

**Charakterisierung Ca^{2+} -bindender Proteine und deren Isoformen
in der Regulation der Muskelkontraktion und Actindynamik bei
Tardigraden, Onychophoren und Anneliden**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Prasath Thiruketheeswaran
aus Jaffna

Düsseldorf, Juni 2019

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

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Jochen D’Haese
2. Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2020

Vorwort

Grundlage für diese kumulative Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung Ca^{2+} -bindender Proteine und deren Isoformen in der Regulation der Muskelkontraktion und Actindynamik bei Tardigraden, Onychophoren und Anneliden“ sind folgende Publikationen:

1. Publikation:

“EF-hand proteins and the regulation of actin-myosin interaction in the eutardigrade *Hypsibius klebelsbergi* (Tardigrada)”

Thiruketheeswaran P, Greven H, D'Haese J (2012) Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology 317:311-320.

2. Publikation:

“EF-hand proteins in onychophorans as compared to tardigrades and other ecdysozoans”

Thiruketheeswaran P, Greven H, D'Haese J (2013) Journal of Limnology 72:36-43.

3. Publikation:

“Gelsolin in Onychophora and Tardigrada with notes on its variability in the Ecdysozoa”

Thiruketheeswaran P, Greven H, D'Haese J (2017) Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Physiology 203:47-52.

4. Publikation:

“Soluble calcium-binding proteins (SCBPs) of the earthworm *Lumbricus terrestris*: molecular characterization and localization by FISH in muscle and neuronal tissue”

Thiruketheeswaran P, Kiehl E, D'Haese J (2016) Histochemistry and Cell Biology 146:635-644.

5. Publikation:

“Soluble calcium-binding proteins (SCBPs) of the earthworm *Lumbricus terrestris*: possible role as relaxation factors in muscle”

Thiruketheeswaran P, Ralf Huch, D'Haese J (2018) Journal of Comparative Physiology Part B. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1177-y>.

6. Publikation:

“Four paralog gelsolin genes are differentially expressed in the earthworm *Lumbricus terrestris*”

Thiruketheeswaran P, Thomalla P, Krüger E, Hinssen H, D'Haese J (2017) Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Physiology 209:58-67.

weitere Publikation:

“The actin gene of *Hypsibius klebelsbergi* (Eutardigrada) – complete sequence and comparison with actin from related and non-related taxa”

D'Haese J, Traore-Freitag A, Kiehl E, **Thiruketheeswaran P**, Greven H (2011) Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 49:84-89.

Einleitung	6
I. Untersuchung der Muskelregulation in <i>Hypsibius klebelsbergi</i> (Tardigrada) und <i>Peripatus novaezealandiae</i> (Onychophora)	12
I.1 EF-Hand Proteine von <i>Hypsibius klebelsbergi</i> und <i>Peripatus novaezealandiae</i>	
I.1a Calmodulin	12
I.1b Troponin C	13
I.1c Regulatorische und essentielle leichte-Ketten des Myosins	17
I.2 Regulation der Actin-Myosin Interaktion bei <i>Hypsibius klebelsbergi</i> und <i>Peripatus novaezealandiae</i>	20
I.3 Phylogenetische Stellung der Tardigraden und Onychophoren	21
I.4 Literatur	23
Publikation 1	27
Publikation 2	27
Publikation 3	27
II. Lösliche Ca^{2+}-bindende Proteine (SCBP) vom Regenwurm <i>Lumbricus terrestris</i>	28
II.1 SCBP Isoformen im Regenwurm <i>Lumbricus terrestris</i>	28
II.2 Genomische Organisation und Northern Blot Analyse	31
II.3 Lokalisation von SCBPs durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	
II.3a SCBPs im Muskel	31
II.3b SCBPs im Nervengewebe	31
II.4 Funktionelle Untersuchungen	
II.4a Ca^{2+} -Verteilung zwischen SCBP und Actomyosin	33
II.4b Ca^{2+} -Verteilung zwischen SCBP und dem SR	33
II.4c Erleichterte Ca^{2+} -Diffusion durch SCBP	34
II.5 Literatur	36
Publikation 4	40
Publikation 5	40
III. Der Actin-Modulator vom Regenwurm <i>Lumbricus terrestris</i>: Earthworm Actin Modulator	41
III.1 Earthworm Actin Modulator (EWAM) Isoformen	41
III.2 Sequenzierung und Analyse der cDNAs von P3 und P4	41
III.3 Genomische Organisation	45
III.4 Northern Blot Analyse	46
III.5 Lokalisation der EWAM Isoformen durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	47
III.6 Physiologische Bedeutung von vier EWAM Isoformen	48
III.7 Literatur	52
Publikation 6	56
Zusammenfassung	57
Anteilerklärung	60
Eidesstattliche Erklärung	63

Einleitung

Eine Vielzahl zellulärer Prozesse wird durch die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gesteuert. Voraussetzung für die vielfältige Wirkungsweise von Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) ist die Regulierung der freien cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration im nanomolaren Bereich (100 nM), die etwa 10.000x niedriger ist als im extrazellulären Kompartiment. Dieser Konzentrationsgradient wird durch membranständige Ca^{2+} -Pumpen, -Kanäle, Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher und durch Ca^{2+} -Sequestrierung in intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher aufrechterhalten (Carafoli und Krebs 2016; Brini et al. 2013). Ein Ca^{2+} -Signal wird durch eine transiente Erhöhung der freien cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration initiiert und durch Ca^{2+} -bindende Proteine subzellulär vermittelt. Hierzu wird in jeder Zelle ein spezifischer Satz von Ca^{2+} -bindenden Proteinen für die Signaltransduktion exprimiert.

Diese Arbeit gliedert sich in drei Studien Ca^{2+} -regulierter Prozesse bei Evertetraten, nämlich der Regulation der Muskelkontraktion (**Teil I**) und der Muskelerchlaffung (**Teil II**) sowie der Modulation des Actins (**Teil III**).

In Fortsetzung früherer Studien am Actin des Tardigraden (Bärtierchen) *Hypsibius klebelsbergi* (D’Haese et al. 2011; Kiehl et al. 2007), wurde in **Teil I** die Muskelregulation von *H. klebelsbergi* und des Onychophoren (Stummelfüßer) *Peripatus novaezealandiae* untersucht.

Tardigraden und Onychophoren bilden zwei Tierstämme innerhalb der Ecdysozoa (Häutungstiere), wo sie zusammen mit den Arthropoda (Gliederfüßer) als Panarthropoda zusammengefasst werden. Ihre phylogenetische Stellung zueinander und innerhalb der Ecdysozoa ist jedoch unklar (Abb. 1; siehe **I.3**). Als die nächsten Verwandten der Arthropoden besitzen Tardigraden und Onychophoren noch urtümliche Merkmale, da sich ihre Anatomie seit dem Kambrium (vor rund 540 Mio. Jahren) kaum verändert hat. Im Gegensatz zu den Arthropoden weisen sie, wie auch die fossilen Lobopodia (Lappenfüßer), ungegliederte Extremitäten auf (Ou et al. 2012; Haug et al. 2012). Weiterhin treten bei Tardigraden und Onychophoren Muskelzellen auf, die zwar eine sarkomerähnliche Organisation aufweisen aber als Zwischenform der glatten und quergestreiften Muskulatur angesehen wird (Camatini et al. 1979; Walz 1974).

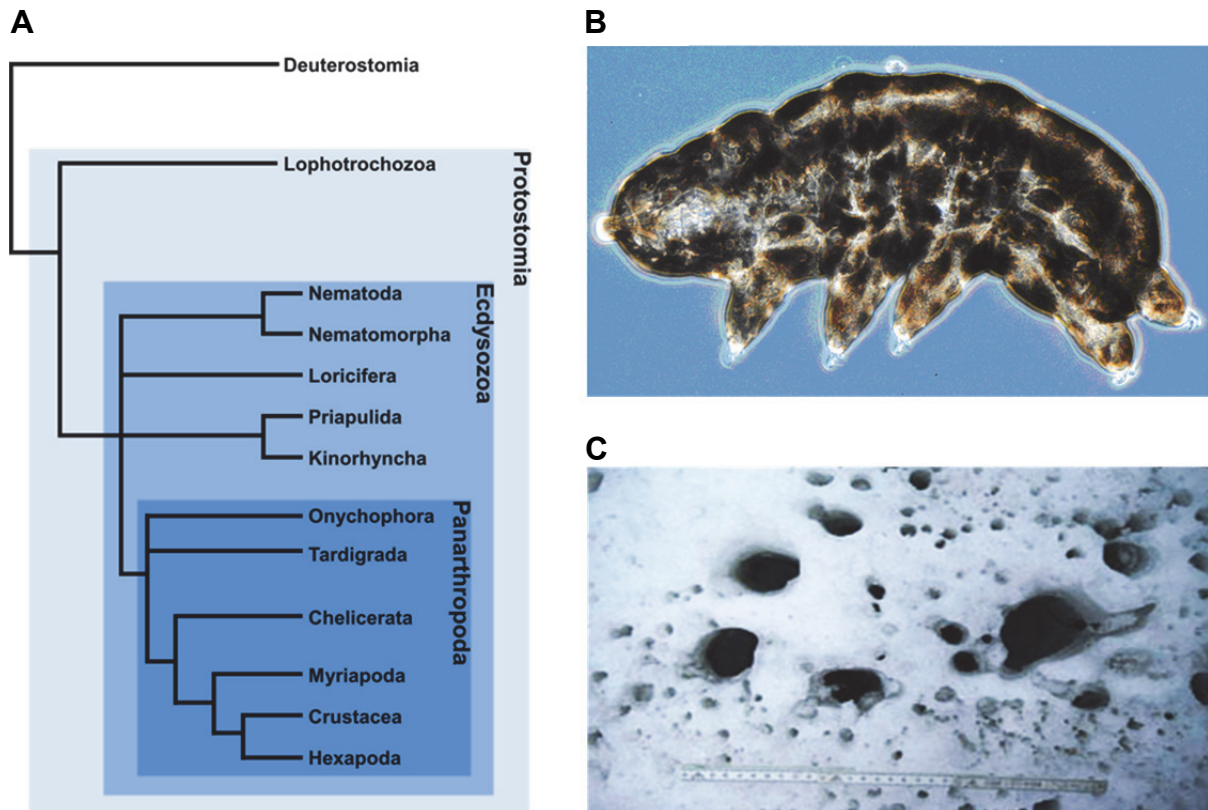


Abb. 1 *Hypsibius klebelsbergi* und sein Lebensraum. (A) Tardigraden und Onychophoren gelten als die nächsten Verwandten der Arthropoda (Gliederfüßer), mit denen sie als Panarthropoda zusammengefasst werden. Ihre phylogenetische Stellung zueinander und innerhalb der Ecdysozoa (Häutungstiere) ist nach wie vor umstritten (siehe I.3). Phylogenetische Rekonstruktion der Ecdysozoa erfolgte nach Telford et al. (2008). (B) *H. klebelsbergi* ist ein auffallend schwarz pigmentierter Tardigrade (ca. 500 µm Körperlänge), welcher in Kryokonitlöchern (C) auf Gletschern lebt. Eine besondere Fähigkeit der Tardigraden ist die Kryptobiose, wodurch sie in der Lage sind, extreme Umweltbedingungen zu überdauern (Mobjerg et al. 2011). Bilder mit freundlicher Genehmigung von Dr. Hieronymus Dastych (Dastych et al. 2003).

Innerhalb der Ecdysozoa zeigen die bisher untersuchten Fadenwürmer (Nematoda), Priapswürmer (Priapulida), Insekten (Hexapoda) und Spinnentiere (Chelicerata) eine duale Regulation, wo das Actomyosin gleichzeitig Actin- als auch Myosin-gekoppelt reguliert wird (Espinoza-Fonseca et al. 2015; Hidalgo et al. 2001; Ritter et al. 1999; Martin et al. 1986; Sellers et al. 1980; Chantler und Szent-Györgyi 1978; Harris et al. 1977). Bei Krebstieren (Crustacea) wird der Scheren- und Abdominalmuskel ebenfalls dual reguliert (Koenders et al. 2004; Ojima und Nishita 1989).

Zur Untersuchung der Muskelregulation bei *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae*, wurden vier Ca^{2+} -bindende Proteine aus der EF-Hand Proteinfamilie (CTER-Gruppe), nämlich das ubiquitär exprimierte Calmodulin, die Troponin-Untereinheit C (Troponin C), sowie die essentielle- und regulatorische Myosin-leichte-Kette analysiert. CTER-Proteine wirken als molekulare Ca^{2+} -Schalter die Actin- oder Myosin-gekoppelt die Muskelkontraktion steuern und das Actomyosin in einen aktiven

(*on-state*) oder inaktiven (*off-state*) Zustand versetzen. Actin-gekoppelt kann das Actomyosin über zwei Systeme gesteuert werden, nämlich durch Troponin-Tropomyosin oder Calmodulin-Caldesmon (Lehman 2016; Ansari et al. 2008). Im Myosin-gekoppelten System ist der Ca^{2+} -Schalter die regulatorische bzw. essentielle leichte-Kette des Myosins (Yamaguchi et al. 2016; Gao et al. 2013).

Da eine Präparation der Muskelproteine bei Tardigraden nicht möglich ist, wurde zur Charakterisierung die cDNAs der CTER-Proteine von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* sequenziert und analysiert. Die Sequenzdaten sollten Rückschlüsse auf die regulatorische Funktion im Muskel ermöglichen und mögliche Veränderungen oder Adaptationen für die Kryptobiose herausstellen. Weiterhin wurden das Troponin C, die essentielle- und regulatorische Myosin-leichte-Kette von *H. klebelsbergi* für weiterführende Versuchsansätze zur Ca^{2+} -Bindung rekombinant exprimiert.

