genannten Positionen der Phosphorylierungsstellen auch in der α -Aktinin-Sequenz von *L. terrestris* Serin bzw. Tyrosin vorhanden sind, ist eine Phosphorylierung und damit ein Einfluss auf die α -Aktinin/Aktin-Interaktion denkbar. Die Variationen in der Affinität zum Aktin und die Vielzahl der Spots in der 2D-Elektrophorese unterstützen die Hypothese, dass verschiedene posttranslationale Modifikationen der *L. terrestris* α -Aktinine vorliegen.

In Nicht-Muskelzellen unterliegt die Interaktionen zwischen α -Aktinin und Aktin einem ständigen Wechsel, hier erfolgt die Regulation neben den Phosphorylierungen an den Aktin-Bindungsstellen über die Bindung von Ca^{2+} an die Calmodulin-Domäne des α -Aktinins (Izaguirre *et al.*, 1999; Izaguirre *et al.*, 2001; Shao *et al.*, 2010).

Für α -Aktinin aus *D. discoideum* konnte gezeigt werden, dass die erste EF-Hand der Calmodulin-Domäne eine geringe und die zweite eine hohe Affinität zu Ca^{2+} besitzt. Die regulatorische Funktion liegt in der ersten EF-Hand, Mutationen in der ersten EF-Hand inhibieren die Interaktion zu Aktin. Mutationen der zweiten EF-Hand verringern die Affinität zu Ca^{2+} erheblich, aber inhibieren die Interaktion zu Aktin nicht grundsätzlich. Die Regulation der Interaktion bedarf dann wesentlich höherer Ca^{2+} Konzentrationen (Witke *et al.*, 1993).

Eine solche Ca^{2+} abhängige Regulation der Interaktion von α -Aktinin mit F-Aktin ist typisch für Nicht-Muskel- α -Aktinine (Sjöblom *et al.*, 2008) und liegt bei den α -Aktininen aus den Hautmuskelschläuchen von *L. terrestris* nicht vor. Das Sedimentationsverhalten in den Kosedimentationsansätzen ist Ca^{2+} unabhängig und auch in Harnstoffgelen konnte keine Bindung von Ca^{2+} an α -Aktinin nachgewiesen werden (nicht dargestellt). In der α -Aktinin-Sequenz von *L. terrestris* sind drei EF-Hand Motive erkennbar. Diese sind degeneriert (Tabelle 6), wie die EF-Hände der Vertebraten Muskel- α -Aktinine, die nicht Ca^{2+} sensitiv sind, weil der ersten EF-Hand eine und der zweiten drei der sechs Liganden fehlen, die mit Calcium Ionen komplexieren (Wenegieme *et al.*, 1994). Die fehlende Calcium-Sensitivität entspricht dem für Muskel- α -Aktinine beschriebenen Verhalten, die nicht Ca^{2+} reguliert sind (Sjöblom *et al.*, 2008).

Auch für das *D. melanogaster* Muskel- α -Aktinin konnte gezeigt werden, dass es kein Ca^{2+} bindet (Dubreuil *et al.*, 1991). Jeder der EF-Hände fehlet mindestens einer der sechs Liganden (Tabelle 9), um Ca^{2+} zu binden.

Koordinierter Ligand	X		Y		Z		-Y		-X			-Z
Kanonische Sequenz	D	K	D	G	D	G	T	I	D	F	E	E
AS die häufig vorkommen		A/ Q/ T/ V/ J/ S/ E/ R	N	K/ R/ N	N/ S		F/ K/ Q/ Y/ E/ R	V/ L	S/ T/ E/ N/ G/ Q	Y/ A/ T/ L/ E/ K	R/ K/ A/ P/ N	D
<u>α-Aktinin</u>												
<i>D. melanogaster</i>												
EF I 791	D	K	N	R	T	G	R	L	S	P	E	E
EF II 832	D	P	N	N	T	G	Y	V	H	F	D	A
<i>C. elegans</i>												
EF I 791	D	K	E	R	A	G	L	D	P	E	Q	L
EF II 831	D	P	N	R	M	G	R	V	P	F	E	A

Tabelle 9: Der Vergleich der EF-Hand-Motive der Calmodulin-Domäne aus den α-Aktinin-Sequenzen von *D. melanogaster* und *C. elegans* mit der kanonischen EF-Hand Sequenz. Positionen der konservierten Sequenzen, an denen keine Aminosäuren angegeben sind, können mit beliebigen Aminosäuren besetzt sein. Die für die koordinative Bindung der Calcium Ionen entscheidenden Positionen der Liganden in dem Loop der EF-Hände werden mit X; Y; Z; -Y; -X und -Z beschrieben (Gifford *et al.*, 2007) und sind hier grau unterlegt. Die Liganden, die Ca²⁺ koordinativ binden sind fett gedruckt, sowohl in der kanonischen Sequenz (Gifford *et al.*, 2007), als auch in den EF-Händen der α-Aktinin-Sequenzen. Die Häufigkeit bezieht sich auf die Aminosäuren der kanonischen Sequenz im Vergleich zu weiteren Ca²⁺ bindenden EF-Hand-Domänen. Die hierin vorkommenden alternativen Aminosäuren sind in der Zeile darunter dargestellt.

Die verschiedenen Spleiß-Varianten der *D. melanogaster* α-Aktinine weisen in den Calmodulin-Domänen keine Unterschiede auf. Ebenso sind die Calmodulin-Domänen der *C. elegans* α-Aktinine identisch, obwohl sie im Muskel- wie auch im Nicht-Muskelgewebe vorkommen. Aufgrund der degenerierten EF-Hände ist zu vermuten, dass auch die jeweiligen Nicht-Muskel-α-Aktinine keine Calcium Sensitivität besitzen. Eine Unterscheidung der Muskel- und Nicht-Muskel-α-Aktinine kann in diesem Fall nur über die dargestellten Strukturunterschiede der Neck-Region erfolgen und nicht wie sonst üblich über die Fähigkeit Ca²⁺ zubinden.

4.1.5 Der Einfluss von Phospholipiden.

Phospholipide spielen eine bedeutende Rolle im Aufbau der Z-Scheiben. So konnten Bullard *et al.* (1990) zeigen, dass in Z-Scheiben (*Lethocerus*), die ohne Triton isoliert wurden, der Anteil an Phospholipiden deutlich erhöht ist und dass neutrale Phospholipide, wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, hier überwiegen. Negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin besitzen in den Z-Scheiben eine untergeordnete Rolle, sind aber im sarkoplasmatischen Retikulum vermehrt zu finden (Bullard *et al.*, 1990).

Der besondere Aufbau der schräggestreiften Muskulatur liegt unter anderem darin, dass keine Z-Scheiben sondern versetzt angeordnete Z-Stäbe vorhanden sind. Zwischen diesen Z-Stäben ist das Tubuläre System, eine Abwandlung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), eingelagert (Abb. 2). Somit liegt zwischen zwei Z-Stäben ein Membransystem, das dem SR entspricht und im kontrahierten Zustand im Bereich der Z-Stäbe liegt. Eine Interaktion des Tubulären Systems mit den Z-Stäben wäre möglich und damit auch ein Einfluss von negativ geladenen Phospholipiden z. B. Phosphatidylserin auf α -Aktinin.

Han *et al.* (1997) zeigten, dass α -Aktinin aus der glatten Muskulatur an Vesikel bindet, die in ihrer Membran negativ geladene Phospholipide enthalten, währenddessen keine Bindung auftritt, wenn die Vesikelmembranen nur neutrale Phospholipide enthalten. Diese Interaktion mit Membranen, die Phosphatidylserin enthalten, bewirkt eine Veränderung der Sekundärstruktur des α -Aktinins (Han *et al.*, 1997).

Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass Phosphatidylserin einen hemmenden Effekt auf die α -Aktinin/Aktin-Interaktion hat, könnte auf einer solchen Änderung der Sekundärstruktur beruhen. Vorstellbar wäre eine Reduktion der α -Aktinin/Aktin-Interaktion in den Z-Stäben im stark kontrahierten Zustand. Ein Grund für die schwächere Interaktion von α -Aktinin und Aktin könnte die Zunahme des Durchmessers der Muskelzelle sein, die sich zwangsläufig aus der Kontraktion ergibt.

Scott *et al.* (2006) konnten aus computerbasierten Sequenzanalysen zwei Lipid-Bindungsstellen ableiten, die besonders für negativ geladene Phospholipide geeignet erscheinen (Abb. 45 b). Diese werden in den Randbereichen der Spektrin-Repeats (α -Aktinin *G. gallus*) beschrieben und sind so konserviert, dass die Motive mit geringen Abweichungen auch in der α -Aktinin-Sequenz von *L. terrestris* zu finden sind.

Für das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) ist eine weitere Bindungsstelle beschrieben, die in vielen α -Aktininen zu finden ist. Diese Bindungsstelle für PIP_2 ist ein hochkonservierter Bereich in der Calponin-Domäne, der direkt neben der Aktin-Bindungsstelle lokalisiert ist (Fukami *et al.*, 1996; Young & Gautel, 2000; Fraley *et al.*, 2003) (Abb. 45 a). Auch durch diese PIP_2 Bindung wird die Interaktion zwischen α -Aktinin und Aktin moduliert. In Vertebraten Muskeln ist die α -Aktinin/Aktin-Interaktion erhöht, wenn PIP_2 in Konzentrationen von 5-10 $\mu\text{g/ml}$ vorliegt, während höhere Konzentrationen einen hemmenden Effekt besitzen (Fukami *et al.*, 1992). Von Fraley *et al.* (2003) wurde ebenfalls ein inhibierender Effekt von PIP_2 auf die Vernetzung von F-Aktin durch α -Aktinin beschrieben. Young & Gautel (2000) zeigten darüber hinaus, dass PIP_2 die Affinität von α -Aktinin zu Titin erhöht.

Auch in der α -Aktinin-Sequenz von *L. terrestris* sind die beschriebenen Lipid-Bindungsstellen vorhanden, wobei die PIP_2 -Bindungsstelle am höchsten konserviert ist. Neben den experimentellen Befunden, legen die weitgehenden Sequenzübereinstimmungen nahe, dass

auch das *L. terrestris* α -Aktinin an negativ geladene Lipide, wie PIP₂ bindet, und dass diese Einfluss auf die α -Aktinin/Aktin-Interaktion haben.

a)	ABS 2	ABS 3	PIP₂-Bindungsstelle	
ACTN1	KGVKLVSIGAEEIVDGNVKMTLGMIIWIIILFAIQDISVEETSAKEGLLWCQRKTAPYKNVNIQNFHISWKDGLGF	179		
ACTN2	KGVKLVSIGAEEIVDGNVKMTLGMIIWIIILFAIQDISVEETSAKEGLLWCQRKTAPYRNVNIQNFHTSWKDGLGL	186		
ACTN3	KGVKLVSIGAEEIVDGNLKMIIWIIILFAIQDISVEETSAKEGLLWCQRKTAPYRNVNIQNFHTSWKDGLAL	193		
ACTN_Dm	KGVHLVSIAGAEIVDGNLKMIIWIIILFAIQDISVEEMTAKEGLLWCQRKTAPYKNVNIQNFHLSFKDGLAF	182		
aALt	KGVRLVSIGSEEVVDGNLKMIIWIIILFAIQDISVEEMTAKEGLLWCQRKTAPYKNVNIQNFHLSFKDGLAF	182		
	.:*:***** *****:*****:*****:****:**** *:****.:			
b)	Lipid-Bindungsstelle	Lipid-Bindungsstelle		
ACTN1_CH	YEKLASDLLEWIRRTIPWLENRAPE 304	ACTN1_CH	WEQLTTIARTINEVENQILTRDAK 742	
aALt	YERMASDLLEWIRTRPWLENRTTD 306	aALt	WEQLVTSSYRSINETENQILTRDSK 743	
	.:*** *****:..		****:*. *:***.*****:*	

Abb. 45: Die Aktin- und Lipid-Bindungsstellen von α -Aktinin

a) Sequenzvergleich der Aktin- und PIP₂-Bindungsstellen
Die hoch konservierte Bindungsstelle für PIP₂ (grün; Fukami *et al.*, 1996) befindet sich direkt neben der dritten Aktin-Bindungsstelle (ABS 3, orange), die von Sjöblom *et al.* (2008) beschrieben wurde. Verglichen wurden die humanen α -Aktinin-Sequenzen 1 (ACTN1), 2 (ACTN1) und 3 (ACTN1) mit den α -Aktinin-Sequenzen von *D. melanogaster* (ACTN_Dm) und *L. terrestris* (aALt).

b) Sequenzvergleich der Lipid-Bindungsstellen negativ geladener Phospholipide (grün; Scott *et al.*, 2006) von α -Aktinin 1 aus *G. gallus* (ACTN1_CH) und *L. terrestris* α -Aktinin (aALt).

Die ermittelte *L. terrestris* Sequenz (Anhang) liefert erhebliche Übereinstimmungen mit anderen α -Aktininen im Bereich der Aktin-, der PIP₂-Bindungsstelle (Fukami *et al.*, 1996) und den Lipid-Bindungsstellen (Scott *et al.*, 2006) (Abb. 45). Der sich direkt an die Neck-Region anschließende Bereich entspricht dem Muster der Z-Repeats in den Titinen der Vertebraten. Dieser Bereich bewirkt dort die Autoinhibition des nativen α -Aktinins und verhindert die Interaktion mit dem Titin (Young & Gautel, 2000; Kap. 1.3, Abb. 6).

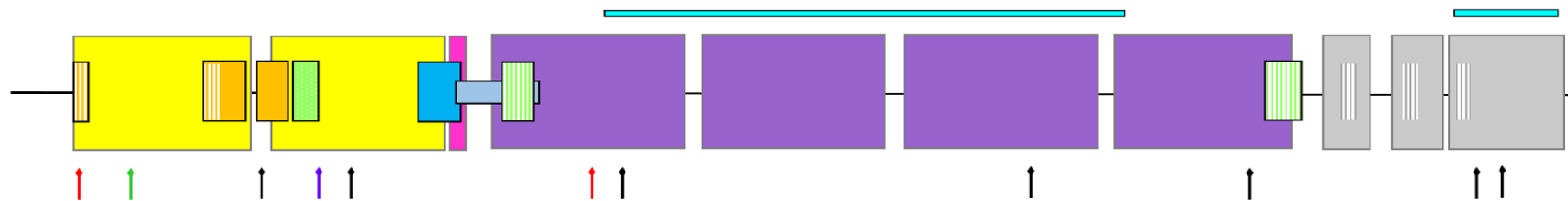


Abb. 46 Schema von *L. terrestris* α -Aktinin (vgl. Abb. 23)

Aus Sequenzvergleichen abgeleitete Domänen und Bindungsstellen im α -Aktinin von *L. terrestris*.

Die Calponin-Domänen (CH; gelb) enthalten die drei Aktin-Bindungsstellen ABS 1 bis ABS 3 (Sjöblom *et al.*, 2008) (orange). Bereiche geringer Komplexität (pink) stellen die Verbindung zu den vier Spektrin-Repeats (lila) her. Die Calmodulin-Domänen (grau) enthalten die EF-Hände (grau gestreift). Die PIP₂-Bindungsstelle (Fukami *et al.*, 1996) (grün gefüllt) ist in der zweiten Calponin-Domäne lokalisiert. Von den weiteren Lipid-Bindungsstellen (Scott *et al.*, 2006) (grün gestreift) liegt eine im ersten Spektrin-Repeat und die zweite am Ende des vierten Spektrin-Repeats. Die muskelspezifische Neck-Region (blau) verbindet die zweite Calponin-Domäne und den Neck-Bereichen geringer Komplexität. Hieran schließt sich die Z-Region (Young & Gautel, 2000) (hellblau) an, die die Titin-Bindungsstelle der Calmodulin-Domäne des zweiten α -Aktinin inhibieren kann. Die Titin-Bindungsstellen (türkise Balken) befinden sich im Bereich der Spektrin-Repeats und eine zweite in der zweiten Calmodulin-Domäne. Die Positionen möglicher posttranslationaler Modifikationen (Pfeile) sind aus dem Sequenz-Vergleich mit humanem α -Aktinin 2 abgeleitet: Acetylierung (blau), Methylierung (grün), Phosphorylierungen (schwarz) und Ubiquitierungen (rot).

4.1.6 Die Interaktion von α -Aktinin und Titin

Gautel *et al.* (1996) beschrieben, dass natives, vollständiges α -Aktinin nicht mit Titin interagiert. Im Gegensatz dazu zeigten Ohtsuka *et al.* (1997) und Sorimachi *et al.* (1997) mit C-terminalen α -Aktinin-Fragmenten eine Interaktion mit Titin. Young und Gautel (2000) konnten diesen Widerspruch erklären, in dem sie nachwiesen, dass die α -Aktinin/Titin-Interaktion durch die anionischen Phospholipide Phosphatidylserin und PIP_2 reguliert wird. In Anwesenheit der genannten Phospholipide wird die Inhibierung der α -Aktinin/Titin-Interaktion aufgehoben. Sie stellten dar, dass die Interaktion durch einen intramolekularen Phospholipid regulierten Pseudoligand Mechanismus kontrolliert wird (Young & Gautel 2000, s. Einleitung, Abb. 6).

In dem Bereich zwischen der zweiten Calponin-Domäne und dem ersten Spektrin-Repeat des α -Aktinins wurden 30 Aminosäuren identifiziert, die den Z-Repeats des Titins homolog sind. Diese Titin homologen Bereiche des einen α -Aktinin Monomers können im dimerisierten Zustand mit der C-terminalen Titin-Bindungsstelle im Bereich der Calmodulin-Domäne des zweiten α -Aktinins interagieren (Young & Gautel, 2000; Atkinson *et al.*, 2000). Der den Z-Repeats des Titins homologe Bereich im humanen α -Aktinin 2, im folgenden Z-Region genannt, entspricht im α -Aktinin von *L. terrestris* den Aminosäuren 255 – 283 (Abb. 46, hellblau). Diese sind konserviert, lediglich drei Aminosäuren weichen von der beschriebenen Sequenz in humanem α -Aktinin 2 ab. Auffallend ist die räumliche Nähe der verschiedenen beschriebenen Bereiche. So folgt innerhalb einer α -Aktinin-Sequenz auf die Aktin-Bindungsstelle direkt eine PIP_2 -Bindungsstelle gefolgt von der Neck-Region und der sich anschließenden Z-Region mit der Lipid-Bindungsstelle in der ersten Spektrin-Domäne. Darüber hinaus liegen im dimerisierten Zustand die Titin-Bindungsstelle und die zweite Lipid-Bindungsstelle, die direkt vor der Calmodulin-Domäne angeordnet ist, ebenfalls in dieser Region. Dieser komplexe Aufbau (Abb. 46) legt nahe, dass Wechselwirkungen zwischen zwei Bindungspartnern, wie Aktin, Titin oder Phospholipiden und dem dimerisierten α -Aktinin nicht nur die beiden Partner betreffen. Interagiert α -Aktinin mit einem dieser Partner hat das auch Auswirkungen auf die weiteren Bindungspartner.

So fördern die anionischen Phospholipide Phosphatidylserin und PIP_2 die α -Aktinin/Titin-Interaktion. Hierdurch wird aber auch die α -Aktinin/Aktin-Interaktion gehemmt (Young & Gautel, 2000). Dieser Effekt auf die α -Aktinin/Aktin-Interaktion konnte in den Kosedimentations-Experimenten auch für das α -Aktinin aus der schräggestreiften Muskulatur gezeigt werden (Kap. 3.3.5), während der Nachweis des fördernden Einflusses auf die α -Aktinin-Titin Interaktion nicht eindeutig ist. Hinweise auf eine Interaktion von α -Aktinin mit Titin liefern lediglich die Beobachtungen, dass in der Präparation immer auch titinartige

Proteine mit dem α -Aktinin erscheinen, und dass sich nach der Ultrazentrifugation α -Aktinin und titinartige Proteine im Pellet befinden (Kap. 3.6). Detailliertere Untersuchungen der α -Aktinin/Titin Interaktion und der Wirkung von Phospholipiden hierauf fehlen bisher und sollten Gegenstand weiterer Kosedimentations-Experimente sein.

4.2 Die titinartigen Proteine

Ein Titin ist durch seine Größe, die lang fädige Struktur, den modularen Aufbau aus Immunglobulin- (Ig) und Ig/Fibronektin III-Domänen (Fn III) und seine Funktionen definiert.

In der quergesteiften Vertebraten Muskulatur überspannt ein Titin eine halbe Sarkomerlänge von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Fürst *et al.*, 1988). Der I-Banden assoziierte Teil enthält neben einer PEVK-Region titintypische Sequenzen in die viele Ig-Domänen eingebettet sind. Diese Ig-Domänen treten in Clustern auf, die durch ihre gleichartige Abfolge von 3 x 6 und 3 x 10 Ig-Domänen gekennzeichnet sind (Tskhovrebova & Trinick, 2010). Dieser Teil des Titins vermittelt die passive Spannung und Elastizität des Muskels. Der A-Banden assoziierte Teil interagiert mit den dicken Filamenten über Ig- und Fn III-Domänen, die ebenfalls in Super-Repeats (7 x 7 und 11 x 11) angeordnet sind (Tskhovrebova & Trinick, 2010). Die bei Vertebraten gefundenen Isoformen variieren in den Bereichen der I-Bande, der Z- und der M-Linien Region. Der A-Banden assoziierte Teil ist weniger variabel (Tskhovrebova & Trinick, 2010). Die verschiedenen Titin-Isoformen bewirken funktionelle Unterschiede und sind ebenso in unterschiedlichen Muskeltypen zu finden, wie auch innerhalb eines Muskeltyps.

Die Vielfalt der titinartigen Proteine der Evertrebraten spiegelt die größere Variationsbreite im Aufbau der Muskeln von wirbellosen Tieren wider. So sind z. B. in der quergestreiften Muskulatur der Evertrebraten erhebliche Unterschiede in den Sarkomergrößen bekannt. Die schräggestreifte Muskulatur, wie sie im Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* vorkommt, ist ein spezieller Muskeltyp, in dem die großen Sarkomere eine besondere Anordnung aufweisen. In diesen, großen Sarkomeren, kann ein Titin-Molekül nicht ein halbes Sarkomer überspannen, zumal die größten Evertrebraten Titine kleiner sind als die Vertebraten Titine.

Deutlich wird die große Variationsbreite der titinartigen Proteine (Abb. 5) z. B. bei *D. melanogaster*, hier codiert das Gen Sallimus (*S/s*) unter anderem für die größten *D. melanogaster* Titine (D-Titine). Durch unterschiedliches Spleißen werden mindestens 13 Titin-Isoformen (flybase.org) erzeugt, theoretisch können sogar bis zu 144 Isoformen gebildet werden (Burkart *et al.*, 2007). Beschrieben sind sechs D-Titin-Varianten mit 2,1 MDa bis 1,8 MDa, eine weitere Variante mit 1,2 MDa und zwei kürzere als Kettin oder SIs (700) bezeichnete Varianten (flybase.org; Kulke *et al.*, 2001). Diese D-Titin-Varianten besitzen

keinen oder nur einen sehr kleinen Teil an Ig- und Fn III-Domänen und ähneln strukturell dem I-Banden assoziierten Teil der Vertebraten Titine.