Während die EF-Hand Proteine der CTER-Gruppe die Muskelkontraktion regulieren, ist bei der Muskeler schlaffung ein weiteres EF-Hand Protein nämlich das Parvalbumin beteiligt. Parvalbumin war das erste Ca^{2+} -bindende Protein, welches kristallisiert worden ist. Aus der Röntgenstrukturanalyse von Parvalbumin wurde das EF-Hand Ca^{2+} -Bindungsmotiv ermittelt, die kennzeichnend ist für die EF-Hand Proteinfamilie (Kretsinger und Nockolds 1973). In der schnell kontrahierenden Muskulatur von Vertebraten wird Parvalbumin die Funktion eines „löslichen relaxierenden Faktors“ zugeschrieben. Nach diesem Modell agiert Parvalbumin als Ca^{2+} -Transporter zwischen Troponin C und dem sarkoplasmatischen Reticulum (SR). Bevor das SR ein Ca^{2+} -Signal löscht, entzieht das Parvalbumin dem Troponin C das Ca^{2+} und inhibiert damit die Actin-Myosin-Interaktion. Parvalbumin transportiert das Ca^{2+} zum SR, wo dem Parvalbumin das Ca^{2+} entzogen wird. Je schneller das Ca^{2+} -Signal gelöscht wird und damit die Muskelzelle erschlafft, umso schneller kann die Muskelzelle wieder kontrahieren. Durch die Zwischenschaltung von Parvalbumin wird die Relaxierungszeit des Muskels verkürzt und ermöglicht damit einen schnelleren Kontraktionszyklus. Hierbei konnte an isolierten Muskelfibrillen gezeigt werden, dass einerseits die Injektion von Parvalbumin die Relaxierungszeit verkürzt und andererseits Parvalbumin-*knockout* die Relaxierungszeit erhöht (Arif 2009; Raymackers et al. 2000; Schwaller et al. 1999; Müntener et al. 1995). Bei Vertebraten wurden bisher die schnellsten Muskelkontraktionen, mit einer Frequenz von über 200 Hz, im Schwimmblasenmuskel des Krötenfisches *Opsanus tau* (Batrachoidiformes) gemessen, der durch oszillierende Kontraktionen der sog. Schall- oder Trommelmuskeln Töne erzeugt. Diese hohe Kontraktionsfrequenz dieser Muskulatur korreliert mit der bis dato höchsten ermittelten Parvalbumin-Konzentration eines Muskels (bis zu 1.5 mM; zur Übersicht siehe Rome 2006). Weiterhin konnte bei Fischen nachgewiesen werden, dass der Parvalbumin-Gehalt in der schnell kontrahierenden weißen Muskulatur bis zu 8x höher ist als in den langsam kontrahierenden roten Muskulatur (Kobayashi et al. 2006). Bei der Suche nach Parvalbumin in der Muskulatur von Evertrebraten fand man anstelle des Parvalbumins ein analoges lösliches Ca^{2+} -bindendes Protein, nämlich das Soluble Calcium Binding Protein (SCBP oder SCP). Die physikalischen und strukturellen Gemeinsamkeiten von Parvalbumin und SCBP deuten auf eine

funktionelle Analogie hin. Beide Proteine sind in niedriger Ionenstärke löslich, ihr isoelektrischer Punkt liegt im sauren Bereich (pI: 4-5), sie sind in Anwesenheit von Ca^{2+} hitzestabil, Ca^{2+} -Bindung führt zu keiner signifikanten Konformationsänderung und sie liegen in hoher Konzentration im Muskelgewebe vor (Gerday 1988, 1982). SCBPs wurden bisher in der Muskulatur beim amerikanischen Sumpfkrebs *Procambarus clarkii* (Crustacea) (White et al. 2011; Gao et al. 2006; Cox et al. 1976), Muscheln der Gattung *Pecten* (Mollusca) (Collins et al. 1983), Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Arthropoda), Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* (Arthropoda) (Kelly et al. 1997; Kiehl und D'Haese 1992) und beim Lanzettfischchen *Branchiostoma lanceolatum* (Takagi et al. 1986) isoliert. Erstmals in einem terrestrischen Tier wurde SCBP im Regenwurm *Lumbricus terrestris* (Annelida) nachgewiesen (Huch et al. 1988). Eine quantitative Analyse der SCBP-Konzentration im Hautmuskelschlauch und Kaumagen von *L. terrestris* zeigte, analog zum Parvalbumin in der Muskulatur von Vertebraten, eine Korrelation des SCBP-Gehaltes mit der Kontraktionsgeschwindigkeit des Muskels. Die SCBP-Konzentration liegt in den schnell kontrahierenden Muskelzellen des Hautmuskelschlauches um drei Zehnerpotenzen höher als in den langsam kontrahierenden Muskelzellen des Kaumagens (Huch und D'Haese 1992).

Bislang gibt es keine Funktionsstudien zur Rolle von SCBPs als „löslicher relaxierender Faktor“ und Ca^{2+} -Transporter in Evertrebraten. Versuchsansätze zur physiologischen Funktion von SCBPs stammen lediglich von *P. clarkii*, wobei die erleichterte Ca^{2+} -Diffusion nicht betrachtet worden ist (Piront et al. 1980). Zur Klärung der Frage, ob SCBPs in ihrer Funktion dem Vertebraten Parvalbumin gleichen wurde in **Teil II** mit Regenwurmkomponenten in Ca^{2+} -Verteilungsstudien und Diffusionsexperimenten der Einfluss des SCBPs auf die Ca^{2+} -Regulation des Actomyosins und der möglichen Funktion von SCBPs als Ca^{2+} -Transporter untersucht. Die zur erleichterten Diffusion durchgeführten Versuche basieren auf den methodischen Ansatz von Feher (1984, 1983) der für Parvalbumin und das intestinale Calbindin_{D28K} in Ca^{2+} -Fluxstudien eine erleichterte Ca^{2+} -Diffusion demonstrieren konnte.

Neben ihrer Funktion bei der Muskelregulation spielen Ca^{2+} -bindende Proteine auch im Nervengewebe eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Ca^{2+} -Homöostase und damit der Ausschüttung Ca^{2+} -induzierter Neurotransmitter (Schneggenburger et al. 2012). Im zentralen und peripheren Nervensystem von Vertebraten wurden bisher eine Vielzahl von Ca^{2+} -bindenden Proteinen nachgewiesen, von denen vor allem Calretinin, Calcineurin, S100-Proteine sowie Parvalbumin und Calmodulin näher untersucht worden sind (Kuberappa et al. 2016; Schwaller 2014; Arif 2009; Rusnak und Mertz 2000; Chin und Means 2000). SCBPs wurden im Nervengewebe bisher in der Weinbergschnecke *Helix pomatia* (Mollusca), Meeresschnecke *Aplysia californica* (Mollusca) und *D. melanogaster* nachgewiesen (Kelly et al. 1997; Pauls et al. 1993; Kerschbaum et al. 1992). Immunhistochemisch konnten SCBPs in der Muskulatur und im Nervengewebe von *L. terrestris* bisher nicht eindeutig lokalisiert werden. Komplikationen ergaben sich beim Einsatz der polyklonalen SCBP-Antikörper (Huch 1991), bei der Fixierung der löslichen Proteine und durch mögliche Kreuzreaktionen mit Proteinen aus der CTER-Gruppe. Um diese Hindernisse zu umgehen, wurde im

Rahmen dieser Arbeit durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) SCBP-mRNA in Gewebeschnitten von Muskel und Nervengewebe des Regenwurms lokalisiert. Durch den Einsatz von RNA Sonden können zellspezifisch mRNAs detektiert werden. Die Lokalisation der Regenwurm SCBPs sollte zu einem besseren Verständnis der Funktion von SCBPs sowohl im Muskel als auch im Nervengewebe beitragen.

Ca²⁺-bindende Proteine regulieren nicht nur die Interaktion der Actin- und Myosinfilamente bei der Muskelkontraktion und -erschaffung sondern auch den Polymerisationsgrad von Actinfilamenten. Das Actin-Cytoskelett ist ein dynamisches Netzwerk aus Actinfilamenten (F-Actine), das sich kontinuierlich durch Polymerisation von monomeren Actinmolekülen (G-Actine) und Depolymerisation im Umbau befindet und für die mechanische Stabilität sowie u.a. für Zellbewegungen, Cytokinese oder für sensorische Funktionen der Zellen verantwortlich ist (Huber et al. 2015; Fletcher und Mullins 2010). Im Vergleich zur dynamischen Struktur des Cytoskeletts unterliegen auch die scheinbar „starren“ F-Actine der Myofibrillen einer fortlaufenden Reorganisation (Ono 2010). Diese Actin-Dynamik oder der Actin-*turnover* wird durch Actin-bindende Proteine reguliert, welche nach ihrer Funktionsweise in Gruppen eingeteilt werden (Pollard 2016). Eine grobe Differenzierung lässt sich vornehmen zwischen Actin-bindenden Proteinen, die 1. an F-Actine binden und eine stabilisierende oder regulatorische Funktion ausüben; 2. F-Actine miteinander vernetzen und 3. die Polymerisation und damit die Länge der F-Actine beeinflussen. Zu den letzteren gehören die Actin-Modulatoren, die Ca²⁺ abhängig und durch die Bindung an saure Phospholipide (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂) reguliert, an F- und G-Actine binden. Hierdurch können Actin-Modulatoren das schnell wachsende Plus-Ende blockieren (Capping), F-Actine schneiden (Fragmentation) und die Bildung neuer F-Actine initiieren (Nukleation) (Nag et al. 2013).

Typischerweise sind Actin-Modulatoren aus sechs oder aus drei Segmenten aufgebaut. Zwei Ausnahmen bilden das zwei-segmentige ABP29 von der Oster-Lilie *Lilium longiflorum* (Xiang et al. 2007) und das vier-segmentige GLSN-1 des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) (Klaavuniemi et al. 2008). Der drei-segmentige Actin-Modulator von *L. terrestris* (EWAM) war der erste Actin-Modulator der aus der Muskulatur eines Evertebraten isoliert und biochemisch charakterisiert worden ist. Hierbei zeigte sich, dass EWAM wie ein sechs-segmentiges Gelsolin der Vertebraten Ca²⁺-abhängig seine Konformation ändern und mit Actin interagieren kann (D'Haese und Hinssen 1987). Bemerkenswerterweise zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Fragmentationseffizienz zwischen dem drei-segmentigen EWAM und dem sechs-segmentigen Gelsolin der Vertebraten (Giebing et al. 1997; 1994). Basierend auf den vorausgegangenen Ergebnissen war es das Ziel in **Teil III** durch eine vollständige Sequenzierung, genomische- und Transkript-Analyse eine differentielle Expression der EWAM Isoformen P1-P4 zu untersuchen. Weiterhin sollte durch eine histochemische Lokalisation mittels FISH das Expressionsmuster der EWAM Isoformen nachgewiesen werden. Die Lokalisation sollte darüber Aufschluss geben, ob die

Dynamik der Actinfilamente verschiedener Muskelzelltypen im Regenwurm eine Adaptation oder Aktivität spezifischer Modulator Isoformen erfordern.

Teil I

I. Untersuchung der Muskelregulation in *Hypsibius klebelsbergi* (Tardigrada) und *Peripatus novaezealandiae* (Onychophora)

I.1 EF-Hand Proteine von *Hypsibius klebelsbergi* und *Peripatus novaezealandiae*

I.1a Calmodulin

Die Calmodulin (CaM) cDNA Sequenzen von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* bestätigen die evolutionär hohe Konservierung von CaM im Tierreich mit vier EF-Händen (Abb.I-1, **Publikation 2, Abb. 1**). Vergleich der CaM Proteinsequenzen verschiedener Vertreter der Proto- und Deuterostomia aber auch des Nesseltiers *Metridium senile* (Seeanemone, Cnidaria) und sogar des Protozoen *Tetrahymena pyriformis* (Ciliophora) zeigen eine Sequenzidentität im Bereich von 88-99 %. Bemerkenswert ist die Identität der Proteinsequenzen von *H. klebelsbergi* mit *Homo sapiens* mit 98 %. Vergleich der vier EF-Hände von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* zeigt jeweils die höchste Sequenzidentität zwischen EF-Hand I und III (55 %) und zwischen EF-Hand II und IV (59 %). Dies ist in Übereinstimmung mit der Theorie, dass CaM durch zwei tandem-Duplikationen eines ursprünglichen CaM Gens mit nur einer EF-Hand evolviert ist (Friedberg und Rhoads 2001). Im Vertebraten CaM weist jede EF-Hand ein hochaffines Ca^{2+} -Bindungsmotiv auf (Dissoziationskonstante $K_D = 10^{-6} - 10^{-7} \text{ M}$), wobei aufgrund der Kooperativität jedes gebundene Ca^{2+} die Bindung eines weiteren Ca^{2+} begünstigt (Reihenfolge der Bindung: III $\rightarrow$ IV $\rightarrow$ I $\rightarrow$ II; Valeyev et al. 2008). CaM gilt als Prototyp der Ca^{2+} -Sensoren, das in eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimiert wird. CaM weist amino- und carboxy-terminal eine globuläre Domäne mit jeweils zwei EF-Händen auf. Beide Domänen sind durch eine zentrale Interhelix miteinander verbunden (Chattopadhyaya et al. 1992; Babu et al. 1985). Die Bindung von vier Ca^{2+} führt zu einer aktivierten Konformation des CaMs, wo hydrophobe Regionen für die Interaktion mit Zielproteinen freigelegt sind. Neben seiner Funktion als Ca^{2+} -Schalter in der Muskulatur ist CaM an einer Vielzahl verschiedener Zellvorgänge beteiligt, indem es in Ca^{2+} -aktivierter Form u.a. Proteinkinasen, -phosphatasen, Phosphodiesterasen oder Ionenkanäle reguliert (Chin und Means 2000).