In der indirekten Flugmuskulatur, die besonders schmale I-Banden besitzt, verbindet das Kettin die Z-Scheibe mit den dicken Filamenten und ist für die passive Festigkeit des Muskels verantwortlich (Kulke *et al.*, 2001). In der Thorax- und der Beinmuskulatur konnte Kettin neben D-Titin nachgewiesen werden und befindet sich nahe der Z-Scheibe (Burkart *et al.*, 2007). Der N-terminale Teil der SIs-Sequenz entspricht dem Kettin und enthält 35 Ig-Domänen, die in allen weiteren Isoformen ebenfalls enthalten sind.

Ähnlichkeiten mit dem A-Banden assoziierten Teil der Vertebraten Titine besitzen die Projektime, von denen fünf Varianten mit 1 MDa - 0,9 MDa aufgeführt werden, für diese codiert das Bent-Gen (flybase.org).

Betrachtet man darüber hinaus die titinartigen Proteine aus der schräggestreiften Muskulatur anderer Evertrebraten, findet man für *C. elegans* ein Ce-Titin Gen, das für titinartige Proteine mit 2200 kDa, 1200 kDa und 300 kDa codiert, die in der I-Bande lokalisiert wurden (Flaherty *et al.*, 2002). Die ersten 100 Aminosäuren des 2200 kDa Titins sind in den Z-Stäben der schräggestreiften Muskulatur verankert (Flaherty *et al.*, 2002). Daneben existieren Twitchin (789 kDa), das durch *unc-22* codiert wird (Flaherty *et al.*, 2002).

Aus dem Hautmuskelschlauch des Polychaeten *Neanthes* sind titinartige Proteine mit molekularen Massen von 4000 kDa, 1200 kDa und 700 kDa beschrieben (Kawamura *et al.*, 1994). Das 700 kDa Protein ist im Bereich der Myosin-Filamente, das 1200 kDa Protein an den Z-Stäben lokalisiert und das 4000 kDa Protein wird als Verbindung zwischen den Z-Stäben und dem Beginn der Myosin-Filamente beschrieben (Izawa *et al.*, 2005).

Die große Variationsbreite der titinartigen Proteine der Evertrebraten erfordert eine Einordnung, welche der hier isolierten Proteine aus dem Hautmuskelschlauch des *L. terrestris* den I-Banden assoziierten Titinen ähneln und welche den A-Banden assoziierten Projektime bzw. Twitchinen. Schwer zu beurteilen ist, ob es sich bei den dargestellten titinartigen Proteinen des *L. terrestris* jeweils um Isoformen oder Fragmente des Titins handelt.

Eine erste Einordnung der hochmolekularen Proteine erfolgte anhand der Mobilitäten in SDS-Gelen und den daraus abgeleiteten Molekularmassen (Kap. 3.5.1). Im Bereich der hochmolekularen Titine konnten mindestens drei Banden und im Bereich der Mini-Titine eine Doppelbande dargestellt werden.

Die Abschätzung der jeweiligen Molekularmassen beruht auf der Annahme, dass ein lineares Verhältnis zwischen dem Logarithmus der Molekularmasse und den relativen Mobilitäten besteht. Insgesamt können die Angaben über die Verhältnisse der Mobilitäten der einzelnen

titinartigen Proteine innerhalb eines Gels zwar als zuverlässig angesehen werden, die ermittelten molekularen Massen sind aber nur als grobe Abschätzungen zu betrachten und sollen hier als Anhaltspunkt zur weiteren Auswertung dienen.

Zur weiteren Einordnung der hochmolekularen Proteine wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (Kap. 3.5.2). Sie zeigen das erwartete und mehrfach beschriebene Bild titinartiger Proteine, lange flexible Fäden, die verknäult vorliegen, sofern sie nicht ausgerichtet werden (Nave *et al.*, 1989). Die Längenbestimmungen ermöglichen es, die Gruppen der hochmolekularen Titine und der Mini-Titine genauer zu charakterisieren und weitere Untergruppen zu unterscheiden. Allerdings wird bei der Interpretation der gemessenen Längen der Aspekt der möglichen Elastizität nicht mit in Betracht gezogen, da die geringe Anzahl der Messwerte eine vereinfachte Betrachtungsweise nahelegt.

Der I-Banden assoziierte Teil des Titins besitzt elastische Eigenschaften. So beschreiben Fukuzawa *et al.* (2001), dass das Titin der Krebscheren-Muskulatur die gesamte I-Bande überspannt. Bei der Dehnung des Muskels wird das Titin von 1 μm auf bis zu 3,5 μm gestreckt. Diese Variationen der Längen müsste im elektronenmikroskopischen Bild eine enorm breite Streuung der Längen bewirken, da Proteine in der gesamten Spanne zwischen gestreckter und entspannter Form vorkommen können. Vermutlich sind die Proteine zunächst überwiegend entspannt. Durch das Ausrichten per Zentrifugation der auf frisch gebrochenem Glimmer gesprühten Proteine können diese gestreckt werden. Deshalb erscheint auch eine statistische Auswertung der bestimmten Titinlängen nicht sinnvoll.

Dennoch vermitteln die hier gemessenen Längen des *L. terrestris* Titins eine gute Größenvorstellung. Demnach ist das Titin 1 ca. 1,2 μm lang. Dieses entspricht der Größenordnung, die für Vertebraten Titin angegeben wird, das mit einer Länge von 1250 nm beschrieben ist (Suzuki *et al.*, 1994). Dieses ermöglicht den Vertebraten Titinen, die mit den Z-Repeats in der Z-Scheibe verankert sind, eine halbe Sarkomerlänge zu überspannen (Fürst *et al.*, 1988).

Für das Titin der schräggestreiften Muskulatur von *L. terrestris* ist das fraglich, da die Entfernung zwischen dem Z-Stab und der M-Linie über 7 μm beträgt (Abschätzungen aus EM-Bildern in D'Haese & Ditgens, 1987) und somit die Länge eines Titin-Moleküls vermutlich nicht über die halbe Sarkomerlänge reicht. Für Evertrebraten Titine aus *D. melanogaster* und aus *Astacus* ist eine Lokalisation in der I-Bande beschrieben (Tskhovrebova & Trinick, 2003). Die Verankerung der Titine in den Z-Elementen der Evertrebraten ist allerdings unklar (für *C. elegans* beschrieben von Ferrara *et al.*, 2005). So sind die in den Vertebraten Titinen beschriebenen Z-Repeats, die sich durch eine hydrophobe Region mit einigen konservierten

Aminosäuren auszeichnen (Young und Gautel, 2000), z. B. in der *D. melanogaster* Titin-Sequenz nicht zu finden. Deshalb wird vermutet, dass die Verankerung der Titine in den Z-Elementen Wirbelloser nicht der bei Vertebraten Titinen entspricht.

Da titinartige Proteine modular aufgebaut sind und etwa 90% der Masse auf sich wiederholenden Immunglobulin (Ig)- und Fibronektin III (Fn III)-Domänen beruhen (Kontogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2009), wurde ein charakteristisches Massen/Längen-Verhältnis angenommen.

Diese Annahme stellt eine starke Vereinfachung dar, da außer Acht gelassen wird, dass sich der Aufbau des Vertebraten Titins im Bereich der A-Bande von dem in der I-Bande unterscheidet (Tskhovrebova & Trinick, 2003). In der A-Bande überwiegen die Ig-/Fn III-Super-Repeats während in dem I-Banden assoziierten Teil neben PEVK-Region und titintypische Sequenzen überwiegend Ig-Domänen zu finden sind (Tskhovrebova & Trinick, 2003). Die Titine der Evertrebraten zeigen einen ähnlichen Aufbau wie der I-Banden assoziierte Titin-Teil der Vertebraten, währenddessen Projektin bzw. Twitchin eher dem A-Banden Teil entsprechen (Tskhovrebova & Trinick, 2003).

Demnach sollte das Masse/Längen-Verhältnis der Vertebraten Titine einen mittleren Wert zwischen den Werten der Projektine und der Evertrebraten Titine liefern.

Die ermittelten Quotienten (Kap. 3.5 Tabelle 7) bestätigen diese Annahme und zeigen darüber hinaus, dass es sich bei den gemessenen titinartigen Proteinen von *L. terrestris* um zwei verschiedene Gruppen handelt. Die Mini-Titine (MTD und MTS) haben mit 4,2 bzw. 4,3 kDa/nm Längen/Massen-Verhältnisse, die dem des Projektins ähneln und erheblich von den *L. terrestris* Titinen mit Quotienten von 1,5 kDa/nm abweichen.

Der Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Massen/Längen-Quotienten titinartiger Proteine wird in Tabelle 10 gezeigt. Es werden nur solche Beispiele dargestellt, deren Längen bekannt sind und für die die molekularen Massen aus den Sequenzen abgeleitet werden konnten.

Protein Organismus	Masse [kDa]	Länge [nm] Quelle	Quotient [kDa/nm]
Projektin <i>Procambarus</i>	963	240 Hu <i>et al.</i> , 1990	4,0
Titin bzw. α -Connectin <i>Oryctolagus</i>	ca. 3800	1250 Suzuki <i>et al.</i> , 1994	3,0
Titin <i>Procambarus</i>	1962	1000-3300 Fukuzawa <i>et al.</i> , 2001	1,9 - 0,6

Tabelle 10: Übersicht bekannter Massen und Längen titinartiger Proteine

Das Projektin aus der Krebsscheren-Muskulatur (*Procambarus*) hat mit 4,0 kDa/nm den größten Quotienten der titinartigen Proteine, während das Titin des *Procambarus* mit 1,9 bis 0,6 kDa/nm im entspannten als auch gespannten Zustand deutlich niedrigere Werte besitzt.

Die Werte der *L. terrestris* Mini-Titine 1 und 2, die beide in den mit Natriumphosphat isolierten Fraktionen MTD und MTS enthalten sind, stimmen mit denen des Projektins überein und lassen sich deutlich von den kleineren Werten der Evertebraten Titine abgrenzen. Außerdem eluieren MTD und MTS im Durchfluss und im ersten Peak der DEAE-Säule, sowie das Projektin aus der Krebsscheren-Muskulatur (Hu *et al.*, 1990). Darüber hinaus reagieren die Antikörper gegen *Locusta* Projektin mit diesen Proteinen und liefern zwei Banden im Bereich der Mini-Titine. Das elektronenmikroskopische Bild und die ermittelte Länge von MTD und MTS entsprechen der beschriebenen fädigen Struktur der Projektine mit Längen im Bereich von 240 nm (Hu *et al.*, 1990) bis 260 nm (Nave & Weber 1990). Somit wird davon ausgegangen, dass es sich bei MTD und MTS um Projektin-Isoformen von *L. terrestris* handelt.

Wird in der Mini-Titin-Präparation der Phosphat-Extrakt mit Ammoniumsulfat 38%iger Sättigung gefällt, ist in dem gelösten Pellet kein MTD und MTS enthalten, sondern AMS-MT, das andere Eigenschaften besitzt. Es eluiert erst ab einem Salzgehalt von 330 mM NaCl von der MacroPräp HQ Säule (Abb. 27), reagiert nicht mit den Projektin-Antikörpern (Abb. 35), und das Ammoniumsulfat Pellet ist gut löslich. Diese Eigenschaften entsprechen denen, die für ein Titin-Fragment aus der Skelettmuskulatur von *G. gallus* beschrieben wurden (Tanabe *et al.*, 1994). Dieses ist Z-Scheiben assoziiert und ragt in die I-Bande hinein. Eine Interaktion dieses Titin-Fragments aus *G. gallus* mit α -Aktinin wurde nachgewiesen (Tanabe *et al.*, 1994). Das AMS-MT pelletierte in der Ultrazentrifugation mit α -Aktinin, aber ein eindeutiger Nachweis für die Interaktion fehlt.