	EFH I										EFH II										
				X	Y	Z	-Y	-X	-Z					X	Y						
Hk	MADQLTEEQIAEFKEAFSLF	DKD	GDG	TT	IT	TKEL	GTVM	RS	LGQNP	TEAELQDMINEV	DADG										60
Pe	MADQLTEEQIAEFKEAFSLF	DKD	GDG	TT	IT	TKEL	GTVM	RS	LGQNP	TEAELQDMIGAE	DADG										60
Hs	MADQLTEEQIAEFKEAFSLF	DKD	GDG	TT	IT	TKEL	GTVM	RS	LGQNP	TEAELQDMINEV	DADG										60
Dm	MADQLTEEQIAEFKEAFSLF	DKD	GDG	TT	IT	TKEL	GTVM	RS	LGQNP	TEAELQDMINEV	DADG										60
Ce	MADQLTEEQIAEFKEAFSLF	DKD	GDG	TT	IT	TKEL	GTVM	RS	LGQNP	TEAELQDMINEV	DADG										60
Pp	MADQLTEEQIAEFKEAFSLF	DKD	GDG	TT	IT	TKEL	GTVM	RS	LGQNP	TEAELQDMINEV	DADG										60
Cn	MADQLTEEQIAEFKEAFSLF	DKD	GDG	TT	IT	TKEL	GTVM	RS	LGQNP	TEAELQDMINEV	DADG										60
Te	MADQLTEEQIAEFKEAFSLF	DKD	GDG	TT	IT	TKEL	GTVM	RS	LGQNP	TEAELQDMINEV	DADG										60
	*****																				****

EFH III														
	Z-Y-X -Z							X Y Z-Y-X -Z						
Hk	NGT	IDF	PE	FL	TMMARK	MKDT	DSEEE	I	REAFRV	FDK	DGN	GFISAAE	LRHVMTNLGEKLTDE	120
Pe	NGT	IDF	PE	FL	TMMARK	MKDT	DSEEE	I	REAFRV	FDK	DGN	GFISAAE	LRHVMTNLGEKLTDE	120
Hs	NGT	IDF	PE	FL	TMMARK	MKDT	DSEEE	I	REAFRV	FDK	DGN	GYISAAE	LRHVMTNLGEKLTDE	120
Dm	NGT	IDF	PE	FL	TMMARK	MKDT	DSEEE	I	REAFRV	FDK	DGN	GFISAAE	LRHVMTNLGEKLTDE	120
Ce	NGT	IDF	PE	FL	TMMARK	MKDT	DSEEE	I	REAFRV	FDK	DGN	GFISAAE	LRHVMTNLGEKLTDE	120
Pp	DGT	IDF	PE	FL	TMMARK	MKDT	DSEEE	I	REAFRV	FDK	DGN	GFISAAE	LRHVMTNLGEKLTDE	120
Cn	NGT	IDF	PE	FL	TMMARK	MKDT	DSEEE	I	REAFRV	FDK	DGN	GFISAAE	LRHVMTNLGEKLTDE	120
Te	NGT	IDF	PE	EFL	SLMARK	MKDT	DTEEE	LIEAFKVF	DRD	G	NGLISAAE	LRHVMTNLGEKLTDE	120	
	:*****:						*****:***: ***:***:***:*						*****	

EFH IV													
	X Y Z-Y-X -Z												
Hk	EVDE	MIREAD	ID	GDG	QV	NYEE	EFVTMM	TLK	149				
Pe	EVDE	MIRSF	ID	GDG	QV	NYEE	EFVTMM	TLK	149				
Hs	EVDE	MIREAD	ID	GDG	QV	NYEE	EFVQMM	TAK	149				
Dm	EVDE	MIREAD	ID	GDG	QV	NYEE	EFVTMM	TSK	149				
Ce	EVDE	MIREAD	ID	GDG	QV	NYEE	EFVTMM	TTK	149				
Pp	EVDE	MIREAD	ID	GDG	QV	NYEE	EFVTMM	TSK	149				
Cn	EVDE	MIREAD	ID	GDG	QV	NYEE	EFVKMM	TSK	149				
Te	EVDE	MIREAD	ID	GDG	GH	IN	YEE	EFVRMM	MAK	149			
	*****						*****-***** ** *						

Abb.I-1 Sequenzvergleich von Vertebraten und Evertbraten Calmodulin.

Calmodulin ist im Tierreich hoch konserviert mit vier EF-Händen (I-IV). Die Calmodulin Proteinsequenzen von *Hypsibius klebelsbergi* (Hk, Uniprot-Zugangsnummer: [G9B6R4](#)), *Peripatus novaezealandiae* (Pe, [A0A0A7AA63](#)), *Homo sapiens* (Hs, [P62158](#)), *Drosophila melanogaster* (Dm, Hexapoda; [P62152](#)), *Caenorhabditis elegans* (Ce, Nematoda; [O16305](#)), *Patinopecten* sp. (Pp, japanische Kammuschel, Mollusca; [P02595](#)), *Metridium senile* (Cn, Seeanemone, Cnidaria; [Q95NR9](#)) und *Tetrahymena pyriformis* (Te, Ciliophora, Protozoa; [P02598](#)) wurden mit *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) verglichen. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) und konservierte Substitutionen durch einen Doppelpunkt (:) dargestellt. Potenziell Ca^{2+} -bindende EF-Hände (EFH I-IV) und Ca^{2+} -Bindungskordinaten (X, Y, Z, -Y, -X, -Z) sind gekennzeichnet. Ein Vergleich der genomischen Struktureigenschaften, wie Exonlängen und Intronpositionen legt den Schluss nahe, dass die CTER-Proteine, wie auch die löslichen Ca^{2+} -bindenden Proteine (siehe Teil II), aus einen gemeinsamen Protein-Vorfahren mit einer EF-Hand hervorgegangen sind. Im Laufe der Evolution haben sich durch Genduplikationen zwei EF-Hand-Paare evolviert, von denen in rezenten EF-Hand Proteinen, mit Ausnahme in Calmodulin, mindestens eine EF-Hand degeneriert ist und kein Ca^{2+} mehr binden kann (Kawasaki et al. 1998).

I.1b Troponin C

Aus den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Troponin Cs (TnC) von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* lassen sich amino- und carboxy-terminal jeweils eine potentielle Ca^{2+} -bindende EF-Hand (II und IV) ableiten. Im Sequenzvergleich mit anderen Evertbraten zeigt sich, dass diese beiden EF-Hände nahezu vollständig konserviert sind (Abb.I-2A, **Publikation 2, Abb. 2**). Dies ist im Einklang mit den bisher untersuchten TnCs bei Insekten (Hexapoda), Krebstieren (Crustacea) und

beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) die alle amino- und carboxy-terminal die potentiell Ca^{2+} -bindende EF-Hände II und IV aufweisen (Sanfelice et al. 2016; Tanaka et al. 2013; Qiu et al. 2003; Ueda et al. 2001; Garone et al. 1991; Wnuk 1989). Die putativen 3D-Strukturen der TnCs von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* zeigen im Gesamtvergleich die höchsten Strukturhomologien mit den Vertebraten TnCs. Vergleichbar zu den letzteren weisen die Tardigraden und Onychophoren TnCs eine zentrale Interhelix auf, welches die amino- und carboxy-terminalen EF-Hand Regionen miteinander verbindet (Abb. I-2). Diese Interhelix ist an der Bindung mit den Troponin Untereinheiten Troponin-T und -I (TnT und TnI) involviert und ist für die Ca^{2+} induzierte regulative Funktion des TnCs von Bedeutung. In der Skelettmuskulatur von Vertebraten besteht die amino-terminale TnC Domäne aus zwei EF-Händen (I und II) die mit geringer Affinität und hoher Spezifität Ca^{2+} binden (Dissoziationskonstante $K_D = 10^{-5}$ M) und eine regulatorische oder aktivierende Funktion innehaben. Dahingegen sind die carboxy-terminalen hochaffinen $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Bindungsstellen der EF-Hände III und IV (Dissoziationskonstante $K_D = 10^{-7}$ M [Ca^{2+}] und $K_D = 10^{-3}$ M [Mg^{2+}]) für die Wechselwirkung mit TnT und TnI verantwortlich. In der ruhenden Zelle liegen die regulatorischen Ca^{2+} -spezifischen amino-terminalen EF-Hände ungebunden vor, während die carboxy-terminalen hochaffinen EF-Hände mit Mg^{2+} gesättigt sind (Wakabayashi 2015; Gomes et al. 2002).

Analog zum Vertebratenmodell und zu den bisher untersuchten Arthropoden TnCs kann für das Tardigraden und Onychophoren TnC abgeleitet werden, dass die konservierte EF-Hand II die regulatorische Ca^{2+} -bindende Region darstellt und die carboxy-terminale EF-Hand IV für die Wechselwirkung mit TnT und TnI verantwortlich ist.

Ca^{2+} -gebunden wies das rekombinante Tardigraden TnC eine höhere elektrophoretische Mobilität auf (**Publikation 1, Abb. 3B**). In der Ca^{2+} -gebundenen Form liegt Troponin C in einer gestreckten Konformation vor, wo hydrophobe Regionen exponiert werden. Dieses äußert sich in einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität im Vergleich zur Ca^{2+} -freien Konformation (Head und Perry 1974). Die Konformationsänderung beim Tardigraden TnC ist ein Hinweis auf eine durch Ca^{2+} induzierbare Freilegung hydrophober Bindestellen, die für eine Interaktion mit TnI essentiell ist. Die carboxy-terminale Domäne von TnC interagiert durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der amino-terminalen Domäne von TnI und umgekehrt (Abb.I-2A; Fusi et al. 2014). Die Sequenzdaten lassen darauf schließen, dass in *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* ein regulierendes TnC vorliegt, dass im Troponin-Tropomyosin System Ca^{2+} -abhängig die Muskelkontraktion regulieren kann.

A

EFH I

X Y Z-Y-X -Z

Hk	-----MGEELTEEQKVAFQKAFNMFDKD-KQGFIHTRQIGSLRLTMGQAFEDKDLREL	52
Pe	-----MIFKEQKVAFRKAFDAFDQE-KQGFIHTNMVGTILSTMGQAFEEKDLKE-	48
Hs	MTDQQAEARSYLSEEMIAEFKAAFDMDAD-GGGDISVKELGTVMRMLGQTPTKEELDAI	59
Hc	MDDIYKAAVEQLTEEQKNEFKAAFDIFVLGAEDGCISTKELGKVMRMLGQNPTPEELQEM	60
Dm	-----MSDELTKEQTALLRNAFNADFPE-KNGYINTAMVGTILSMLGHQLDDATLADI	52
Ce	MGDVVADALEKLSADQIEQFRKYFNMFDKE-GKGYIRATQVGQILRTMGQAFEERDLKQL	59
Mp	-----TEEFRASEKQILDAKQAFCNVDKK-KEGTVSCKDLGAIFKSLGLLVKDDKIKDW	53
	: * * : : * : :	

EFH II

X Y Z-Y-X -Z

Hk	IAEVDTDGSGEIEFDEEFLVLVSRFVVEGD-KAKMEQELRDAFRLYDKQNGYINVSDLRE	111
Pe	IAEVDTDGSGELEFEFEFLVLVARFLVEED-KAKMQEELKEAFRLYDKQNGYINVSDLRE	107
Hs	IEEVEDDGSGTIDFEFEFLVMMVRQMKEDA-KGKSEELAEFCFRIFDRNADGYIDPEELAE	118
Hc	IDEVEDDGSGTVDDFEFLVMMVRCMKDDS-KGKSEELSDLFMRFDKNADGYIDLDELKI	119
Dm	IAEVEDDGSGQIEFEFEFTTLAARFLVEED-AEAMMAELKEAFRLYDKEGNGYITTGVIRE	111
Ce	IKEFDADGSGEIEFEFEFAAMVANFVNNENDEGLEEELREAFRLYDKEGNGYINVSDLRD	119
Mp	SDEMDEEATGRLNCDAWIQLFERKLKEDL----DERELKEAFRVLDKEKKGVIKVDVLRW	109
	* * : : * : : : : : : : * * : * : * : * : *	

EFH III

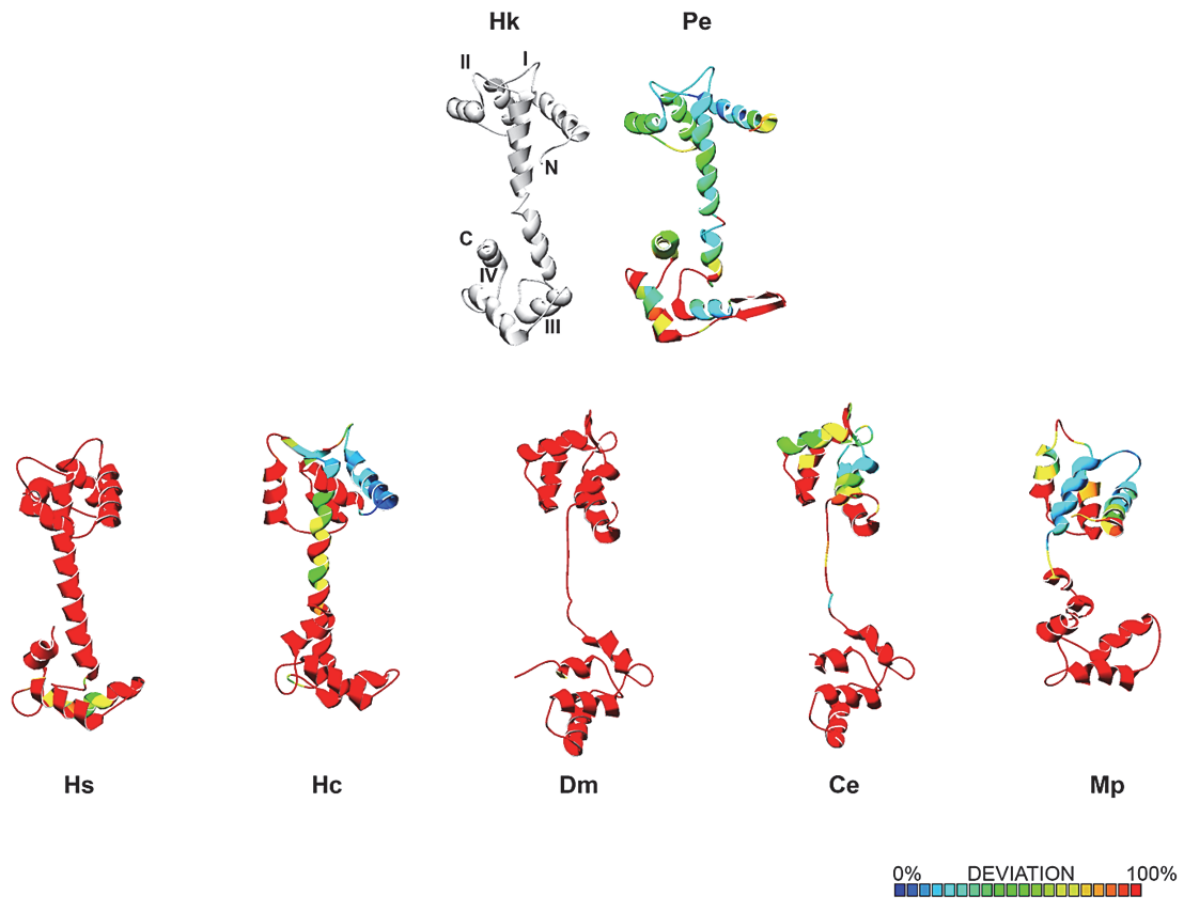
X Y Z-Y-X -Z

EFH IV

X Y Z-Y-X -Z

Hk	ILRALDDNITEGELD-----EMIAEIDTDASGTVDFDEFMEMMTAG--	152
Pe	ILRALDDKITEEELDEFGPLGGRVLADMIAEIDTDGSGTVDFDEFMEMMAA---	158
Hs	IFRASGEHVTDEEIE-----SLMKDGDKNNDGRIDFDEFLEKMMEGVQ-	160
Hc	MLQATGETITEDDIE-----ELMKDGDKNNDGRIDYDEFLEFMKGVE-	161
Dm	ILRELDDKLTNDDLD-----MMIEEIDSDGSGTVDFDEFMEVMTGGDD	154
Ce	ILRALDDNVSEEELD-----EMIAEIDADGSGTVDFDEFMEMMSGE--	160
Mp	ILSSLGDELTEEEIE-----NMIAETDTDGSGTVDYEEFKCLMMSSDA	152
	:: : : : : : : : : : * : * : * : * : *	

B

**Abb.I-2 Sequenz- und Strukturvergleich von Vertebraten und Evertrebraten Troponin Cs.**

(A) Das Vertebraten Troponin C (TnC) der Skelettmuskulatur (**Hs**) weist vier EF-Hände auf. Dagegen ist bei der cardialen TnC Isoform (**Hc**) sowie bei allen verglichenen Ecdysozoen die EF-Hand I (bei *Hypsiobius klebelsbergi* [**Hk**], *Peripatus novaezealandiae* [**Pe**] und *Drosophila melanogaster* [**Dm**, Hexapoda] auch EF-Hand III) degeneriert. Das TnC von *Mizuhopecten yessoensis* (**Mp**, Mollusca) besitzt nur die carboxy-terminale EF-Hand IV. Die zentrale Interhelix (rot markiert und durch ein spiralförmiges Band gekennzeichnet), welches an der Bindung mit den Troponin Untereinheiten TnT und TnI involviert ist, weist, mit Ausnahme bei *Caenorhabditis elegans* (**Ce**, Nematoda) und **Mp**, eine Länge von zwanzig Aminosäuren auf. Carboxy-terminal zeigen sich hydrophobe Aminosäuren (Methionine, blau) die an der Wechselwirkung mit TnI beteiligt sind (Fusi et al. 2014). Sequenzvergleich erfolgte wie in Abb.I-1. (B) Im Strukturvergleich der putativen 3D-Modelle Ca^{2+} -aktivierter TnCs zeigen sich für *H. klebelsbergi* (**Hk**) und *P. novaezealandiae* (**Pe**) die höchsten Strukturhomologien mit den Vertebraten TnCs (**Hs** und **Hc**). Vergleichbar zu den Vertebraten weisen die TnCs von **Hk** und **Pe** eine zentrale α -Helix auf, welches die amino- und carboxy-terminalen EF-Hand Regionen verbindet. Die 3D-Modelle der verglichenen TnCs wurden mit *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) mit den *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org>) -Vorlagen *Itn4* (**Hk**, **Pe**, **Hs**, **Hc**), *2JNF* (**Dm**, **Ce**) sowie mit *Ilkj* (**Mp**) errechnet. Die Strukturunterschiede zwischen der Proteinstruktur von *H. klebelsbergi* (Referenzstruktur) und der verglichenen TnCs sind farblich nach ihren RMS-Wert (Root Mean

Square) dargestellt. Der **RMS**-Wert gibt an, wie stark sich eine Proteinstruktur von einer Referenzstruktur entfernt. Dazu wird das Quadrat des Abstandes aller einzelnen Atomkoordinaten X von den Koordinaten der Referenzstruktur X_{ref} berechnet, über die Anzahl der Atome summiert und letztlich von dem Ergebnis die Wurzel gezogen (Maiorov und Crippen 1994). Je kleiner der RMS-Wert und damit die Abweichung von *H. klebelsbergi* umso bläulicher erscheint eine Region oder Domäne. Mit steigendem RMS-Wert wechselt der Farbton von Blau über Grün, Gelb, Orange zu Rot. Die markierten EF-Hände **I-IV** sowie die amino (N)- und carboxyl (C)-Enden sind für alle Modelle analog zu *H. klebelsbergi*. *H. klebelsbergi* (**Hk**, Uniprot-Zugangsnummer: [G9B6R3](#)); *P. novaezealandiae* (**Pe**, [A0A0A7AAM2](#)); *Homo sapiens* Skelettmuskel-Isoform (**Hs**, [P02585](#)); *Homo sapiens* Herzmuskel-Isoform (**Hc**, [P63316](#)); *Drosophila melanogaster* (**Dm**; [P47947](#)); *Caenorhabditis elegans* (**Ce**; [Q09665](#)); *Mizuhopecten yessoensis* (**Mp**, japanische Kammuschel; [P35622](#)).

I.1c Regulatorische und essentielle leichte-Ketten des Myosins

Die Aminosäuresequenzen der regulatorischen leichten-Ketten des Myosins (rMLC) von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* zeigen drei degenerierte EF-Hände (II-IV) und nur eine amino-terminal potenziell Ca^{2+} -bindende EF-Hand I auf. Dies entspricht dem Schema aller verglichenen rMLCs von Vertebraten und Evertrebraten. Weiterhin lassen sich in der cDNA des Tardigraden und Onychophoren phosphorylierbare Threonine (T) und Serine (S) identifizieren, die durch ein Erkennungsmotiv für die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK, Hong et al. 2011) flankiert werden (**Publikation 2, Abb. 4**). Der Sequenzvergleich mit verschiedenen rMLCs weist zwei Regionen hoher Konservierung auf. Die erste Region umfasst das amino-terminale MLCK-Motiv und die EF-Hand I. Die zweite konservierte Region erstreckt sich über die degenerierte EF-Hand II (Abb.I-3A). Die phosphorylierbaren amino-terminalen Regionen zeigen im Vergleich der putativen 3D-Strukturen verschiedener rMLCs insgesamt die höchsten Strukturähnlichkeiten. Auffällig sind die Strukturähnlichkeiten der rMLCs von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* mit den rMLCs des Regenwurms *Lumbricus terrestris* (Annelida) und der Kammuschel *Argopecten irradians* (Mollusca) (Abb.I-3B).

Die Sequenzdaten des rMLCs von *H. klebelsbergi* dienen als Grundlage für weiterführende Versuchsansätze mit rekombinant exprimierten Proteinen, die zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit jedoch nicht abgeschlossen waren und nachstehend kurz dargestellt werden. Im Fokus stand die Ca^{2+} -abhängige Regulation der Myosin-ATPase durch die rMLC von *H. klebelsbergi*. Bisher wurde nur für die rMLC aus der schräggestreiften Muskulatur von *L. terrestris* die Regulation des Actomyosins durch direkte Ca^{2+} -Bindung demonstriert (Carlhoff 1988). Ein Austausch der rMLCs am Regenwurm-Myosin mit Tardigraden-rMLCs reduzierte die Ca^{2+} -Sensitivität von etwa 85 % bei diesem hybriden Actomyosin auf etwa 20 %. Diese Reduktion ist möglicherweise auf eine veränderte oder fehlerhafte Interaktion der rMLCs am Myosinkopf (Subfragment-1) zurückzuführen, die wiederum durch die Ca^{2+} -Bindung oder Phosphorylierungszustand beeinflusst werden könnte. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der rMLC EF-Hände I von *H. klebelsbergi* und *L. terrestris* zeigt in der E-Helix weitgehend Übereinstimmungen, während in der F-Helix deutlich Unterschiede

bestehen (Abb.I-3A). Basierend hierauf wurden Tardigraden rMLC-Konstrukte mit einer ausgetauschten F-Helix von *L. terrestris* rekombinant exprimiert. Durch diese chimären Tardigraden-rMLCs konnte die Ca^{2+} -Sensitivität des Actomyosins auf nahezu den ursprünglichen Wert erhöht werden (80 %). Dies lässt den Schluss zu, dass durch die Veränderung der F-Helix eine Ca^{2+} -Bindung beim Tardigraden-rMLC möglich ist. Weiterhin kann hieraus angenommen werden, dass bei *H. klebelsbergi* das Actomyosin über die Phosphorylierung der rMLCs reguliert wird.

A

Hk	-----MTGEKEKT KKRAQRA TSNVFAMFEQNQIAEF	31
Pe	-----MDGRKEKT KKRAQRA TSNVFAMFEQNQIAEF	31
Hsk	-----MA-P KRAKRR TVEGGSSSVFSMFDQTQIQEF	30
Hsm	-----MSSK---RTKT KKRPQRA TSNVFAMFDQSQIQEF	33
Dm	-----MSSRKTAGRRATT KKRAQRA TSNVFAMFDQAQIAEF	36
Ce	-----MASR---KTVNRR QRPQRA TSNVFAMFDQAQIQEF	32
Lt	AKDKEKKEKKDKKKDDAPAEAPAAAAAPAEAAPTPSAAPIHKVGNVFALFKQNQIQEF	60
Ai	-----MADKAASGVLTKLPQKQIQEM	21

*:: : * ** *:

EFH I

	X	Y	Z	-Y-X	-Z		
Hk	KEAFSMD Q N K D G F V D K D D LKDTFASLGRA-PPDSEIDAMLNEASG--PINFTMFITLFG						88
Pe	KEAFSMD Q N K D G F V D K D D LKDTFASLGRA-PPDSEIDAMLNEASG--PINFTIFLEDLL						88
Hsk	KEAFTVID Q N R D G I I D K E D LRDTFAAMGRNLNVKNEELDAMMKEASG--PINFTVFLTMFG						88
Hsm	KEAFNMID Q N R D G F I D K E D LHDMLASLGKN-PTDEYLDAMMNEAPG--PINFTMFLTMFG						90
Dm	KEAFNMID Q N R D G F V E K E D LHDMLASLGKN-PTDDYLDGMMNEAPG--PINFTMFLTLFG						93
Ce	KEAFNMID Q N R D G F I D Q E D LKDMFASLGKE-VTEQFIDSMINEAPGAQPINFTMFLTLFG						91
Lt	KEAFTMID Q D R D G I I G P D L G N I F Q Q I G R-EVDPKVVKEMLAESAE--KLNFTHFLTLFG						117
Ai	KEAFSMID V D R D G F V S K E D IKAISEQLGRA-PDDKELTAMLKEAPG--PLNFTMFLSIFS						78

**** ::* :***: :*: :*: :*: :*** *: :

Hk	EKVAGVDPEATIANAFKLFDEKGTGKLDEGPLRQLLTGVGDKLTDDELNQAFKGAPLS-K	147
Pe	QY----SQLPWKIDVLLLFSSQDFQAVYPEDRLRELLTGVDKFTDDDVSCAFKGAV----	140
Hsk	EKLKGADPEDVITGAFKVLDPGKGTIKKKFLEELLTTQCDRFSQEEIKNMWAAFPDPVG	148
Hsm	EKLNGTDPEDVIRNAFACFDEEATGTIQEDYLRELLTTMGRDFTDEEVDELYREAPIDKK	150
Dm	ERLQGTDPEDVIKNAFGCFDEENMGVLPEDRLRELLTTMGRDFTDEDVDEMYREAPIK-N	152
Ce	EKLGTDPPEVIRNAFQCFDEEDNSGKLNEEHLRELLTTMGERYSEEQVDELFRDAPIK-G	150
Lt	EKLHGTDTGTLRDAFALFDEDKLGYLLEEYVKDLLTNVGDQYNKDEIKQVWKEAPIE-G	176
Ai	DKLSGTDSEETIRNAFAMFDEQETKKLNIEYIKDLLENMGDNFNKDEMRMTFKEAPVE-G	137

: : : : : ** : : :

Hk	GQLDYQAFSKLMTRGPEDEAGAAPKKK	174
Pe	--WPYNAFSKLFTGGREDEAGAHQKKK	165
Hsk	GNVDYKNICYVITHGDAKDQE-----	169
Hsm	GNFNIEFTRILKHGAKDKDD-----	171
Dm	GLFDYLEFTRILKHGAKDKDEQ-----	174
Ce	GQFDYVEFTRMLKHGTKDKDEA-----	172
Lt	GKFDYVKFVRLIKRGKEE-----	195
Ai	GKFDYVKFTAMIKSGEEEA-----	157

* : : :