Die MS-Analyse belegt, dass das AMS-MT von *L. terrestris* ein titinartiges Protein ist, dessen Aufbau überwiegend den I-Banden assoziierten Teilen der Titine entspricht. Lediglich das Sequenzstück „DIVEG“, das auch in der humanen Titin-Sequenz enthalten ist und dort im A/I-Banden-Übergang lokalisiert ist, weicht ab. Es ist im Gegensatz zu allen anderen sequenzierten Stücken Teil einer Fibronectin-III-Domäne, die in der A-Bande liegt.

Auch das AMS-MT ist wahrscheinlich ein Titin-Fragment, das in der I-Bande lokalisiert ist. Die Sequenz liefert mit dem Teil der Fibronectin-III-Domäne einen Hinweis darauf, dass das AMS-MT u. U. bis zum A/I-Banden-Übergang reicht. Andererseits spricht die Sedimentation mit dem α -Aktinin für eine mögliche Verankerung in den Z-Stäben. Die Lokalisation innerhalb der I-Bande bzw. an den Z-Stäben wäre mit geeigneten Antikörpern immunhistologisch zu klären.

Die Differenzen der Molekularmassen der Titine 1 und 2 (1,5 - 1,7 MDa) beträgt ca. 150 kDa (Kap. 3.5 Tabelle 7). Eine solche Fragment-Größe wäre, in Anbetracht der groben Abschätzungen, mit den 170 kDa und 185 kDa Banden in Einklang zu bringen.

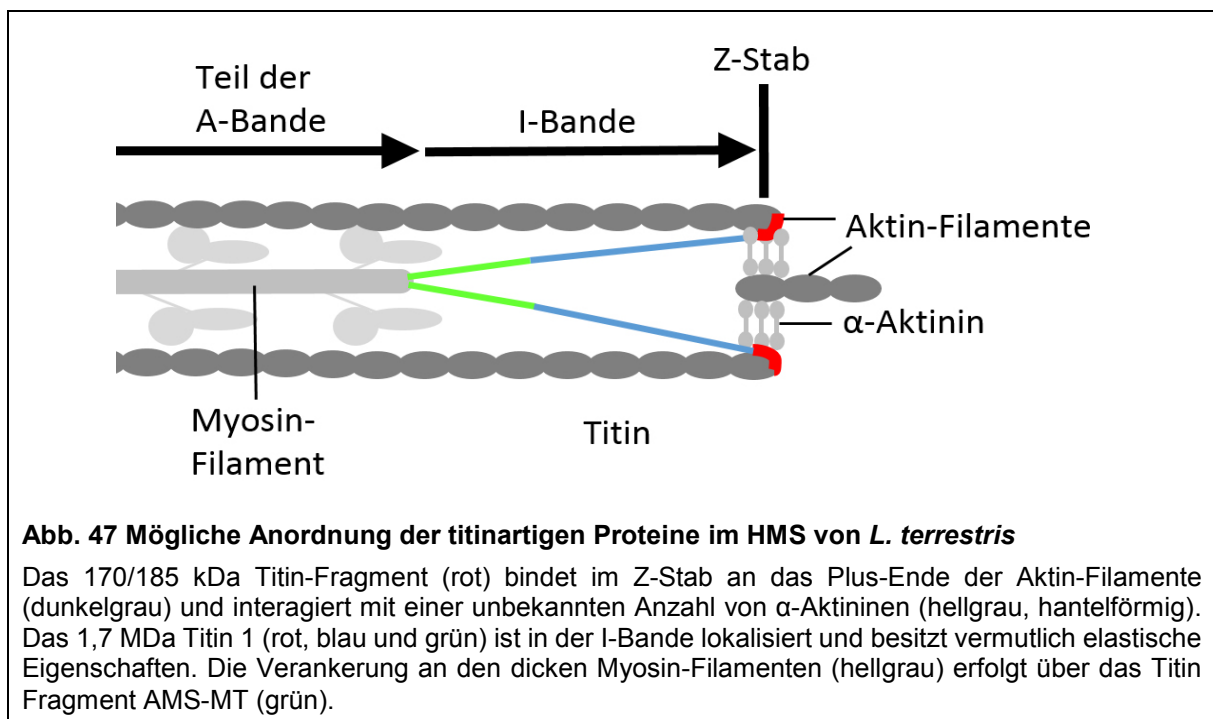
Die Ergebnisse der MS-Analyse zeigen, dass die 170 kDa und 185 kDa Banden überwiegend N-terminale Peptide des Titins liefern, aber auch zwei, die weiter C-terminal orientiert sind. Diese könnten auf Varianten hinweisen, die in ihrem Aufbau dem SIs (700), einer Spleiß-Variante des D-Titins, ähneln (Kulke *et al.*, 2001). In diesen sind N-terminale mit C-terminalen Anteilen des Titins verknüpft, und dazwischen liegende Stücke der Titin-Sequenz sind heraus geschnitten. Kulke *et al.* (2001) konnten zeigen, dass das SIs (700) bzw. Kettin von Calpain verdaut werden und damit auch die passive Festigkeit des Muskels deutlich reduziert wird. Die entstehenden Fragmente liefern eine Doppelbande unterhalb von 200 kDa, die den 170/185 kDa Banden des *L. terrestris* entsprechen könnten. Es bleibt offen, welches titinartige Protein hier fragmentiert, das hochmolekulare Titin oder eine kleinere Spleiß-Variante. Zur Klärung sollten Verdauungsexperimente durchgeführt werden. Außerdem könnte mit Antikörpern gegen die 170 und 185 kDa Banden nachgewiesen werden, welche der größeren Proteine fragmentieren.

Als Verdauungsenzym sollte Calpain 3 verwendet werden, eine Calcium abhängige Cystein-Protease, die hauptsächlich im Muskel vorkommt und an Titin bindet (Duguez *et al.*, 2006). Calpain ist im Bereich der Z-Scheibe und in der Mitte der I-Bande lokalisiert (Duguez *et al.*, 2006). Postmortal ist es für die Proteolyse des Muskels verantwortlich. Raynaud *et al.* (2005) konnten zeigen, dass Calpain an zwei Titin-Regionen der I-Bande bindet, ein Z-Scheiben assoziiertes 150 kDa Fragment, das den N-terminalen Titin-Teil enthält, und ein 800 kDa Fragment. Calpain wird sowohl durch Calcium Ionen induziert (Raynaud *et al.*, 2005) als auch durch Phospholipide beeinflusst (Bullard *et al.*, 1990). Ein entsprechender Calpain Verdau könnte während der Präparation erfolgt sein, da keine Cystein Proteasehemmer eingesetzt wurden. Ein solcher Verdau kann unterbunden werden, wenn die Präparation durchgängig mit 5 mM EGTA erfolgt.

Von dem Mini-Titin AMS-MT und dem 170/185 kDa Fragment sind keine elektronenmikroskopischen Bilder erstellt worden, deshalb können sie nicht über ihren Massen/Längen-Quotienten eingeordnet werden. Da die 170/185 kDa Fragmente mit Aktin und α -Aktinin interagieren (Kap. 3.6 und 3.7) und die in der MS-Analyse ermittelten Sequenzen von AMS-MT und den 170/185 kDa Fragmenten (Kap. 3.5.4) überwiegend I-Banden assoziiert sind, wird davon ausgegangen, dass es sich um Fragmente von Titinen handelt, die in der I-Bande lokalisiert sind.

Unter dieser Annahme wird für das AMS-MT und die 170/185 kDa Fragmente der für die I-Banden-Titine bestimmte Massen/Längen-Quotient von 1,5 kDa/nm angewendet, um mögliche Längen ableiten zu können. Für die 170/185 kDa Fragmente ergeben sich Längen von ca. 110 nm und 120 nm und für das AMS-MT, dessen molekulare Masse im Bereich von 900-1000 kDa angenommen wird, ergibt sich eine Größenordnung von 600-700 nm. Die Länge des Titins 1 wurde mit 1,2 μm bestimmt.

Wird jetzt in der schräggestreiften Muskulatur von *L. terrestris* ein die gesamte I-Bande überspannendes Titin angenommen, sollte dieses mindestens eine Länge von 1,7 μm haben (Abschätzungen aus EM Bildern in D'Haese & Ditgens, 1987). Unter der Annahme, dass das Titin 1 entspannt eine Länge von 1,2 μm hat und entsprechend dem *Procambarus* Titin um mehr als das Dreifache gedehnt werden kann (Fukuzawa *et al.*, 2001), wäre die Verknüpfung der Z-Stäbe mit den dicken Filamenten möglich. Die 170/185 kDa Fragmente könnten dann der Teil des Titins sein, der in den Z-Stäben verankert ist. Es ist vorstellbar, dass das AMS-MT ein Fragment des Titins ist, das in den A/I-Banden-Übergang hineinreicht (Abb. 47).



Im Gegensatz zu diesen Überlegungen sind aber auch Spleiß-Varianten des Titins möglich, die dem Kettin entsprechen und in denen die 170/185 kDa Titin-Fragmente und AMS-MT Stücke enthalten sind.

Die Untersuchungen des Kettins sind überwiegend mit der indirekten Flugmuskulatur von *Drosophila* durchgeführt worden. Es überspannt dort die gesamte, aber hier besonders kleine, I-Bande. Alle Kettin-Domänen sind auch im D-Titin enthalten.

Das Kettin besitzt eine hohe Affinität zum Aktin und verdrängt im Bereich der Z-Scheibe das Tropomyosin aus der Aktin-Bindung. Darüber hinaus bindet es simultan an α -Aktinin und Aktin und fördert die antiparallele Anordnung der Aktin-Filamente (van Straaten *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen sind mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Einklang zu bringen, da für die 170/185 kDa Titin-Fragmente die Interaktion mit Aktin in Kosedimentationen viskosimetrisch und fluorometrisch gezeigt werden konnte. Die gezeigte Interaktion der 170/185 kDa Fragmente mit dem Plus-Ende des F-Aktins spricht ebenfalls für die Lokalisation in den Z-Stäben, da das Plus-Ende des F-Aktins in den Z-Stäben verankert ist.

In den Z-Scheiben der Vertebraten Muskulatur bindet das Protein Cap Z an das schnell wachsende Ende der Aktin-Filamente. Ein entsprechendes Protein, Capping Protein (CP), ist von *Drosophila* bekannt, es hat 82%ige Sequenzübereinstimmung mit dem humanen Cap Z. CP bindet ebenfalls an das schnell wachsende Ende der Aktin-Filamente und ist sowohl in Muskel- als auch in Nicht-Muskelzellen zu finden (Hopmann *et al.*, 1996).

Somit ist die Bedeutung der Interaktion von 170/185 kDa Fragmente mit den Plus-Enden des F-Aktins unklar. Ob es sich hierbei um die Verankerung eines der titinartigen Proteine in den Z-Stäben handelt und wie diese im Detail aussieht ist offen. Bisher ist z.B. nicht bekannt, ob es ein dem CP entsprechendes Protein in der schräggestreiften Muskulatur des *L. terrestris* gibt, das um die Bindungsstelle am Plus-Ende des Titin konkurrieren müsste. Zur Klärung könnten die fluorometrischen Messungen mit den 170/185 kDa Fragmenten und Aktin in Anwesenheit eines Capping Proteins z. B. Cap Z durchgeführt werden. Sind die Plus-Enden der Nukleationskeime durch Cap Z blockiert, ist anzunehmen, dass die 170/185 kDa Fragmente keinen Einfluss auf die weitere Polymerisation haben.