B

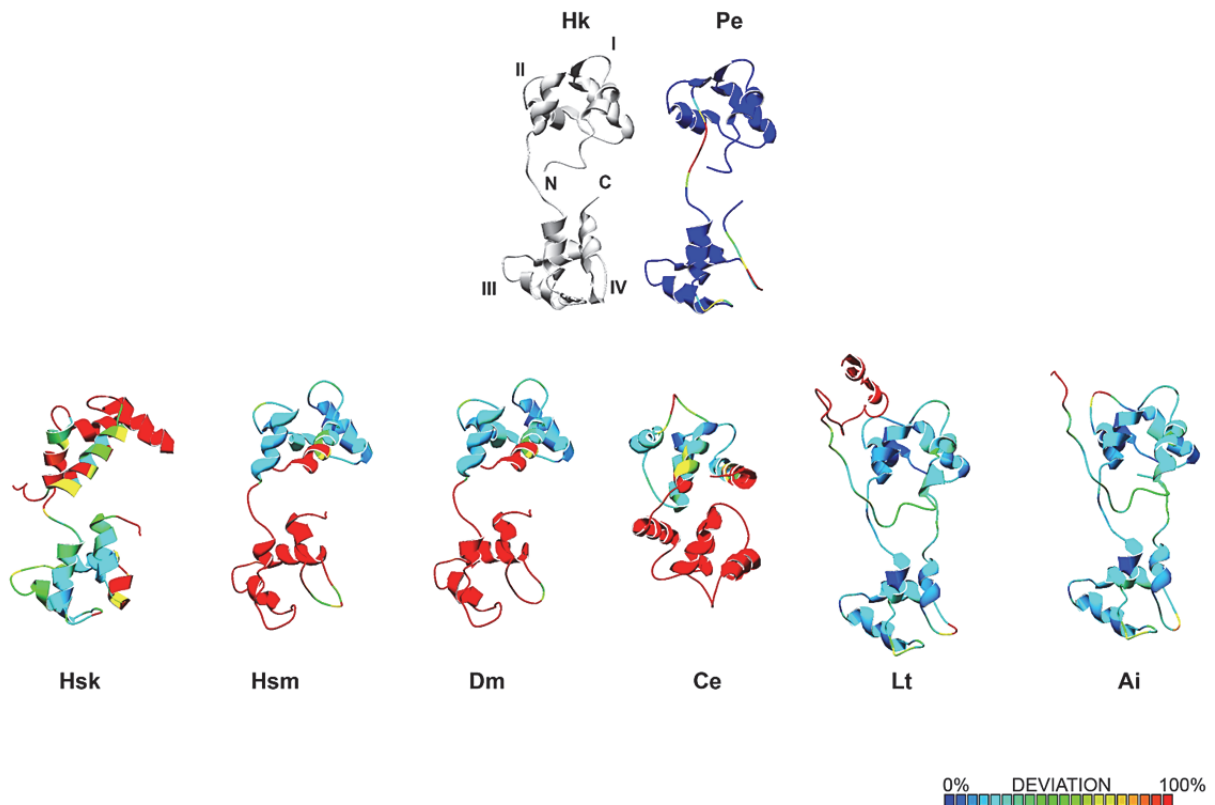


Abb.I-3 Sequenz- und Strukturvergleich der regulatorischen leichten-Ketten des Myosins (rMLCs) von Vertebraten und Evertrebraten. (A) Alle verglichenen rMLCs besitzen nur die potenziell Ca^{2+} -bindende EF-Hand I. Die rMLCs von *Hypsibius klebelsbergi* (**Hk**) und *Peripatus novaezealandiae* (**Pe**) zeigen ähnlich wie bei *Homo sapiens* (**Hsk**, Skelettmuskel Isoform; **Hsm**, glatter-Muskel Isoform), *Drosophila melanogaster* (**Dm**) und *Caenorhabditis elegans* (**Ce**) phosphorylierbare Threonine (T) und Serine (S) (grün markiert), die durch ein Erkennungsmotiv für die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (fett) flankiert werden. Nur beim Regenwurm *Lumbricus terrestris* (**Lt**), für die eine Regulation des Actomyosins durch direkte Ca^{2+} -Bindung an der rMLC demonstriert worden ist (Carlhoff 1988), zeigt sich eine um rund 30 basische Aminosäuren elongierte amino-terminale Domäne. (B) Die putativen 3D-Modelle von **Hk** und **Pe** zeigen die deutlichsten Strukturhomologien mit Abweichungen in der Interhelix zwischen der amino- und carboxy-terminalen Domäne. Auffällig ist weiterhin die Strukturähnlichkeit der rMLCs von **Hk** bzw. **Pe** mit **Lt** und der Muschel *Argopecten irradians* (**Ai**). *Hypsibius klebelsbergi* (**Hk**, Uniprot-Zugangsnummer: [G9B6R2](#)); *Peripatus novaezealandiae* (**Pe**, [A0A0A7AAJ6](#)); *Homo sapiens*, Skelettmuskel-Isoform (**Hsk**, [Q96A32](#)); *Homo sapiens*, glatter-Muskel Isoform (**Hsm**, [P19105](#)); *Drosophila melanogaster* (**Dm**, Hexapoda; [P40423](#)); *Caenorhabditis elegans* (**Ce**, Nematoda; [Q09510](#)); *Lumbricus terrestris* (**Lt**, Annelida; [P80164](#)). *Argopecten irradians* (**Ai**, Karibik-Kammuschel, Mollusca; [P13543](#)). Sequenzvergleich, Modellierung und Markierung der Strukturen bzw. Sequenzen erfolgte wie in Abb.I-2. Verwendete Protein Data Bank-Vorlage für alle Modelle: *Iwdc*.

Die Analyse der cDNA Sequenzen der essentiellen Myosin-leichte-Ketten (eMLC) von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* zeigen vier degenerierte EF-Hände (**Publikation 2, Abb. 3**).

Bisher wurde nur im Myosin-gekoppelten Molluskenmuskel die Aktivierung des Actomyosins durch Ca^{2+} -Bindung an der eMLC demonstriert. Bemerkenswerterweise zeigte sich hierbei, dass die Ca^{2+} -Bindung nicht in der kanonischen EF-Hand III erfolgt, sondern in der degenerierten EF-Hand I (Szent-Györgyi et al. 1999). Die carboxy-terminale Domäne der eMLCs ist für die Bindung in der Hebelregion des Myosins verantwortlich. Für die amino-terminale Domäne werden, ähnlich wie in rMLCs, Wechselwirkungen mit negativen Resten des Actins beschrieben (Petzhöld et al. 2014; Himmel et al. 2009).

I.2 Regulation der Actin-Myosin Interaktion bei *Hypsibius klebelsbergi* und *Peripatus novaezealandiae*

Die Sequenzanalysen der EF-Hand Proteine Calmodulin (CaM), Troponin C (TnC) und der regulatorischen Myosin-leichte-Kette (rMLC) von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* zeigen, dass die Voraussetzungen für eine duale Regulation mit einem Actin-gekoppelten Troponin-Tropomyosin System und einer Myosin-gekoppelten Regulation durch die rMLCs vorhanden sind.

Im Gegensatz zu *P. novaezealandiae*, wo nur der gereinigte Hautmuskelschlauch für die RNA Präparation verwendet worden ist, wurde bei *H. klebelsbergi* das gesamte Tier als RNA Quelle eingesetzt. Daher kann bei *H. klebelsbergi* nur auf Grundlage der cDNA Sequenzen eine Unterscheidung zwischen muskulärer und nicht-muskulärer Isoform, wie es z.B. bei Actin Isoformen möglich ist (Perrin und Ervasti 2010), nicht durchgeführt werden. Datenbankanalysen (*Uniprot*-Datenbank) zeigen jedoch innerhalb der Ecdysozoa, vor allem für die leichten-Ketten des Myosins, verschiedene muskuläre und nicht-muskuläre Isoformen. Es wird davon ausgegangen, dass in dieser Studie die Hauptisoformen der CTER-Gruppe des somatischen Muskels von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* sequenziert worden sind. Bei Untersuchungen beim Tardigraden *Hypsibius dujardini* wurde die Troponin-Untereinheit TnI nur in der somatischen Muskulatur und nicht in der Pharynxmuskulatur lokalisiert (Obinata et al. 2010). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Pharynxmuskel möglicherweise Myosin-gekoppelt reguliert wird. Für Onychophoren liegen in der Literatur keine Daten über die Lokalisation von Troponin oder der leichten-Ketten des Myosins vor. Bemerkenswert ist die deutliche Sequenzübereinstimmung der EF-Hand Proteine von *P. novaezealandiae* mit Spinnentieren (Chelicerata) (**Publikation 2, Abb. 5**) mit denen, basierend auf neuroanatomischen und 12S RNA Daten, eine Schwestergruppen-Beziehung postuliert worden ist (Strausfeld et al. 2006; Ballard et al. 1992).

Die evolutive und physiologische Signifikanz eines dualen Regulationssystems ist bis dato ungeklärt. Eine duale Regulation über zwei Kontrollsysteme erlaubt eine effektivere und feinere Steuerung des *off*- und *on-states* des Actomyosins. Weiterhin kann in einem dualen System das Actomyosin auch bei Ausfall eines Kontrollsystems fortlaufend durch das zweite Kontrollsystem reguliert werden. Bei den

Urbilateria, den letzten gemeinsamen Vorfahren der Deutero- und Protostomia, war wahrscheinlich ein duales Regulationssystem aktiv. Eine Differenzierung in ein Actin- und Myosin-gekoppeltes System erfolgte möglicherweise bei der Aufspaltung der Deutero- und Protostomia. Troponin ist im Genom der stammesgeschichtlich älteren Taxa der Nesseltiere (Cnidaria), Rippen- oder Kammquallen (Ctenophora), Plattentiere (Placozoa) und Schwämme (Porifera) nicht vorhanden. Dagegen weist das Vorhandensein einer Myosin-leichte-Ketten-Kinase in diesen Taxa auf eine Myosin-gekoppelte Regulation durch Phosphorylierung hin, was scheinbar evolutiv die ursprüngliche Muskelregulation darstellt (Steinmetz et al. 2012).

I.3 Phylogenetische Stellung der Tardigraden und Onychophoren

In der Evolution der Arthropoden stehen die als enigmatische Taxa beschriebenen Tardigraden und Onychophoren in einer unklaren phylogenetischen Stellung zueinander und innerhalb der Ecdysozoa. Schwestergruppen-Beziehungen zwischen Arthropoda und Onychophora (Hejnol und Martín-Durán 2015; Campbell et al. 2011), Arthropoda und Tardigrada (Gross und Mayer 2015), Tardigrada und Onychophora (Rota-Stabelli et al. 2011), Tardigrada und Nematoda (Yoshida et al. 2017; Meusemann et al. 2010; Philippe et al. 2005) oder zwischen Onychophora und Chelicerata (Strausfeld et al. 2006; Ballard et al. 1992) werden kontrovers diskutiert. Neue morphologische oder molekularbiologische Daten werden daher auch bezüglich ihrer phylogenetischen Bedeutung hin überprüft. Im Rahmen der eigenen Studie über die CTER-Proteine von Tardigraden und Onychophoren wurde mit 131 TnC-, 96 rMLC- und 62 eMLC-Proteinsequenzen phylogenetische Kladogramme nach dem *Maximum-Likelihood* Modell erstellt (**Publikation 1, supplementary Abb. S4**). Die Kladogramme zeigen keine eindeutige Klassifizierung zu den Ecdysozoen, jedoch eine Protein-spezifische Variation innerhalb der Ecdysozoa zu Nematoda (TnC, rMLC) oder zu Annelida und Mollusca (eMLC). Die CTER-Kladogramme stellen daher keinen phylogenetischen Spezies-Baum sondern vielmehr einen Gen-Baum dar, der mögliche funktionelle Homologien der Proteine widerspiegelt. Durch ein Mutationsereignis könnte ein Gen zwei Allele ausprägen, die auch nach einer Speziation d.h. Artbildung, im Genpool beider Arten vorhanden sein können. Im Kladogramm könnten beide Allele bzw. zwei mögliche Protein Isoformen jedoch im gleichen Ast erscheinen (Szöllösi et al. 2013; Li 1997).

Die phylogenetische Stellung von Tardigraden und Onychophoren wurde ebenfalls bei eigenen Untersuchungen am Actin-bindenden Gelsolin von *P. novaezealandiae* und des Tardigraden *Hypsibius dujardini* untersucht (**Publikation 3**). Während bei den Vertebraten das Gelsolin aus sechs Wiederholungen homologer Segmente aufgebaut ist, zeigt sich bei den Evertrebraten eine Variation in der Anzahl der Gelsolinsegmente (zur Übersicht siehe Ghoshdastider et al. 2013). Das Gelsolin bei Mycetozoa (Schleimpilze), Porifera, Cnidaria, Mollusca, Annelida und Platyhelminthes (Plattwürmer) weist drei Segmente auf. Innerhalb der Ecdysozoa zeigen *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) vier und *Drosophila melanogaster* (Hexapoda) sechs Gelsolinsegmente. Bei den eigenen Sequenzierungen

konnte bei *P. novaezealandiae* ein sechs-segmentiges Gelsolin ermittelt werden, dass sich möglicherweise wie in Arthropoden entwickelt hat und damit im Einklang ist mit der Annahme einer Schwestergruppen-Beziehung zwischen Arthropoda und Onychophora. Im Gegensatz hierzu zeigen Sequenzanalysen bei *H. dujardini* ein drei-segmentiges Gelsolin (**Publikation 5, Abb. 4**). Diese drei-segmentige Struktur stellt entweder eine sekundäre Reduktion dar, wie es auch für das vier-segmentige Gelsolin von *C. elegans* angenommen wird (Ghoshdastider et al. 2013), oder aber ist es ein plesiomorphes (ursprüngliches) Merkmal, welches beim letzten gemeinsamen Vorfahren vorhanden war. In letzterem Szenario würde ein drei-segmentiges Tardigraden Gelsolin die Stellung der Tardigraden als basalste Gruppe der Panarthropoda unterstützen.

I.4 Literatur

- Ansari S, Alahyan M, Marston SB, El-Mezgueldi M (2008) Role of caldesmon in the Ca^{2+} regulation of smooth muscle thin filaments: evidence for a cooperative switching mechanism. *J Biol Chem* 283:47-56
- Babu YS, Sack JS, Greenhough TJ, Bugg CE, Means AR, Cook WJ (1985) Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* 315:37-40
- Ballard JW, Olsen GJ, Faith DP, Odgers WA, Rowell DM, Atkinson PW (1992) Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that onychophorans are modified arthropods. *Science* 258:1345-1348
- Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E (2013) Intracellular calcium homeostasis and signaling. *Met Ions Life Sci* 12:119-168
- Camatini M, Franchi E, Lanzavecchia G (1979) *The Body Muscles of Onychophora: An Atypical Contractile System*. Academic Press
- Campbell LI, Rota-Stabelli O, Edgecombe GD, Marchioro T, Longhorn SJ, Telford MJ, Philippe H, Rebecchi L, Peterson KJ, Pisani D (2011) MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15920-15924
- Carafoli E, Krebs J (2016) Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J Biol Chem* 291:20849-20857
- Carlhoff D (1988) Dissertation. Charakterisierung der Proteine aus der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris* mit besonderer Berücksichtigung der Myosin-gekoppelten Ca^{2+} -Regulation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Chantler PD, Szent-Györgyi AG (1978) Spectroscopic studies on invertebrate myosins and light chains. *Biochemistry* 17:5440-5448
- Chattopadhyaya R, Meador WE, Means AR, Quijcho FA (1992) Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 228:1177-1192
- Chin D, Means AR (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10:322-328
- Dastych H, Kraus HJ, Thaler K (2003) Redescription and notes on the biology of the glacier tardigrade *Hypsibius klebelsbergi* Mihelcic, 1950 (Tardigrada) based on material from the Ötztal Alps, Austria. *Mitt Hamb Zool Mus Inst* 100:73-100
- D'Haese J, Traore-Freitag A, Kiehl E, Prasath T, Greven H (2011) The actin gene of *Hypsibius klebelsbergi* (Eutardigrada) – complete sequence and comparison with actin from related and non-related taxa. *J. Zoolog. Syst. Evol. Res* 49:84-89
- Espinoza-Fonseca LM, Alamo L, Pinto A, Thomas DD, Padron R (2015) Sequential myosin phosphorylation activates tarantula thick filament via a disorder-order transition. *Mol Biosyst* 11:2167-2179