Mit den in dieser Arbeit gelegten Grundlagen können weiterführend sowohl strukturelle als auch funktionelle Untersuchungen der titinartigen Proteine und von α -Aktinin durchgeführt werden. Hierzu gehören z. B. quantitative Untersuchungen der Interaktion von α -Aktinin, den 170/185 kDa Fragmenten und Aktin. Darüber hinaus können eine Vielzahl weiterer Interaktionspartner des α -Aktinins (Abb. 3) aus der schräggestreiften Muskulatur ermittelt werden, um mehr Informationen über den Aufbau der Z-Stäbe zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Die schräggestreifte Muskulatur, wie sie im Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* vorkommt, ist ein spezieller Muskeltyp, in dem die Sarkomere durch Z-Stäbe begrenzt werden. Die Querschnitte dieser Z-Stäbe weisen in Bezug auf die Längsachse eine schräge Anordnung auf. Ein wesentlicher Bestandteil der Z-Stäbe ist das α -Aktinin, das hier isoliert und charakterisiert wurde. So konnte gezeigt werden, dass das α -Aktinin von *L. terrestris* die α -Aktinin typischen Eigenschaften besitzt. Es reagierte mit verschiedenen α -Aktinin-Antikörpern positiv, hat eine 35 nm lange hantelförmige Struktur, die molekulare Masse des Monomers beträgt ca. 100 kDa und die des nativen Dimers ca. 200 kDa. Die isoelektrischen Punkte liegen im Bereich von 5,7 pI und es interagiert mit Aktin, wobei diese Interaktion nicht Ca^{2+} reguliert ist. Die DNA-Sequenz des *L. terrestris* α -Aktinins zeigt weitgehende Übereinstimmungen mit den bekannten α -Aktinin-Sequenzen. Ein allgemeiner Vergleich der α -Aktinin Spleiß-Varianten von Muskel- und Nicht-Muskel- α -Aktininen lieferte gewebsspezifische Unterschiede in der Neck-Region. Hiernach wurde das *L. terrestris* α -Aktinin als muskeltypisch eingeordnet.

Innerhalb der Z-Stäbe sind neben den dünnen Aktin-Filamenten auch die superdünnen Titin-Filamente verankert. Wobei die Gruppe der titinartigen Proteine bei den Evertrebraten deutlich vielfältiger ist. Hier wurden aus der schräggestreiften Muskulatur von *L. terrestris* eine Reihe titinartiger Proteine isoliert und charakterisiert. Zum einen die mit Harnstoff isolierten hochmolekularen Titine mit ca. 1700 kDa. Zum anderen die mit Natriumphosphat isolierten ca. 1000 kDa Mini-Titine, deren AMS-Pellet nicht löslich war und die mit Projektin- und Twitchin-Antikörpern eine positive Reaktion zeigten. Beide Gruppen lieferten fädige Strukturen, mit Längen von 1,2 μm und 250 nm. Hieraus ermittelte Massen/Längen-Quotient legen eine Lokalisation des Titins in der I-Bande und des Mini-Titins in der A-Bande nahe.

In der α -Aktinin Präparation wurden weitere titinartige Proteine mit ca. 1000 kDa und um 185 kDa beobachtet, die nicht mit den Projektin-Antikörpern reagierten und deren AMS-Pellets löslich waren. In der MS-Analyse ermittelte Sequenzen wiesen darauf hin, dass diese titinartigen Proteine in der I-Bande lokalisiert sind.

Bei den Proteinen um 185 kDa handelt es sich vermutlich um Titin-Fragmente. Es konnte gezeigt werden, dass diese mit α -Aktinin und Aktin sedimentieren. Sie interagieren mit Aktin und haben einen hemmenden Einfluss auf die Polymerisation, sie verhindern die Anlagerung der Aktinmonomere an das Plus-Ende der Aktin-Filamente. Die für diese Fragmente ermittelten Sequenzen entsprechen N-terminalen Titin Bereichen, die in den I-Banden nahe der Z-Elemente lokalisiert sind.

Summary

The obliquely striated muscle, as found in the body wall of *L. terrestris*, is a special type of muscle distinguished, among other things, by the staggered oblique arrangement of Z-rods. Very little information is available about the construction of these Z-rods. An essential component of the Z-rod is the α -Actinin, which has been isolated and characterized here.

It could be shown that the α -Actinin of *L. terrestris* possesses the typical traits of α -Actinin. It reacts positively with different α -Actinin antibodies and has a 35 nm long rod-shaped structure. The molecular mass of the monomer is about 100 kDa, and that of the native dimers is around 200 kDa. The isoelectric points lie within the range of 5.7 pI. It interacts with actin whereby the interaction is not Ca^{2+} regulated. The DNA sequence of α -Actinin shows broad agreement with the known α -Actinin sequences. A general comparison of the α -Actinin splice variants of muscle and non-muscle α -Actinin revealed tissue-specific differences in the neck region. Accordingly, the *L. terrestris* α -Actinin was classified as muscle-specific.

A further aspect of the present work was the anchoring of thin actin- and ultrathin titin-filaments within the Z-rods. The ultrathin filaments are composed of titin-like proteins, whereby in invertebrates this group contains more variations. A series of titin-like proteins from the obliquely striated muscle fibers of *L. terrestris* were isolated and characterized. On the one hand there was the high molecular titin with c. 1700 kDa isolated with urea. On the other hand there was c. 1000 kDa mini-titin isolated with sodium pyrophosphate whose AMS pellet was not soluble and that showed a positive reaction with projectin and twitchin antibodies. Both groups revealed thread-like structures with a lengths of 1,2 μm and 250 nm. The length/mass quotient suggests a localization of titin in the I-band and mini-titin in the A-band.

In the preparation of the α -Actinin further titin-like proteins with c. 1000 kDa and around 185 kDa were observed, which did not react with the projectin antibodies and whose AMS pellets were soluble. The sequences determined in the MS analysis indicated that these titin-like proteins are localized in the I-band.

The proteins around 185 kDa are presumably titin fragments. It was possible to demonstrate that these sedimented together with α -Actinin and actin. They interact with actin and have an inhibiting effect on the polymerization and prevent the addition of monomers to the plus end of the actin filament. The determined sequences for these fragments correspond to N-terminal titin regions that are localized in the I-band near the Z-elements.

6 Quellen

6.1 Literatur

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., Stockinger, H. (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res.*, Web server issue, 10.1093/nar/gks400
- Atkinson, R. A., Joseph, C., Dal Piaz, F., Birolo, L., Steir, G., Pucci, P., Pastore, A. (2000) Binding of α -actinin to titin: Implications for Z-disc assembly. *Biochem.* 39(18):5255-5264.
- Atkinson, R.A., Joseph, C., Kelly, G., Muskett, F.W., Frenkiel, T.A., Nietlispach, D., Pastore, A. (2001) Ca^{2+} -independent binding of an EF-hand domain to a novel motif in the alpha-actinin-titin complex. *Nat. Struct. Biol.* 8(10):853-7.
- Bang, M.-L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A.J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C. C., Labeit, D., Gregorio, C. C., Granzier, H., Labeit, S. (2001) The complete gene sequence of titin, expression of an unusual ~700 kDa titin isoform and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ. Res.* 89(11):1065-1072.
- Beggs, A. H., Byers, T. J., Knoll, J., Boyce, F. M., Bruns, G., Kunkel, L. M. (1992) Cloning and characterisation of two human skeletal muscle α -actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J. Biol. Chem.* 267(13):9281-9288.
- Benian, G. M., L'Hernault, S. W., Morris, M. E. (1993) Additional sequence complexity in the muscle gene, *unc-22*, and its encoded protein, twitchin, of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 134(4):1097-1104.
- Blanchard, A., Ohanian, V., Critchley, D. (1989) The structure and function of α -actinin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10(4):280-289.
- 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.
- Bullard, B., Garcia, T., Benes, V., Leake, M. C., Linke, W. A., Oberhauser, A. F. (2006) The molecular elasticity of the insect flight muscle proteins projectin and kettin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(12):4451-4456.
- Bullard, B., Linke, W. A., Leonard, K. (2002) Varieties of elastic protein in invertebrate muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 23(5-6):435-447.
- Bullard, B., Sainsbury, G., Miller, N. (1990) Digestion of proteins associated with the Z-disc by calpain. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 11(3):271-279.
- Burkart, C., Qiu, F., Brendel, S., Benes, V., Hååg, P., Labeit, S., Leonard, K., Bullard, B. (2007) Modular proteins from the *Drosophila* sallimus (sls) gene and their expression in muscles with different extensibility. *J. Mol. Biol.* 367(4):953-69.
- Champagne, M. B., Edwards, K. A., Erickson, H. P., Kiehart, D. P. (2000) *Drosophila* stretchin-MLCK is a novel member of the titin/myosin light chain kinase family. *J. Mol. Biol.* 300(4):759-77.
- Chi, R. J., Simon, A. R., Bienkiewicz, E. A., Felix, A., Keller, T. C. (2008) Smooth muscle titin Zq domain interaction with the smooth muscle alpha-actinin central rod. *J. Biol. Chem.* 283(30):20959-20967.

- Condeelis, J., Vahey, M., Carboni, J. M., DeMey, J., Ogihara, S. (1984) Properties of the 120,000- and 95,000-dalton actin-binding proteins from *Dictyostelium discoideum* and their possible functions in assembling the cytoplasmic matrix. *J. Cell Biol.* 99(1 Pt 2):119-126.
- Cooper, J. A., Walker, S.B. and Pollard, T.D. (1983) Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J Muscle Res. Cell Motil.* 4(2):253-262.
- D'Haese, J., Ditgens, A. (1987) Studies on isolated obliquely striated muscle cells-shearing mechanism implicated in contraction without Z-rods. *Eur. J. Cell Biol.* 44:79-85.
- Ditgens, A., D'Haese, J., Small, J. V., Sobieszek, A. (1982) Properties of tropomyosin from the dual-regulated obliquely striated body wall muscle of the earthworm (*Lumbricus terrestris* L.). *J Muscle Res. Cell Motil.* 3(1):57-74.
- Dixon, J. D., Forstner, M. R. J., García, D. M. (2003) Evolutionary history of the alpha-actinin gene family: a phylogenetic study. *J. Mol. Evol.* 56(1):1-10.
- Djinovic-Carugo, K., Gautel, M., Ylanne, J., Young, P. (2002) The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Lett.* 513(1):119-123.
- Dubreuil, R. R., Brandin, E., Reisberg, J. H., Goldstein, L. S., Branton, D. (1991) Structure, calmodulin-binding, and calcium-binding properties of recombinant alpha spectrin polypeptides. *J. Biol. Chem.* 266(11):7189-7193.
- Duguez, S., Bartoli, M., Richard, I. (2006) Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS J.* 273(15):3427-36.
- Endo, T., Masaki, T. (1982) Molecular properties and functions in vitro of chicken smooth-muscle alpha-actinin in comparison with those of striated-muscle alpha-actinins. *J. Biochem.* 92(5):1457-1468.
- Faulkner, G., Lanfranchi, G., Valle, G. (2001) Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle. *IUBMB Life* 51(5):275-82. DOI: 10.1080/152165401317190761
- Feramisco, J. R., Burridge, K. (1980) A rapid purification of alpha-actinin, filamin, and a 130,000-dalton protein from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 255(3):1194-1199.
- Ferrara, T. M., Flaherty, D. B., Benian, G. M. (2005) Titin/connectin-related proteins in *C. elegans*: a review and new findings. *J Muscle Res Cell Motil.* 26(6-8):435-47.
- Flaherty, D. B., Gernert, K. M., Shmeleva, N., Tang, X., Mercer, K. B., Borodovsky, M., Benian, G. M. (2002) Titins in *C. elegans* with unusual features: coiled-coil domains, novel regulation of kinase activity and two new possible elastic regions. *J. Mol. Biol.* 323(3):533-549.
- Fraley, T. S., Tran, T. C., Corgan, A. M., Nash, C. A., Hao, J., Critchley, D. R., Greenwood, J. A. (2003) Phosphoinositide binding inhibits alpha-actinin bundling activity. *J. Biol. Chem.* 278(26):24039-24045.
- Frank, D., Frey, N. (2001) Cardiac Z-disc signaling network. *J. Biol. Chem.* 276(12):9897-904.
- Fukami, K., Furuhashi, K., Inagaki, M., Endo, T., Hatano, S., Takenawa, T. (1992). Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for α -actinin function. *Nature* 359(6391):150-152.
- Fukami, K., Sawada, N., Endo, T., Takenawa, T. (1996) Identification of a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site in chicken skeletal muscle alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* 271(5):2646-2650.
- Fukuzawa, A., Shimamura, J., Takemori, S., Kanzawa, N., Yamaguchi, M., Sun, P., Maruyama, K., Kimura, S. (2001) Invertebrate connectin spans as much as 3.5 microm in the giant sarcomeres of crayfish claw muscle. *EMBO J.* 20(17):4826-4835.