- Friedberg F, Rhoads AR (2001) Evolutionary aspects of calmodulin. *IUBMB Life* 51:215-221
- Fusi L, Brunello E, Sevriva IR, Sun YB, Irving M (2014) Structural dynamics of troponin during activation of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4626-4631
- Gao N, Huang J, He W, Zhu M, Kamm KE, Stull JT (2013) Signaling through myosin light chain kinase in smooth muscles. *J Biol Chem* 288:7596-7605
- Garone L, Theibert JL, Miegel A, Maeda Y, Murphy C, Collins JH (1991) Lobster troponin C: amino acid sequences of three isoforms. *Arch Biochem Biophys* 291:89-91
- Ghoshdastider U, Popp D, Burtnick LD, Robinson RC (2013) The expanding superfamily of gelsolin homology domain proteins. *Cytoskeleton* 70:775-795
- Gomes AV, Potter JD, Szczesna-Cordary D (2002) The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB Life* 54:323-333
- Gross V, Mayer G (2015) Neural development in the tardigrade *Hypsibius dujardini* based on anti-acetylated alpha-tubulin immunolabeling. *Evodevo* 6:015-0008
- Harris HE, Tso MY, Epstein HF (1977) Actin and myosin-linked calcium regulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Biochemical and structural properties of native filaments and purified proteins. *Biochemistry* 16:859-865
- Haug JT, Mayer G, Haug C, Briggs DE (2012) A Carboniferous non-onychophoran lobopodian reveals long-term survival of a Cambrian morphotype. *Curr Biol* 22:1673-1675
- Head JF, Perry SV (1974) The interaction of the calcium-binding protein (troponin C) with bivalent cations and the inhibitory protein (troponin I). *Biochem J* 137:145-154
- Hejnol A, Martín-Durán JM (2015) Getting to the bottom of anal evolution. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* 256:61-74
- Hidalgo C, Craig R, Ikebe M, Padron R (2001) Mechanism of phosphorylation of the regulatory light chain of myosin from tarantula striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 22:51-59
- Himmel DM, Mui S, O'Neill-Hennessey E, Szent-Györgyi AG, Cohen C (2009) The on-off switch in regulated myosins: different triggers but related mechanisms. *J Mol Biol* 394:496-505
- Hong F, Haldeman BD, Jackson D, Carter M, Baker JE, Cremo CR (2011) Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. *Arch Biochem Biophys* 510:135-146
- Kawasaki H, Nakayama S, Kretsinger RH (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals* 11:277-295
- Kiehl E, Dastych H, D'Haese J, Greven H (2007) A cDNA library of the eutardigrade *Hypsibius klebelsbergi* Mihelčič, 1959 and analysis of the actin gene. 2007 66:6
- Koenders A, Lamey TM, Medler S, West JM, Mykles DL (2004) Two fast-type fibers in claw closer and abdominal deep muscles of the Australian freshwater crustacean, *Cherax destructor*, differ in Ca²⁺ sensitivity and troponin-I isoforms. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301:588-598
- Lehman W (2016) Thin Filament Structure and the Steric Blocking Model. *Compr Physiol* 6:1043-1069

- Li WH (1997) Molecular Evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Maierov VN, Crippen GM (1994) Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *J Mol Biol* 235:625-634
- Martin RE, Masaracchia RA, Donahue MJ (1986) *Ascaris suum*: regulation of myosin light chain phosphorylation from adult skeletal muscle. *Exp Parasitol* 61:114-119
- Meusemann K, von Reumont BM, Simon S, Roeding F, Strauss S, Kuck P, Ebersberger I, Walz M, Pass G, Breuers S, Achter V, von Haeseler A, Burmester T, Hadrys H, Wagele JW, Misof B (2010) A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life. *Mol Biol Evol* 27:2451-2464
- Mobjerg N, Halberg KA, Jorgensen A, Persson D, Bjorn M, Ramlov H, Kristensen RM (2011) Survival in extreme environments - on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiol* 202:409-420
- Obinata T, Ono K, Ono S (2010) Troponin I controls ovulatory contraction of non-striated actomyosin networks in the *C. elegans* somatic gonad. *J Cell Sci* 123:1557-1566
- Ojima T, Nishita K (1989) Biochemical Properties of Akazara Scallop Myosin Hybridized with the Foreign Regulatory Light Chains. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:1857-1863
- Ou Q, Shu D, Mayer G (2012) Cambrian lobopodians and extant onychophorans provide new insights into early cephalization in Panarthropoda. *Nat Commun* 3:1261
- Perrin BJ, Ervasti JM (2010) The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton* 67:630-634
- Petzhold D, Simsek B, Meissner R, Mahmoodzadeh S, Morano I (2014) Distinct interactions between actin and essential myosin light chain isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 449:284-288
- Philippe H, Lartillot N, Brinkmann H (2005) Multigene analyses of bilaterian animals corroborate the monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Mol Biol Evol* 22:1246-1253
- Qiu F, Lakey A, Agianian B, Hutchings A, Butcher GW, Labeit S, Leonard K, Bullard B (2003) Troponin C in different insect muscle types: identification of two isoforms in *Lethocerus*, *Drosophila* and *Anopheles* that are specific to asynchronous flight muscle in the adult insect. *Biochem J* 371:811-821
- Ritter O, Haase H, Morano I (1999) Regulation of *Limulus* skeletal muscle contraction. *FEBS Lett* 446:233-235
- Rota-Stabelli O, Campbell L, Brinkmann H, Edgecombe GD, Longhorn SJ, Peterson KJ, Pisani D, Philippe H, Telford MJ (2011) A congruent solution to arthropod phylogeny: phylogenomics, microRNAs and morphology support monophyletic Mandibulata. *Proc Biol Sci* 278:298-306
- Sanfelice D, Sanz-Hernandez M, De Simone A, Bullard B, Pastore A (2016) Towards Understanding the Molecular Bases of Stretch Activation: A Structural comparison of the Two Troponin C Isoforms of *Lethocerus*. *J Biol Chem* 20:726646

- Sellers JR, Chantler PD, Szent-Györgyi AG (1980) Hybrid formation between scallop myofibrils and foreign regulatory light-chains. *J Mol Biol* 144:223-245
- Steinmetz PR, Kraus JE, Larroux C, Hammel JU, Amon-Hassenzahl A, Houlston E, Worheide G, Nickel M, Degnan BM, Technau U (2012) Independent evolution of striated muscles in cnidarians and bilaterians. *Nature* 487:231-234
- Strausfeld NJ, Strausfeld CM, Stowe S, Rowell D, Loesel R (2006) The organization and evolutionary implications of neuropils and their neurons in the brain of the onychophoran *Euperipatoides rowelli*. *Arthropod Struct Dev* 35:169-196
- Szent-Györgyi AG, Kalabokis VN, Perreault-Micale CL (1999) Regulation by molluscan myosins. *Mol Cell Biochem* 190:55-62
- Szöllösi GJ, Rosikiewicz W, Boussau B, Tannier E, Daubin V (2013) Efficient exploration of the space of reconciled gene trees. *Syst Biol* 62:901-912
- Tanaka H, Takahashi H, Ojima T (2013) Ca^{2+} -binding properties and regulatory roles of lobster troponin C sites II and IV. *FEBS Lett* 587:2612-2616
- Telford MJ, Bourlat SJ, Economou A, Papillon D, Rota-Stabelli O (2008) The evolution of the Ecdysozoa. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:1529-1537
- Ueda T, Katsuzaki H, Terami H, Ohtsuka H, Kagawa H, Murase T, Kajiwarra Y, Yoshioka O, Iio T (2001) Calcium-bindings of wild type and mutant troponin Cs of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* 13:220-228
- Valeyev NV, Bates DG, Heslop-Harrison P, Postlethwaite I, Kotov NV (2008) Elucidating the mechanisms of cooperative calcium-calmodulin interactions: a structural systems biology approach. *BMC Syst Biol* 2:1752-0509
- Wakabayashi T (2015) Mechanism of the calcium-regulation of muscle contraction in pursuit of its structural basis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 91:321-350
- Walz B (1974) The fine structure of somatic muscles of Tardigrada. *Cell Tissue Res* 149:81-89
- Wnuk W (1989) Resolution and calcium-binding properties of the two major isoforms of troponin C from crayfish. *J Biol Chem* 264:18240-18246
- Yamaguchi M, Kimura M, Li ZB, Ohno T, Takemori S, Hoh JF, Yagi N (2016) X-ray diffraction analysis of the effects of myosin regulatory light chain phosphorylation and butanedione monoxime on skinned skeletal muscle fibers. *American journal of physiology Cell physiology* 310:24
- Yoshida Y, Koutsovoulos G, Laetsch DR, Stevens L, Kumar S, Horikawa DD, Ishino K, Komine S, Kunieda T, Tomita M, Blaxter M, Arakawa K (2017) Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*. *PLoS Biol* 15 (7):e200226

Publikation 1

“EF-hand proteins and the regulation of actin-myosin interaction in the eutardigrade *Hypsibius klebelsbergi* (Tardigrada)”

Thiruketheeswaran P, Greven H, D'Haese J (2012) Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology 317:311-320.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jez.1724>

Publikation 2

“EF-hand proteins in onychophorans as compared to tardigrades and other ecdysozoans”

Thiruketheeswaran P, Greven H, D'Haese J (2013) Journal of Limnology 72:36-43.

<https://www.jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2013.s1.e5>

Publikation 3

“Gelsolin in Onychophora and Tardigrada with notes on its variability in the Ecdysozoa”

Thiruketheeswaran P, Greven H, D'Haese J (2017) Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Physiology 203:47-52.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096495916301245?via=ihub>

Teil II

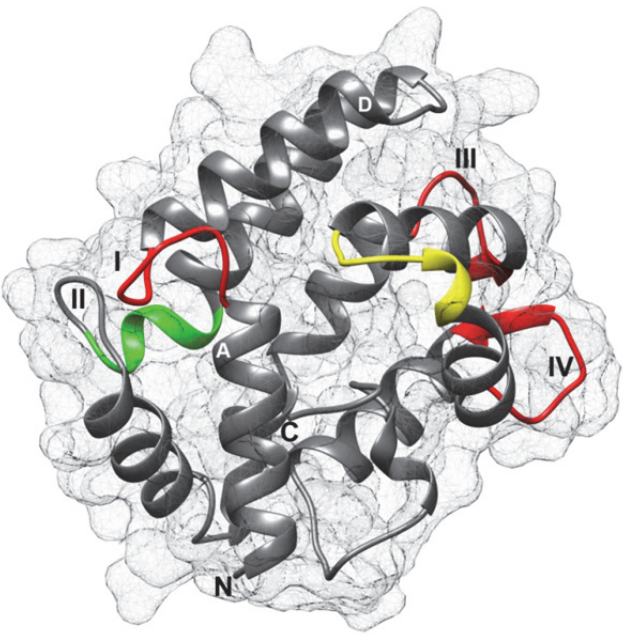
II. Lösliche Ca^{2+} -bindende Proteine (SCBP) vom Regenwurm *Lumbricus terrestris*

II.1 SCBP Isoformen im Regenwurm *Lumbricus terrestris*

Drei SCBP Isoformen (SCBP_{1-3}) wurden bisher aus dem Hautmuskelschlauch von *L. terrestris* durch Ionenaustauscherchromatographie isoliert. Hierbei konnte SCBP_1 nur in sehr geringer Konzentration und nicht reproduzierbar isoliert werden. Sein sicherer Nachweis gelang erst durch eine Kreuzreaktion mit SCBP_3 -Antikörper (Kiehl 2001; Huch 1991; Huch et al. 1988). Die durch Huch et al. (1988) ermittelten Aminosäurezusammensetzungen ermöglichen eine klare Differenzierung zwischen SCBP_{1-3} . In SCBP_1 liegt kein Tryptophan vor, es hat im Vergleich zu SCBP_2 doppelt so viel Prolin und im Vergleich zu SCBP_3 ein Cystein, ein Histidin und doppelt so viel Valin.

Bei den eigenen Sequenzierungen wurde eine vierte SCBP Isoform aus der cDNA des Kaumagens vollständig sequenziert. Durch Vergleiche mit den bekannten cDNAs und genomischen Sequenzen von SCBP_2 (zwei unterschiedliche Gene mit jeweils einem Intron von 2450 bzw. 2200 Bp) und SCBP_3 (ein Gen mit einem 2200 Bp Intron) (Kiehl 2001) lässt sich die Isoform aus dem Kaumagen (benannt als SCBP_{2b}) eindeutig als die SCBP_2 Isoform mit dem langen Intron identifizieren. In der cDNA des Kaumagens konnte ausschließlich nur SCBP_{2b} identifiziert werden. Unter der Annahme, dass SCBP_{2b} für die langsamen Muskelzellen des Kaumagens spezifisch ist, muss das von Huch et al. (1988) isolierte SCBP_2 aus dem Hautmuskelschlauch nahezu vollständig aus der SCBP_2 Isoform mit dem kurzen Intron (benannt als SCBP_{2a}) bestanden haben. Die Proteinsequenzen von SCBP_{2a} und SCBP_{2b} unterscheiden sich nur durch einen konservierten Austausch von zwei Aminosäuren, wobei der erste (A_{14} zu V) in der E-Helix und der zweite (D_{38} zu E) außerhalb der EF-Hände lokalisiert ist (Abb.II-1, **Publikation 4, Abb. 1**). Eine Untersuchung ob diese Aminosäuresubstitutionen zwischen SCBP_{2a} und SCBP_{2b} einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Bindungskinetik haben, steht noch aus. Jedoch zeigt ein Vergleich der Ca^{2+} -abhängigen Mobilität der rekombinanten Proteine SCBP_{2a} und SCBP_{2b} im Harnstoffgel identische elektrophoretische Mobilitäten.

A



B

SCBP_{2a}

Helix E	loop	Helix F	
MSAFYLR	KLKTYFAATDTDKDGVLTENDYHEMARRFID	IVKLDDAQGKKLHALAAKVW	22
	NDFFKGWATDGKSLTQDQLIASFLKRRSDPKFLES	LK	13
	LMTVEFHVVDINKDGSIQLDEFTIMFRFHGIDAA		5
	HAKASFEAIDNSNDGVISLDEFLTAVVDFFTGEDEKSSSRLFWGPLV		

SCBP₃

Helix E	loop	Helix F	
MADAFIER	KLKTYFSRIDFDKDGAITRSDFEGLGTRF	VESEKLDAAKGADLKAKLVQVW	22
	EQYLKGVVSDGTRLTQAVFVEAVKKQLGDPNFKKVL	AG	15
	PLPLFFSAVDGNGDGLIQKDEFQLFFKLLGIPE		4
	SAEKSFEAIDTNKDGDISKKEFVIAGTDFFTSTDESSPSKYFWGPLV		

Abb.II-1 Putatives 3D-Modell und EF-Hand Sequenzen von SCBP_{2a} und SCBP₃ von *Lumbricus terrestris*.
(A) Dargestellt ist das 3D-Modell von SCBP_{2a} errechnet mit *Phyre*² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) mit der *Protein Data Bank*-Vorlage: 2scp. Im Gegensatz zu den EF-Hand Ca²⁺-Sensorproteinen Calmodulin, Troponin C und den leichten-Ketten des Myosins weisen SCBP und Parvalbumin eine kompakte Struktur ohne eine Interhelix auf, welches die amino- und carboxy-terminalen Enden verbindet

(Rabah et al. 2005; Cook et al. 1993; Vijay-Kumar und Cook 1992). Die beiden Strukturabweichungen zu SCBP₃ sind in grün bzw. gelb im 3D-Modell und die entsprechenden Aminosäuren in gleicher Farbe in der SCBP_{2a} Sequenz (**B**) markiert. Abweichungen zeigen sich in der degenerierten EF-Hand II und in der Region zwischen der EF-Hand III und IV, beides Regionen die nicht direkt an der Ca²⁺-Bindung beteiligt sind. SCBP_{2a} unterscheidet sich nur in zwei Aminosäuren (A₁₄ zu V und D₃₈ zu E) von SCBP_{2b} (im 3D-Modell und in der Sequenz gekennzeichnet). Amino (N)-, carboxyl (C)-Ende und EF-Hände (I-IV) sind markiert. Die Abstände zwischen den einzelnen EF-Händen sind am Rand angegeben. Charakteristisch bei Parvalbumin und SCBP sind die unregelmäßigen Abstände zwischen den EF-Händen I-IV. Sequenzvergleiche zeigen für diese Regionen Abstände von 21-24 Aminosäuren zwischen dem ersten EF-Hand Paar, 12-16 Aminosäuren zwischen der II. und III. EF-Hand sowie durch 4-7 Aminosäuren zwischen der III. und IV. EF-Hand.

Obwohl die cDNA Sequenzen von SCBP_{2a/b} und SCBP₃ jeweils drei potentiell Ca²⁺-bindende EF-Hände (I, III und IV, Abb.II-1) aufweisen, konnten Huch et al. (1988) die Bindung von drei Ca²⁺ nur für SCBP₃ ($K_D = 1.3 \times 10^{-7}$ M) nachweisen, während für SCBP₂ eine Bindung von zwei Ca²⁺ ($K_D = 1.5 \times 10^{-7}$ M) ermittelt wurde. Unter Annahme der unterschiedlichen Bindungskonstanten für die Ca²⁺- und Mg²⁺- Bindung (Schwaller 2010; Celio et al. 1996; Zot und Potter 1984) lassen sich hiernach für SCBP_{2a/b} und SCBP₃ drei bzw. zwei Ca²⁺/Mg²⁺-Bindungsstellen ableiten. In der Anzahl Ca²⁺-spezifischer und Ca²⁺/Mg²⁺-Bindungsstellen zeigen sich Unterschiede zwischen den SCBPs verschiedener Taxa (Takagi et al. 1986; Collins et al. 1983). Während bei Vertebraten die Funktion einer einzelnen Parvalbumin Isoform durch eine Reihe weiterer Ca²⁺-bindender Proteine, z.B. Calbindine oder S100 Proteine moduliert wird (Omar et al. 2016; Donato et al. 2013), besitzen Evertrebraten scheinbar verschiedene SCBP Isoformen, welche speziell an die Anforderungen des Muskelzelltyps angepasst sind.

Die Ca²⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität der rekombinanten Regenwurm SCBPs mit einem carboxy-terminalen Histidin-tag und der nativ isolierten Proteine ist nahezu identisch. Hierbei zeigt sich in der Ca²⁺-freien Form eine deutlich höhere Ca²⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität als Ca²⁺-gebunden (**Publikation 4, Abb. 3**). Eine durch Ca²⁺-Bindung induzierte Freilegung hydrophober Regionen, wie z.B. beim Calmodulin, kann für die Regenwurm SCBPs ausgeschlossen werden. Dies kann durch hydrophobe Interaktionschromatographie demonstriert werden, wobei SCBP Ca²⁺-gebunden nicht mit der hydrophoben Matrix interagiert (D’Haese, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung unterstützt die postulierte funktionelle Rolle der Regenwurm SCBPs als Ca²⁺-Puffer im Gegensatz zu Ca²⁺-Sensoren, die Ca²⁺-aktiviert über die freigelegten hydrophoben Regionen mit Zielproteinen interagieren. Spektroskopische Untersuchungen beim SCBP des Seeringelwurms *Nereis diversicolor* demonstrieren, dass trotz einer Ca²⁺ induzierten Erhöhung des α -helikalen Anteils um rund 30 %, die kompakte ellipsoide Grundstruktur erhalten bleibt (Cox und Stein 1981). Gleichmaßen zeigen röntgenkristallografische Untersuchungen beim Vertebraten Parvalbumin, Ca²⁺-gebunden als auch Ca²⁺-frei, eine ellipsoide Tertiärstruktur mit einem hydrophoben Kern und einer Oberfläche mit überwiegend hydrophilen Aminosäuren (Hentzl et al. 2011, 2008).

II.2 Genomische Organisation und Northern Blot Analyse

Die drei SCBP Gene von *L. terrestris* zeigen jeweils nur ein Intron (**Publikation 4, Abb. 2B**). Alle befinden sich in der Region zwischen der I. und II. EF-Hand. Mit bis zu elf Introns sind die genomischen Strukturen der SCBPs der meisten Evertabraten, z.B. der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, Mücke *Anopheles gambiae* oder der Kopflaus *Pediculus humanus* (*Ensembl Metazoa* Datenbanknummern: [FBgn0026144](#); [AGAP007963](#); [PHUM607850](#)) dagegen wesentlich komplexer aufgebaut.

Northern Blots zeigen drei mRNA Transkripte, zwei für SCBP₂ und einen für SCBP₃ (**Publikation 4, Abb. 2A**). Da zwischen der kodierenden als auch der nicht-kodierenden cDNA Regionen der beiden SCBP₂ Isoformen kein Längenunterschied ermittelt werden konnte, müssen die unterschiedlich langen mRNA-Transkripte von SCBP₂ auf variierende Poly(A⁺)-Längen zurückzuführen sein. Die detektierten mRNA Transkripte zeigen damit, dass die drei identifizierten Regenwurm SCBP Gene zu drei unterschiedliche Isoformen transkribiert werden.

II.3 Lokalisation von SCBPs durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

II.3a SCBPs im Muskel

Durch FISH konnten in diesem Versuchsteil auf mRNA-Ebene SCBPs im Muskel von *L. terrestris* nachgewiesen werden. SCBP wird im proximalen Bereich der Längs- und Ringmuskulatur des Hautmuskelschlauches exprimiert (**Publikation 4, Abb. 4**). Diese Verteilung korreliert mit einer hohen Myosin ATPase- und einer niedrigen Succinatdehydrogenase-Aktivität. Kennzeichnendes Merkmal dieser proximalen schnellen Muskelzellen ist die Expression der 25 kD Isoform der regulatorischen Myosin-leichte-Kette (rMLC), im Gegensatz zu den langsamen Muskelzellen des Kaumagens mit der 28 kDa rMLC Isoform (D'Haese und Carlhoff 1987; Carlhoff und D'Haese 1987). Die langsamen Muskelzellen des Kaumagens zeigen nur eine schwache SCBP Expression. Dies ist in Übereinstimmung mit der quantitativen Analyse des SCBP-Gehaltes, wo im Hautmuskelschlauch drei Zehnerpotenzen mehr SCBP gefunden worden ist als im Kaumagen (Huch und D'Haese 1992).

II.3b SCBPs im Nervengewebe

Bei den FISH-Analysen im Nervengewebe konnten in den Cerebralganglien und den Circumpharyngealkonnektiven starke mRNA-Färbungen in den peripheren Arealen beobachtet werden. Weiterhin wurde SCBP-mRNA in der Myelinscheide um das Bauchmark nachgewiesen (**Publikation 4, Abb. 5 und 6**). In Kontrollfärbungen mit Kryoschnitten aus Mäusehirn und -muskel zeigten die verwendeten FISH-Sonden, trotz hoher Sequenzübereinstimmung der EF-Hand Proteine zwischen Vertebraten- und Evertabraten, keinerlei Kreuzreaktionen mit Parvalbumin, Calmodulin oder anderen EF-Hand Proteinen aus der CTER-Gruppe. Die spezifische und lokal begrenzte Anfärbung in den Cerebralganglien, im Circumpharyngealkonnektiven und im Bauchmark sind ein Hinweis darauf, dass

den neuronalen SCBPs von *L. terrestris* eine spezifische Funktion zukommt. Die neuronalen SCBPs der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Meeresschnecke *Aplysia californica* wurden hauptsächlich in elektrisch stillen Neuronen mit dem Monoamin Serotonin als Transmitter nachgewiesen (Kelly et al. 1997; Hermann et al. 1991). Es wurde daher eine ähnliche Funktion wie in Vertebraten angenommen, nämlich dass in elektrisch stillen Neuronen Ca^{2+} -bindende Proteine als Ca^{2+} -Puffer die spontane Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Kanäle verhindern. Neuronales Parvalbumin wird in Säugetieren in GABA (γ -Aminobuttersäure)-Neuronen exprimiert, die eine hohe elektrische Aktivität zeigen. Durch einen Aktionspotential ausgelöster Ca^{2+} -Einstrom kann Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle öffnen. Dieses führt zu einer langanhaltenden Hyperpolarisation, wodurch der Membranwiderstand vermindert wird und die Zelle gegenüber weiteren Erregungen unempfindlicher wird (relative Refraktärzeit). Parvalbumin puffert das Ca^{2+} und schließt damit die Kaliumkanäle. Damit führt das Parvalbumin zu einer schnelleren Repolarisation wodurch in kürzeren Abständen weitere Aktionspotentiale initiiert werden können (Hu et al. 2014). GABA-Neuronen wurden auch im Bauchmark, Ober- und Unterschlundganglion von *L. terrestris* nachgewiesen. Hierbei sind diese Neuronen hauptsächlich in den Bauchmarkganglien lokalisiert, wo eine höhere Freisetzung von GABA-Transmitter erfolgt als im Circumpharyngealkonnektiv (Telkes et al. 1996; Cowan et al. 1990; Gardner und Walker 1982). Ähnlich wie neuronales Parvalbumin haben SCBPs in Nervenzellen höchstwahrscheinlich eine Ca^{2+} -Pufferfunktion, wodurch sie hierbei exitatorische und inhibitorische Effekte auf die Motoneuronen auslösen können.

II.4 Funktionelle Untersuchungen

SCBPs weisen *in vivo* zwei hervorstechende Eigenschaften auf: (1) sie besitzen alle mindestens eine $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Bindungsstelle und (2) ist der Gehalt in schnell kontrahierenden Muskeln um mehrere Größenordnungen höher als in langsam kontrahierenden Muskeln. Hieraus lassen sich analog zum Vertebraten Parvalbumin zwei physiologische Funktionen für SCBPs in Muskelzellen postulieren, nämlich als Ca^{2+} -Pufferproteine und als Ca^{2+} -Transporter (Ca^{2+} -Shuttle) die während der Muskelrelaxierung Ca^{2+} vom Actomyosin zum sarkoplasmatischen Reticulum (SR) transportieren. Damit SCBPs in der Muskulatur des Regenwurms als relaxierende Faktoren interagieren können, müssen drei Bedingungen erfüllt sein. Regenwurm SCBPs müssen in der Lage sein, den regulatorischen Proteinen des Actomyosins (Troponin C, essentielle- und regulatorische Myosin-leichte-Kette) Ca^{2+} zu entziehen. Wenn dies zutrifft dürfen SCBPs, bei Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, nicht unmittelbar mit dem Actomyosin um das Ca^{2+} konkurrieren und damit die Kontraktion unterbinden. Jedoch muss das SCBP zeitlich vor der sarkoplasmatischen ATP-abhängigen Ca^{2+} -Pumpe das Ca^{2+} -Signal löschen, um als ein relaxierender Faktor zwischen Actomyosin und SR zu interagieren.

II.4a Ca^{2+} -Verteilung zwischen SCBP und Actomyosin

Aus den genannten Bedingungen erschließt sich eine zeitliche Abfolge des Ca^{2+} -Fluxes bei der Muskelrelaxierung. Dieses lässt sich in zwei Phasen einteilen, welches die beiden postulierten physiologischen Funktionen von SCBPs als Ca^{2+} -Puffer- und Ca^{2+} -Transporter nacheinander in Erscheinung treten lässt. In der ersten Phase wird das einströmende Ca^{2+} zuerst am Actomyosin gebunden und wird erst hiernach durch SCBP entzogen.