- Fürst, D. O., Osborn, M., Nave, R., Weber, K. (1988) The organisation of titin filaments revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at Z line extends close to the M line. *J. Cell Sci.* 106(5):1563-1572.
- Fyrberg, E., Kelly, M., Ball, E., Fyrberg, C., Reedy, M.C. (1990) Molecular genetics of *Drosophila* α -actinin: mutant alleles disrupt Z disc integrity and muscle insertions. *J. Cell Biol.* 110(6):1999-2011.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker, J. M. (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. pp. 571-607.
- Gautel, M., Goulding, D., Bullard, B., Weber, K., Fürst, D. O. (1996) The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J. Cell Sci.* 109(Pt 11):2747-54.
- 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 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270(6):2644-2651.
- 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.* 225(3):773-779.
- Gifford, J. L., Walsh, M. P., Vogel, H. J. (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+} -binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. J.* 405(2):199-221.
- Goll, D. E., Dayton, W. R., Singh, I., Robson, R. M. (1991) Studies of the α -actinin/actin interaction in the Z-disc by using calpain. *J. Biol. Chem.* 266(13):8501-10.
- Graw, J. (2010) *Genetik*. 5. Aufl., Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- Hakeda, S., Endo, S., Saigo, K. (2000) Requirements of kettin, a giant muscle protein highly conserved in overall structure in evolution, for normal muscle function, viability, and flight activity of *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 148(1):101-14.
- Hampton, C. M., Taylor, D. W., Taylor, K. A. (2007) Novel structures for α -actinin: F-actin interactions and their implications for actin-membrane attachment and tension sensing in the cytoskeleton. *J. Mol. Biol.* 368(1):92-104.
- Han, X., Li, G., Lin, K. (1997) Interactions between smooth muscle α -actinin and lipid bilayers. *Biochem.* 36(34):10364-10371.
- Hanson, J. (1957) The structure of the smooth muscle fibers in the body-wall of the earth worm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3(1):111-122.
- Heumann, H.-G., Zebe, E. (1967) Über Feinbau und Funktionweise der Fasern aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms, *Lumbricus terrestris*. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 78:131-150.
- Hooper, S. L., Thuma, J.B. (2005) Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. *Physiol. Rev.* 85(3):1001-1060.
- Hopmann, R., Cooper, J. A., Miller, K. G. (1996) Actin organization, bristle morphology, and viability are affected by actin capping protein mutations in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 133(6):1293-305.
- Hornbeck, P. V., Kornhauser, J. M., Tkachev, S., Zhang, B., Skrzypek, E., Murray, B., Latham, V., Sullivan, M. (2012) PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucl. Acids Res.* 40 (D1):D261-D270.
- Hu, D. H., Kimura, S., Maruyama, K. (1989) Myosin oligomers as the molecular mass standard in estimation of nebulin (ca. 800 kDa) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biomed. Res.* 10:165-168.

- Hu, D. H., Matsuno, A., Terakado, K., Matsuura, T., Kimura, S., Maruyama, K. (1990) Projectin is an invertebrate connectin (titin): isolation from crayfish claw muscle and localisation in crayfish claw muscle and insect flight muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1(6):497-511.
- Huttlin, E. L., Jedrychowski, M. P., Elias, J. E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S. A., Villén, J., Haas, W., Sowa, M. E., Gygi, S. P. (2010) A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 143(7):1174-1189.
- Huxley, H.E. (1963) Electron microscopic studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* 7:281-308.
- Izaguirre, G., Aguirre, L., Hu, Y. P., Lee, H. Y., Schlaepfer, D. D., Aneskievich, B. J., Haimovich, B. (2001) The cytoskeletal/non-muscle isoform of α -actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 276(31):28676-28685.
- Izaguirre, G., Aguirre, L., Ji, P., Aneskievich, B., Haimovich, B. (1999) Tyrosine phosphorylation of α -actinin in activated platelets. *J. Biol. Chem.* 274(52):37012-37020.
- Izawa, N., Fukuzawa, A., Kanzawa, N., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kimura, S. (2005) Partial sequence of connectin-like 1200K-protein in obliquely striated muscle of a polychaete (Annelida): evidence for structural diversity from vertebrate and invertebrate connectins. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 26(6-8):487-494.
- Jansohn, M., Rothhämel, S. (Hg.) (2012): *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verlag, 5. Auflage.
- Kawamura, Y., Suzuki, J., Kimura, S., Maruyama, K. (1994) Characterization of connectin-like proteins of obliquely striated muscle of polychaete (Annelida). *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15(6):623-632.
- Kim, K., Keller, T.C. (2002) Smitin, a novel smooth muscle titin-like protein, interacts with myosin filaments in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* 156(1):101-112.
- Knöll, R., Buyandelger, B., Lab, M. (2011) The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies. *J. Biomed. Biotech.* 2011:569628.
- Kobayashi, R., Itoh, H., Tashima, Y. (1983) Polymorphism of α -actinin. Electrophoretic and immunological studies of rabbit skeletal muscle α -actinins. *Eur. J. Biochem.* 133(3):607-611.
- Kolmerer, B., Clayton, J., Benes, V., Allen, T., Ferguson, C., Leonard, K., Weber, U., Knekt, M., Ansong, W., Labeit, S., Bullard, B. (2000) Sequence and expression of the kettin gene in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 296(2):435-448.
- Kontogianni-Konstantopoulos, A., Ackermann, M. A., Bowman, A. L., Yap, S. V., Bloch, R. J. (2009) Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis. *Physiol. Rev.* 89(4):1217-67.
- Kouyama, T., Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1-Pyrenyl)-iodoacetamide-labelled F-actin. *Eur. J. Biochem.* 114(1):33-38.
- Kulke, M., Fujita-Becker, S., Rostkova, E., Neagoe, C., Labeit, D., Manstein, D. J., Gautel, M., Linke, W. A. (2001) Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils. *Circ. Res.* 89(10):874-81.
- Kuroda, M., Kohira, Y., Sasaki, M. (1994) Conformational change of skeletal muscle α -actinin induced by salt. *Biochim. Biophys. Acta.* 1205(1):97-104.
- Labeit, S., Kolmerer, B. (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270(5234):293-296.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685.
- Lange, M., D'Haese, J. (1994) Superdünne Filamente der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris*. *Acta Biol. Benrodis* 6:157-173.
- Lanzavecchia, G., De Eguileor, M., Valvassori, R., Lanzavecchia, P. (1987) Analysis and reconstruction of unusual obliquely striated fibres in *Lumbricus* (Annelida, Oligochaeta). *J. Muscle Res. Cell Motil.* 8(3):209-219.
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkr931
- Luther, P. K. (2009) The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 30(5-6):171-185.
- Luther, P. K., Squire, J. M. (2002) Muscle Z-band ultrastructure: titin Z-repeats and Z-band periodicities do not match. *J. Mol. Biol.* 319(5):1157-1164.
- Machado, C., Andrew, D. J. (2000) D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J. Cell Biol.* 151(3):639-652.
- Meyer, R. K., Aebi, U. (1990). Bundeling of actin filaments by α -actinin depends on its molecular length. *J. Cell Biol.* 110(6):2013-2024.
- Mills, M. A., Yang, N., Weinberger, R. P., Vander Woude, D. L., Beggs, A. H., Easteal, S., North, K. N. (2001) Differential expression of the actin-binding proteins, α -actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum. Mol. Genet.* 10(13):1335–1346.
- Nave, R., Fürst, D. O., Weber, K. (1989) Visualization of the polarity of isolated titin molecules: A single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *J. Cell Biol.* 109(5):2177-2187.
- Nave, R., Weber, K. (1990) A myofibrillar protein in insect muscle related to vertebrate titin connects Z band to A band: purification and molecular characterization of invertebrate mini-titin. *J. Cell Sci.* 95(4):535-544.
- Ohtsuka, H., Yajima, H., Maruyama, K., Kimura, S. (1997) The N-terminal Z repeat 5 of connectin/titin binds to the C-terminal region of alpha-actinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235(1):1-3.
- Otey, C. A., Carpen, O. (2004) α -Actinin revisited: A fresh look at an old player. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58(2):104-111.
- Otey, C.A., Vasquez, G.B., Burridge, K., Erickson, B.W. (1993) Mapping of the α -actinin binding site within the β 1 integrin cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 268(28):21193-21197.
- Packer, H., Gooley, A., Wilkins, W. (2007): One gene, many proteins. In: Wilkins, M. R., Appel, R. D., Williams, K.L., Hochstrasser, D. F. (Hg.): *Proteome Research: Concepts, Technology and Application (Principles and Practice)*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2. Auflage. S. 95-121.
- Paniagua, R., Royuela, M., García-Anchuelo, R. M. (1996) Ultrastructure of invertebrate muscle cell types. *Histol. Histopathol.* 11(1):181-201.
- Pollard, T. D. (1982) A falling ball apparatus to measure filament cross-linking. *Meth. Cell Biol.* 24: 301-311.
- Raynaud, F., Fernandez, E., Coulis, G., Aubry, L., Vignon, X., Bleimling, N., Gautel, M., Benyamin, Y., Ouali, A. (2005) Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J.* 272(10):2578-2590.

- Rosenberg, S., Stracher, A., Burridge, K. (1981) Isolation and characterization of a calcium-sensitive alpha-actinin-like protein from human platelet cytoskeletons. *J. Biol. Chem.* 256(24):12986-12991.
- Roulier, E. M., Fyrberg, C., Fyrberg, E. (1992) Perturbations of *Drosophila* α -actinin cause muscle paralysis, weakness, and atrophy but do not confer obvious nonmuscle phenotypes. *J. Cell Biol.* 116(4): 911-922.
- Royuela M, Fraile B, Arenas MI, Paniagua R. (2000) Characterization of several invertebrate muscle cell types: a comparison with vertebrate muscles. *Microsc. Res. Tech.* 48(2):107-15.
- Royuela, M., Astier, C., Fraile, B., Paniagua, R. (1999) Alpha-actinin in different invertebrate muscle cell types of *Drosophila melanogaster*, the earthworm *Eisenia foetida*, and the snail *Helix aspersa*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 20(1):1-9.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-1354
- Schleicher, M., Noegel, A., Schwarz, T., Wallraff, E., Brink, M., Faix, J., Gerisch, G., Isenberg, G. A. (1988) *Dictyostelium* mutant with severe defects in alpha-actinin: its characterization using cDNA probes and monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* 90(1):59-71.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(11):5857-5864.
- Scott, D. L., Diez, G., Goldmann, W. H. (2006) Protein-lipid interactions: correlation of a predictive algorithm for lipid-binding sites with three-dimensional structural data. *Theor. Biol. Med. Model.* 2006(3):17.
- Shao, H., Wu, C., Wells, A. (2010) Phosphorylation of α -actinin-4 upon epidermal growth factor (EGF) exposure regulates its interaction with actin. *J. Biol. Chem.* 285(4):2591-2600.
- Sigrist, C. J. A., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Bulliard, V., Bairoch, A., Hulo, N. (2010). PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* 38:161-166.
- Singh, I., Goll, D. E., Robson, R. M., Stromer, M. H. (1977) N- and C-terminal amino acids of purified alpha-actinin. *Biochim. Biophys. Acta.* 491(1):29-45.
- Sjöblom, B., Salmazo, A., Djinović-Carugo, K. (2008) Alpha-actinin structure and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 65(17):2688-2701.
- Soika, I. (1995) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung superdünner Filamente der Schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris*, Düsseldorf, Staatsexamensarbeit.
- Sorimachi, H., Freiburg, A., Kolmerer, B., Ishiura, S., Stier, G., Gregorio, C. C., Labeit, D., Linke, W. A., Suzuki, K., Labeit, S. (1997) Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J. Mol. Biol.* 270(5):688-695.
- Spudich, J. A., Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem.* 246(15):4866-71.
- St. Pierre, S. E., Ponting, L., Stefancsik, R., McQuilton, P., and the FlyBase Consortium (2014) FlyBase 102 - advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res.* 42:780-788.
- Stein, I. D., Sternberg, P., Durbin, R., Thierry-Mieg, J., Spieth J. (2001) WormBase: network access to the genome and biology of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 29:82-86

- Suzuki, J., Kimura, S., Maruyama, K. (1994) Electron microscopic filament lengths of connectin and its fragments. *J. Biochem.* 116(2):406-410.
- Takeda, K., Watanabe, C., Qadota, H., Hanazawa, M., Sugimoto, A. (2008) Efficient production of monoclonal antibodies recognizing specific structures in *Caenorhabditis elegans* embryos using an antigen subtraction method. *Genes Cells* 13(7):653-665.
- Tanabe, R., Tatsumi, R., Takahashi, K. (1994) Purification and characterization of the 1,200-kDa subfragment of connectin filaments produced by 0.1 mM calcium ions. *J Biochem.* 115(2):351-5.
- Taylor, K.A., Taylor, D.W. (1993) Projection image of smooth muscle α -actinin from two-dimensional crystals formed on positively charged lipid layers. *J. Mol. Biol.* 230(1):196-205.
- Taylor, K.A., Taylor, D.W. (1994) Formation of two-dimensional complexes of F-actin and crosslinking proteins on lipid monolayers: demonstration of unipolar α -actinin-F-actin crosslinking. *Biophys. J.* 67(5):1976-1983.
- Taylor, K. A., Taylor, D. W., Schachat, F. (2000) Isoforms of alpha-actinin from cardiac, smooth, and skeletal muscle form polar arrays of actin filaments. *J. Cell Biol.* 149(3):635-646.
- The UniProt Consortium (2012) Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt) *Nucleic Acids Res.* 40:71-75.
- Tovey, E. R., Baldo, B. A. (1987) Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes. *Electrophoresis* 8(9):384-387.
- Tskhovrebova, L., Trinick, J. (2003) Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(9):679-689. doi:10.1038/nrm1198
- Tskhovrebova, L., Trinick, J. (2010) Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:612482.
- van Straaten, M., Goulding, D., Kolmerer, B., Labeit, S., Clayton, J., Leonard, K., Bullard, B. (1999) Association of kettin with actin in the Z-disc of insect flight muscle. *J. Mol. Biol.* 285(4):1549-1562.
- Virel, A., Backman, L. (2004) Molecular evolution and structure of alpha-actinin. *Mol. Biol. Evol.* 21(6):1024-1031.
- Waites, G. T., Graham, I. R., Jackson, P., Millake, D. B., Patel, B., Blanchard, A. D., Weller, P. A., Eperon, I. C., Critchley, D. R. (1992) Mutually exclusive splicing of calcium-binding domain exons in chick alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* 267(9):6263-6271.
- Wenegieme, E. F., Babitch, J. A., Naren, A. P. (1994) Cation binding to chicken gizzard alpha-actinin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1205(2):308-316.
- Wilmanns, M. (2007) Titin - ein Strukturbioologisches Puzzle von gigantischem Ausmaß. *Biospektrum* 13:600-604.
- Witke, W., Hofmann, A., Köppel, B., Schleicher, M., Noegel, A. A. (1993) The Ca(2+)-binding domains in non-muscle type alpha-actinin: biochemical and genetic analysis. *J. Cell Biol.* 121(3):599-606.
- Witke, W., Schleicher, M., Lottspeich, F., Noegel, A. (1986) Studies on the transcription, translation, and structure of alpha-actinin in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* 103(3):969-975.
- Xu, J., Wirtz, D., Pollard, T. D. (1998) Dynamic cross-linking by alpha-actinin determines the mechanical properties of actin filament networks. *J. Biol. Chem.* 273(16):9570-9576.
- Yook, K., Harris, T. W., Bieri, T., Cabunoc, A., Chan, J., Chen, W. J., Davis, P., de la Cruz N., Duong, A., Fang, R., Ganesan, U., Grove, C., Howe, K., Kadam, S., Kishore, R., Lee, R., Li, Y., Muller, H.-M., Nakamura, C., Nash, B., Ozersky, P., Paulini, M., Raciti, D., Rangarajan, A., Schindelman, G., Shi, X.,

Schwarz, E. M., Tuli, M.A., Van Auken, K., Wang, D., Wang, X., Williams, G., Hodgkin, J., Berriman, M., Durbin, R., Kersey, P., Spieth, J., Stein, L., Sternberg P. W. (2012) WormBase 2012: more genomes, more data, new website. *Nucleic Acids Research* 40:735-741

Young, P., Ferguson, C., Bañuelos, S., Gautel, M. (1998) Molecular structure of the sarcomeric Z-disc: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *EMBO J.* 17(6):1614-1624.

Young, P., Gautel, M. (2000) The interaction of titin and alpha-actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism. *EMBO J.* 19:6331-6340. doi: 10.1093/emboj/19.23.6331

Zhang, Y., Featherstone, D., Davis, W., Rushton, E., Broadie, K. (2000) *Drosophila* D-titin is required for myoblast fusion and skeletal muscle striation. *J. Cell Sci.* 113(17):3103-3115.

Ziegler, C., Meyer, H.E., Beinbrech, G. (1990) Identification and immunological localization of a high molecular weight protein in arthropod muscles. *Muscle and Motility* 2:9-14.

Zou, P., Pinotsis, N., Lange, S., Song, Y.H., Popov, A., Mavridis, I., Mayans, O.M., Gautel, M., Wilmanns, M. (2006) Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disc. *Nature* 439(7073):229-33.

6.2 Datensätze aus online Datenbanken

BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Altschul *et al.*, 1990)

<i>Biomphalaria glabrata</i>	AF484962.1
<i>Ixodes scapularis</i>	XM_002415288.1
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	XP_002712264
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	XP_002739923.1
<i>Tribolium castaneum</i>	XP_971502.2

Wormbase: <http://www.wormbase.org> (Yook *et al.*, 2012; Stein *et al.*, 2001)

<i>Caenorhabditis elegans</i>	W04D2
-------------------------------	-------

UniProt: <http://www.uniprot.org/> (The UniProt Consortium, 2012)

<i>Caenorhabditis elegans</i>	G4SLD6_CAEEL
<i>Camponotus floridanus</i>	E2ARB2_CAMFO
<i>Culex quinquefasciatus</i>	B0W5W8_CULQU
<i>Danio rerio</i>	A5X6X5_DANRE
<i>Dictyostelium discoideum</i>	P05090 ACTNA_DICDI
<i>Drosophila melanogaster</i>	P18091-ACTN_DROME
<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9I7U4 TITIN_DROME
<i>Gallus gallus</i>	P05094 ACTN1_CHICK; P20111 ACTN2_CHICK Q90734 ACTN4_CHICK
<i>Homo sapiens</i>	P12812 ACTN1_HUMAN; P35609 ACTN2_HUMAN; Q088043 ACTN3_HUMAN; O43707 ACTN4_HUMAN
<i>Homo sapiens</i>	Q8WZ42 TITIN_HUMAN
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	G1U9S3_RABIT
<i>Pediculus humanus</i>	E0VID6_PEDHC
<i>Pediculus humanus</i>	E0W001_PEDHC
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O13728 AIN1_SCHPO

PhosphoSitePlus: <http://www.phosphosite.org/> (Hornbeck *et al.*, 2012)

<i>Homo sapiens</i>	ACTN2 (human)
---------------------	---------------

Prosite: <http://prosite.expasy.org/> (Sigrist *et al.*, 2010)

ACTININ_1, PS00019; Actinin-type actin-binding domain signature 1
ACTININ_2, PS00020; Actinin-type actin-binding domain signature 2

7 Anhang

7.1 α -Aktinin-Sequenz des *L. terrestris*

```

tacgggggtgcggcgcactcgggtggtagtaggtgggtcctgttcgacgtcgatcgagtctc
tcttgattagcaagagccagtttcggacgcctttacatcgtgtgggtcgtcgtcgggtctc

gtcgtcgtgtggtggagtatatgtcatcatcatcatcatgtatcaagacggaattccgccc      24
                                     M Y Q D G I P P
ggatattaccaggatgagtacatggagcaggaggatgtatgggaaaggaaggtctactc      84
  G Y Y Q D E Y M E Q E D V W E R E G L L
gatcccgctgcgaggagcagcagaagaagaccttcactgcctggtgcaactctcatctt      144
  D P A C E E Q Q K K T F T A W C N S H L
cgcaaggcgggaacgcgacatcgagaacatagaggaagactttcgcaatgggttgaagctg      204
  R K A G T Q I E N I E E D F R N G L K L
atgcttctgctcgaagtcatcttctggggagcagctgccgaagccagaccgaggcaagatg      264
  M L L L E V I S G E Q L P K P D R G K M
cgcattccacaaactgtccaacgtcaacaaagcgttgacgttcacgaaagcaaggagtc      324
  R I H K L S N V N K A L Q F I E S K G V
cgtctcgtctccatcggctccgaagaattgttgatggtaatttaaaatgactcttggt      384
  R L V S I G S E E I V D G N L K M T L G
atgatctggaccatcattctccgctttgcaattcaggacatctccgtagaagaaatgacg      444
  M I W T I I L R F A I Q D I S V E E M T
gccaaaggaaggtctccttctgtggtgccaaaggaaaacagcgcttacagaacgtcaat      504
  A K E G L L L W C Q R K T A P Y K N V N
gtacagaacttccatctcagtttcaaagatggtttggctttctgcgctctcatccaccgt      564
  V Q N F H L S F K D G L A F C A L I H R
cacaggcctgaacttctcgactacaacaaactctccaaggataaccggttgataacttg      624
  H R P E L L D Y N K L S K D N P L Y N L
aatcttgcttttgatgtcgtcgagaagtacctcgatataccaaggatgtagacgccgaa      684
  N L A F D V A E K Y L D I P R M L D A E
gatatggtcaactctgtgaaacccgatgagaggtcgggtgatgacctatgtgtcggcctac      744
  D M V N S V K P D E R S V M T Y V S A Y
taccatgcgttttgctggtgcacaacaggcagagacggcgtccaatcgatttgtaaagta      804
  Y H A F A G A Q Q A E T A A N R I C K V
cttaaaatcaatcaagagaacgaaagacttatggaagaatacgaacgaatggctagcgac      864
  L K I N Q E N E R L M E E Y E R M A S D
cttctcagtggtgattcgtcggacgcgaccttggttggaacccggacgacgacaacacg      924
  L L E W I R R T R P W L E N R T T D N T
atccctggcactcgacgtaagctcgccgagtttcgcgactacagccgagcgacacaagcct      984
  I P G T R R K L A E F R D Y S R A H K P
ccgaaggtggaggagaaggcgaagctggagtcaacatttaacacccttcagacgagactg      1044
  P K V E E K A K L E S T F N T L Q T R L
aggctgagcaatcgctccggtacatgcccaccgagggaaaaatggtttcgatatattgca      1104
  R L S N R P A Y M P T E G K M V S D I A
aatgcctggaaaggtctggaaaatgcagagaaaggctttgaagactggcttctgtcggaa      1164
  N A W K G L E N A E K G F E D W L L S E
ttacaaagactcgagcgttttgatcatctggtcagaagttcaagctgaagtgtgacatc      1224
  L Q R L E R L D H L A Q K F K L K C D I
catgaggaatggtccgtaggaaaagaagacatgttacaaagctcaagatttcaaaaaagt      1284
  H E E W S V G K E D M L Q A Q D F K K S
cgactcagtgacctcaaggcgtgaggaagaggcagggcgttcgaaggagacctcgt      1344
  R L S D L K A L R K R H E A F E G D L A
tctcatcaagaacgagtcgaacagattgcggccatcgcacaggaactcaatgctcttggt      1404
  S H Q E R V E Q I A A I A Q E L N A L G
taccatgacgttaagagtgtcaactctcgatgccagagaatctgtgaccaatgggatttg      1464
  Y H D V K S V N S R C Q R I C D Q W D L
cttggaactctcagccaacaacgcagaaatgcactcgaggaagctgaacagattctggag      1524
  L G T L S Q Q R R N A L E E A E Q I L E
aagattgatcaccttcaccaggagtttcgccagaagagcagcgcttcaataactgggtg      1584
  K I D H L H Q E F A R R A A P F N N W L
gatggagcgaaggaagatctggtcgatatgttcatcgtgcacactgtggaagaaatccaa      1644
  D G A K E D L V D M F I V H T V E E I Q
cgcctcaatgattctcatgaccagttcaagttgactctcactgaagccgacaaagaattc      1704

```

```

R L N D S H D Q F K L T L T E A D K E F
aacggaatcattggactcccaaacgaaatcatcagaatttcgcaacagtacggaatcacg 1764
N G I I G L P N E I I R I S Q Q Y G I T
ggaggctatgaaaacccgtactcggtttattactggacaggatctggcgaacaggtggcac 1824
G G Y E N P Y S F I T G Q D L A N R W H
gaggtgaagcagttggtgcctgaccgtgaccagacattgcacaacgaactgcttcgccag 1884
E V K Q L V P D R D Q T L H N E L L R Q
cagaacaacgaacgcctgcgtcggtgttcggttcgcaagaaggctaatgtggtcgggcagtg 1944
Q N N E R L R R A F A Q K A N V V G Q W
atcgagcgccacctggatgccattgcgtcagctgctgtccagaagggaaaactggaagac 2004
I E R H L D A I A S A A V Q K G K L E D
cagctgatccggctgaaagccatcgacaaaagaggttgcggttttcagccaagctttgat 2064
Q L I R L K A I D K R G C G F Q P S F D
gaactggagacgatacatcacaagattctggaggcgatgatctttgacacctgccacact 2124
E L E T I H H K I L E A M I F D T C H T
ccttacaccatggagactctgcgtggttggtgggaacagcttgtagctcttcatacagg 2184
P Y T M E T L R V G W E Q L V T S S Y R
agcatcaatgaaacgaaaaccagatcctgacgcgtgactcgaagggaataacgaaccaa 2244
S I N E T E N Q I L T R D S K G I T N Q
cagttggaggaattccgctcggtcggttccttcactttgacaagtcgcaacacgacgactg 2304
Q L E E F R R S F L H F D K S R T R R L
gaaccgaaagacttcaagtctgtctcatctcactcggatacaacatcaaggatgacaga 2364
E P K D F K S C L I S L G Y N I K D D R
cagggtgaggctgacttccagaggataatgtctgtgttcgatcccaacaactttggcttt 2424
Q G E A D F Q R I M S V V D P N N F G F
gttacgtttgaggcggttcttggaacttcatgacccgtgaagcaacggacaacgacaccgca 2484
V T F E A F L D F M T R E A T D N D T A
gagcaagtcatgcagtcgttcagagtgctcgccggagatcagaactacatcactgctgac 2544
E Q V M Q S F R V L A G D Q N Y I T A D
atcttacgacgtgagctgcctccggaccaggcggagtactgcacccgtcggatggcaccg 2604
I L R R E L P P D Q A E Y C I R R M A P
tacgtcgccgagactcggtgcctggcgccctcgactacagatccttctcagccgctctg 2664
Y V G R D S V P G A L D Y R S F S A A L
tacggagagagcgacctataagtcgccatcgatccatctgtgatcaragatggatcgact
Y G E S D L
catctgatctgaggagatcgatcgatcga

```

Die DNA- und Aminosäure-Sequenz des α -Aktinins
aus dem Hautmuskelschlauch von *Lumbricus terrestris*.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank> ACCESSION KM948587

7.2 Positionen der Peptide aus der MS-Analyse

Sequenzstück	Position	Domäne (sofern in UniProt angegeben)	gesamte Länge der Sequenz/ Quelle	Organismus
QPIQN	187	86 – 177 Ig-like 1 255 – 343 Ig-like 2	18141 Q9I7U4 TITIN_DROME	<i>D. melanogaster</i>
NISIK	2767		18519 G4SLD6_CAEEL	<i>C. elegans</i>
SLHLPE	3374		32757 A5X6X5_DANRE	<i>D. rerio</i>
NPPK	3674	3676 – 3767 Ig-like 28	18141 Q9I7U4 TITIN_DROME	<i>D. melanogaster</i>
VSVTE	4711	4703 – 4791 Ig-like 35	18141 Q9I7U4 TITIN_DROME	<i>D. melanogaster</i>
STVAG	5996	5975 – 6063 Ig-like 41	34350 Q8WZ42 TITIN_HUMAN	<i>H. sapiens</i>
ESEVTI	9074		18519 G4SLD6_CAEEL	<i>C. elegans</i>
ERESA	11920		33406 G1U9S3_RABIT	<i>O. cuniculus</i>
VTSSSE	12269	11872 – 11905 TPR 4 13566 – 13599 TPR 5	18141 Q9I7U4 TITIN_DROME	<i>D. melanogaster</i>
KTVKL	14863	13566 – 13599 TPR 5 14904 – 14936 TPR 6	18141 Q9I7U4 TITIN_DROME	<i>D. melanogaster</i>
DVIEG	15174	15111 – 15203 Fibronectin Typ-III 10 Übergang I/A-Bande	34350 Q8WZ42 TITIN_HUMAN	<i>H. sapiens</i>

Tabelle 11: Absolute Positionen der in einer vollständigen Titin-Sequenz enthaltenen Peptide, die in der MS-Analyse ermittelt wurden. Grau: Peptide der 170 kDa und 185 kDa Banden (C und D); weiß: Peptiden der hochmolekularen Titin-Banden A und B.

7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
aA	α -Aktinin
A-Bande	anisotrope Bande
Abb.	Abbildung
ABD	Aktinbindungsdomäne
AK	Antikörper
ALP	α -Aktinin assoziiertes LIM Protein
AMS	Ammoniumsulfat
AMS-MT	Mini-Titin, das nach einer AMS-Fällung wieder zu lösen ist
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arp2/3	Actin-related protein 2/3
AS	Aminosäuren (amino acids)
ASB14	Amidosulfobetaine-14
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMFZ	Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cap Z	an das plus Ende des F-Aktins bindendes Protein
Cc	kritische Konzentration der Aktin-Filament-Enden
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
Ce-Titin	<i>C. elegans</i> Titin
CH	Calponin homolog
CHAPS	(3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat)
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DEAE	Diethyldiaminoethyl-Cellulose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'Desoxy-nucleotid 5'Triphosphat
D-Titin	<i>D. melanogaster</i> Titin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFh	EF-Hand
EGTA	Ethylenglykol-bis-(-2-Aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
ESI	Electrospray ionization
et al.	und andere
Extr	Extrakt
FA	Formaldehyd
F-Actin	filamentöses Actin
FAK	Focal Adhesion Kinase
Fn	Fibronektin
g	Masse in Gramm
g	Formelzeichen der Erdbeschleunigung
G-Actin	globuläres Actin
ggf.	gegebenenfalls
Hepes	(N-2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMS	Hautmuskelschlauch

Hz	Hertz
IAA	Indol-3-essigsäure (indole-3-acetic acid)
I-Bande	Isotrope Bande
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IgG	Gamma-Immunglobulin
Insen.	Nicht sensitive
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilo Basenpaare
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Kaumagen
Konz	Konzentration
KZ	Kühlzentrifuge
l	Liter
LB	engl: lysogeny broth
LT	<i>Lumbricus terrestris</i>
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
max.	maximal
mdl.	mündlich
min	Minute
MLCK	Myosin leichte Ketten-Kinase
M-Linie	Mittel-Linie
MOPS	3-[N-morpholino]-propanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
MT	Mini-Titin
MTD	Mini-Titin des Durchflusses
MTS	Mini-Titin das an die Säule gebunden wird
n	Anzahl
Na ₄ P ₂ O ₇	Natriumphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NBT	Nitroblue-Tetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
N-Terminus	Amino-Terminus
o.g.	oben genannten
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
Pel	Pellet
PEVK	Aminosäuren: (P) Prolin, (E) Glutaminsäure, (V) Valin und (K) Lysin
pH	negative dekadische Zehnerlogarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PI-4,5-P ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKC	Proteinkinase C
PKN	protein kinase novel
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACE	rapid amplification of cDNA-ends
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationsverhalten in Svedberg
SA	Säulenauftrag

SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SMART	simple modular architecture research tool
Smp.	Schmelzpunkt
SNP	single nucleotid polymorphism
SPEC	Spektrin-Repeats
St	Standard
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	atomare Masseneinheiten u
Ü	Überstand
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Spannung in Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Waschschritt
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
z. B.	zum Beispiel
ZASP	Z-and alternatively spliced PDZ-motif
Z-Scheibe	Zwischen-Scheibe
μ	Micro-

8 Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. J. D'Haese, der mir die Möglichkeiten eröffnete diese Arbeit zu schreiben und mir dabei sehr viel Freiheit gelassen hat. Danke, für die kritische Auseinandersetzung, die wertvollen Ratschlägen, die große Geduld und das Engagement.

Herrn Prof. Dr. E. Lammert danke ich für die Übernahme des Zweitgutachter.

Dank geht auch an Frau Dr. Sabine Metzger und Frau Dr. Nadine Dyballa vom BMFZs für die massenspektrometrischen Analysen.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für kollegiale Zusammenarbeit und Unterstützung ebenso danken, wie Martin Fey und Marion Nissen, die stets ein offenes Ohr hatten und bei der Arbeit im Labor oder am Elektronenmikroskop gerne halfen.

Zudem geht ein ganz großer Dank an meinen Mann Jürgen Wolf und die ganze Familie, die hinter mir gestanden haben, obwohl sie in den letzten Jahren häufig auf mich verzichten mussten. Ein besonderer Dank gilt meinem Vater Claus Soika, der immer wieder Korrektur gelesen hat.

9 Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
Die Dissertation wurde in vorgelegter oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen
Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Claudia Ines Soika