Die Funktion als Ca^{2+} -Puffer bzw. -Chelator konnte zunächst mit Regenwurmkomponenten demonstriert werden, wo die ATPase-Aktivität des Actomyosins in Gegenwart von SCBP gehemmt wurde (**Publikation 5, Abb. 1**). Basierend hierauf wurde eine $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Verschiebung mit einem Proteingemisch aus Actomyosin und SCBP, beide decalcifiziert und Mg^{2+} -beladen, gemessen. Dieser Ansatz simuliert einen Ca^{2+} -Stimulus in einer ruhenden Zelle ($[\text{Ca}^{2+}]$: etwa 100 nM, $[\text{Mg}^{2+}]$: 0.5-1 mM). Hierbei zeigt sich, dass $^{45}\text{Ca}^{2+}$ zuerst an das Actomyosin bindet. Mit zunehmender Einwirkungsdauer nimmt der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Beladungsgrad von Actomyosin ab und parallel dazu die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Beladung am SCBP progressiv zu (**Publikation 5, Abb. 2**). Daraus lässt sich folgende physiologische Annahme für das Regenwurm SCBP ableiten: Im Ruhezustand der Muskelzelle sind die Ca^{2+} -Bindestellen sowohl an den regulatorischen Proteinen des Actomyosins als auch am SCBP mit Mg^{2+} gesättigt. Eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} führt zum Austausch des Mg^{2+} durch Ca^{2+} . Eine langsamere Mg^{2+} -Dissoziation am SCBP erlaubt, dass das Ca^{2+} zuerst an die regulatorischen Proteinen bindet und die Kontraktion initiiert. Erst hiernach wirkt das SCBP als Ca^{2+} -Puffer und entzieht dem Actomyosin das Ca^{2+} . Betrachtet man die Dauer einer phasischen Kontraktion einer Längsmuskelzelle des Regenwurms, so erfolgt diese in einem Zeitfenster von ca. 100-200 Millisekunden (Tashiro 1971). In diesem Zeitfenster war im experimentellen Ansatz eine $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Messung nicht durchführbar. Dennoch konnte auch *in vitro* eine $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Verschiebung vom Actomyosin zum SCBP nachgewiesen werden, welches nahezu vollständig innerhalb der ersten Minute erfolgte. Der Ca^{2+} -Entzug vom Actomyosin wurde bisher nur für Parvalbumin an isolierten Myofibrillen demonstriert (Gerday und Gillis 1976).

II.4b Ca^{2+} -Verteilung zwischen SCBP und dem SR

In Ca^{2+} -Verteilungsexperimenten zwischen SCBP und SR konnte gezeigt werden, dass durch die Pumpaktivität der Ca^{2+} -ATPase des SRs der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Beladungszustand des SCBPs abnimmt (**Publikation 5, Abb. 5**). Dies demonstriert, dass das Regenwurm SCBP durch das SR decalcifiziert werden kann. Im Gegensatz zum Parvalbumin, wo eine direkte Interaktion mit dem SR beschrieben wurde (Ushio und Watabe 1994), konnte dies für das Regenwurm SCBP bzw. SR ausgeschlossen werden. Hierbei konnte nach erfolgter Reaktion zwischen $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -beladenem SCBP und SR beide Proteinkomponenten durch Filtrationsschritte getrennt werden.

II.4c Erleichterte Ca^{2+} -Diffusion durch SCBP

Durch eine fortschreitende Ca^{2+} -Beladung des SCBPs wird eine Ca^{2+} -Sättigung erreicht, wonach es nicht mehr als Ca^{2+} -Puffer wirken kann. Zur Klärung der Frage ob SCBPs Ca^{2+} -gesättigt in der Lage sind, als Ca^{2+} -Transporter Ca^{2+} von den kontraktilen Proteinen zum SR zu transportieren, wurde ein transkompartimentaler unidirektionaler $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Flux in An- und Abwesenheit von SCBP untersucht. Hierbei konnte in einer Diffusionsapparatur (Abb.II-2) demonstriert werden, dass der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Flux in Anwesenheit von Regenwurm SCBPs konzentrationsabhängig um rund 70 % erhöht wird (**Publikation 5, Abb. 3 und 4**). Diese Ergebnisse stützen das Modell eines „relaxierenden Faktors“, wo SCBP als Ca^{2+} -Transporter (Ca^{2+} -Shuttle) Ca^{2+} -Ionen vom Actomyosin zum SR überträgt (Blum et al. 1977; Pechere et al. 1977). In Kontrollexperimenten mit Ovalbumin oder Myoglobin konnte Feher (1983) demonstrieren, dass dieses Phänomen der erleichterten Ca^{2+} -Diffusion mit der Ca^{2+} -bindenden Fähigkeit eines Proteins zusammenhängt. Eine erleichterte Ca^{2+} -Diffusion konnte Feher hiernach ebenfalls mit dem Ca^{2+} -Chelator Chelex zeigen. Jedoch war die erleichterte Ca^{2+} -Diffusion mit diesen nicht frei-diffusiblen Harzkugeln 20x weniger effizient, als das in der gleichen Molarität eingesetzte Ca^{2+} -bindende Protein Calbindin_{D28K}. Dieser deutliche Unterschied der Effizienz eines frei- und eines nicht frei-diffusiblen Ca^{2+} -bindenden Moleküls muss daher auf unterschiedliche physikalische Vorgänge zurückzuführen sein. Bei einem nicht frei-diffusiblen Ca^{2+} -bindenden Molekül, wie den Chelex Harzkugeln, lässt sich das sogenannte „Eimerbrigaden-Modell“ (*bucket brigade*) anwenden, wonach das Ca^{2+} in einer stationären Kette von einem Molekül zum anderen weitergegeben wird (Wittenberg 1970). Beim frei im Cytosol diffusiblen SCBP handelt es sich dagegen um eine translationale Diffusion, wo das SCBP als Ca^{2+} -Transporter durch die Kinetik eines transzellulären Ca^{2+} -Gradienten vorangetrieben wird (Gillis 1985; Cannell und Allen 1984; Baylor et al. 1983; Gillis et al. 1982). Durch die Pumpaktivität der Ca^{2+} -ATPase des SRs ist die Ca^{2+} -Konzentration an der Grenzfläche zwischen dem Cytosol und dem SR niedriger als im Bereich des Actomyosins. Durch die Anwesenheit von SCBP wird dieser Gradient erhöht und damit der unidirektionale Ca^{2+} -Flux vom Actomyosin zum SR beschleunigt. Wie Feher et al. (1989) mit Calmodulin zeigen konnten, tritt die erleichterte Ca^{2+} -Diffusion nur dann in voller Stärke auf, wenn eine Ca^{2+} Sättigung des Proteins vorliegt. Aufgrund des langsamen Mg^{2+} - Ca^{2+} Austausches am SCBP, wodurch Ca^{2+} zuerst an die regulatorischen Proteinen bindet, ist es fraglich, ob *in vivo* der Ca^{2+} Gradient während einer einzelnen Kontraktion (*twitch*) ausreichend ist, um das vorhandene SCBP zu sättigen. Es ist eher davon auszugehen, dass das Phänomen der erleichterten Ca^{2+} -Diffusion erst bei einem repetitiven Ca^{2+} Stimulus bzw. einer tonischen Kontraktion auftritt. Tonische und tetanische Muskelkontraktionen wurden für die Längsmuskulatur des Regenwurms schon nachgewiesen (Tashiro und Yamamoto 1971). Hierbei könnte das SCBP nach einem lang anhaltendem Ca^{2+} Einstrom das Ca^{2+} Signal durch eine erleichterte Ca^{2+} -Diffusion zum SR löschen.

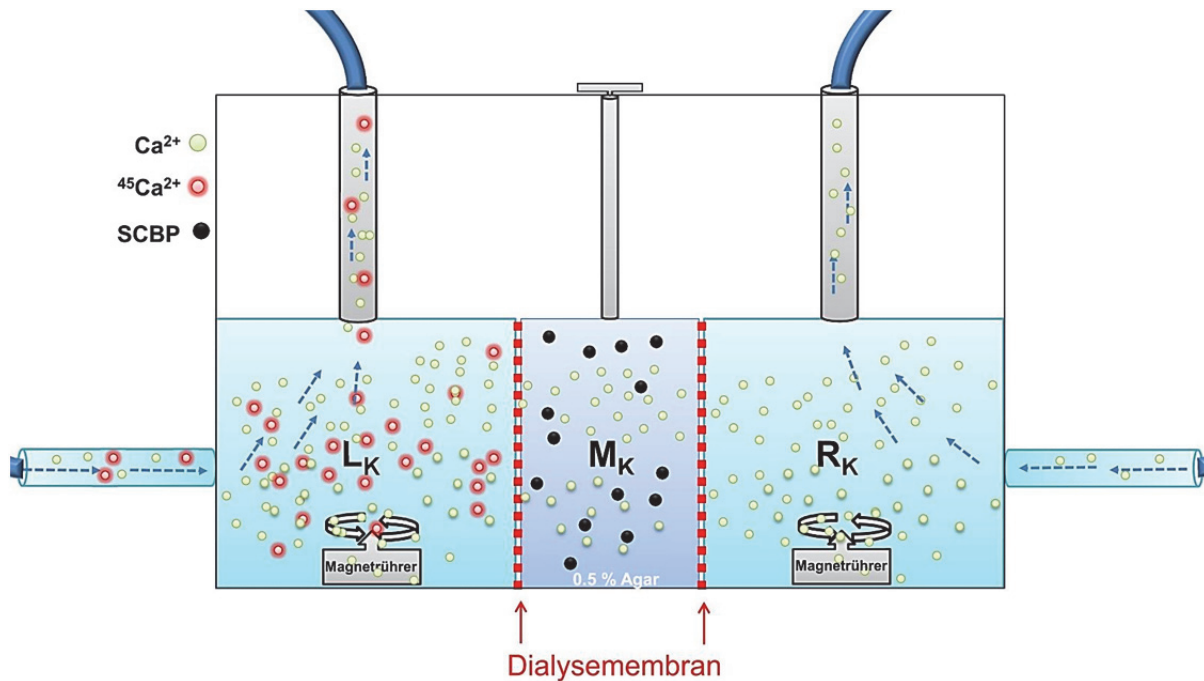


Abb.II-4 Schematische Darstellung der Diffusionsapparatur und Ablauf der Diffusionsexperimente.

Die Diffusionsapparatur bestand aus drei Kammern (linke L_K , mittlere M_K und rechte Kammer R_K). Die M_K wird durch zwei Dialysemembranen (*cut-off*: 6-8 kDa) von L_K und R_K getrennt. An die L_K und R_K sind jeweils zwei Schlauchsysteme angeschlossen, die seitlichen dienen dem Puffereinlass und die oberen zum Pufferauslass. In der L_K und R_K befindet sich jeweils ein Magnetrührer, der über einen mikromotorgetriebenen Ringmagneten angetrieben wird. Durch einen senkrechten Einlass kann die Probenlösung in die M_K (Füllkanal: 1mm Durchmesser) injiziert werden. Die SCBP-Probe (schwarze Kugeln) befindet sich in der M_K in einem Gel aus 0.5 % Agar (w/v) in Diffusionspuffer [Puffer_D: 10 mM HEPES (pH 7.0), 140 mM KCL, 0.5 mM MgCl₂, 10 μ M CaCl₂ (grüne Kugeln)]. Die Messung des $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Fluxes (rote Kugeln) von der L_K in die R_K wurde mit der kontinuierlichen Perfusion (12 ml/h, angedeutet durch die gestrichelten Pfeile) der L_K mit Puffer_D + $^{45}\text{Ca}^{2+}$ und der R_K mit Puffer_D ohne $^{45}\text{Ca}^{2+}$ gestartet. Das Perfundat der R_K wurde mittels eines Fraktionssammlers für die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Bestimmung gesammelt. Der ermittelte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Flux ist der Quotient aus der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (in cpm ml⁻¹) von R_K zu L_K ($[\text{}^{45}\text{Ca}^{2+}]_{R_K} / [\text{}^{45}\text{Ca}^{2+}]_{L_K} \times 100$). Wird die M_K nur mit Puffer_D ohne Agar gefüllt, ist der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Flux aufgrund einer Durchmischung unabhängig von der Diffusionsstrecke (Feher 1984). Die Umgebungstemperatur wurde mit einem kalibriertem Temperaturfühler kontinuierlich kontrolliert.

Erstmals wurde mit diesen Verteilungs- und Diffusionsexperimenten für das SCBP eines Evertrebraten die Rolle als Ca^{2+} - Puffer und Ca^{2+} -Transporter zwischen dem Actomyosin und dem SR untersucht. Hierbei wurden alle getesteten Proteinkomponenten aus *L. terrestris* isoliert. Das Regenwurm SCBP kann dem Actomyosin Ca^{2+} entziehen, den Ca^{2+} -Flux erhöhen und vom SR decalcifiziert werden. Die erzielten Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass das SCBP von *L. terrestris* funktionell dem Vertebraten Parvalbumin entspricht.

II.5 Literatur

- Arif SH (2009) A Ca^{2+} -binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *Bioessays* 31:410-421
- Baylor SM, Chandler WK, Marshall MW (1983) Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from Arsenazo III calcium transients. *J Physiol* 344:625-666
- Blum HE, Lehky P, Kohler L, Stein EA, Fischer EH (1977) Comparative properties of vertebrate parvalbumins. *J Biol Chem* 252:2834-2838
- Cannell MB, Allen DG (1984) Model of calcium movements during activation in the sarcomere of frog skeletal muscle. *Biophys J* 45:913-925
- Carlhoff D, D'Haese J (1987) Slow type muscle cells in the earthworm gizzard with a distinct, Ca^{2+} -regulated myosin isoform. *J Comp Physiol B* 157:589-597
- Celio MR, Pauls T, Schwaller B (1996) *Guidebook to the Calcium-Binding Proteins*. Oxford University Press, New York
- Chin D, Means AR (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10:322-328
- Collins JH, Johnson JD, Szent-Györgyi AG (1983) Purification and characterization of a scallop sarcoplasmic calcium-binding protein. *Biochemistry* 22:341-345
- Cook WJ, Jeffrey LC, Cox JA, Vijay-Kumar S (1993) Structure of a sarcoplasmic calcium-binding protein from amphioxus refined at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 229:461-471
- Cowan RL, Wilson CJ, Emson PC, Heizmann CW (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 302:197-205
- Cox J, Stein EA (1981) Characterization of a new sarcoplasmic calcium-binding protein with magnesium-induced cooperativity in the binding of calcium. *Biochem* 20:5430-5436
- Cox JA, Wnuk W, Stein EA (1976) Isolation and properties of a sarcoplasmic calcium-binding protein from crayfish. *Biochemistry* 15:2613-2618
- D'Haese J, Carlhoff D (1987) Localization and histochemical characterization of myosin isoforms in earthworm body wall muscle. *J Comp Physiol B* 157:171-179
- Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL (2013) Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 13:24-57
- Feher JJ (1983) Facilitated calcium diffusion by intestinal calcium-binding protein. *Am J Physiol* 244:C303-307
- Feher JJ (1984) Measurement of facilitated calcium diffusion by a soluble calcium-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 773:91-98
- Feher JJ, Fullmer CS, Fritsch GK (1989) Comparison of the enhanced steady-state diffusion of calcium by calbindin-D9K and calmodulin: possible importance in intestinal calcium absorption. *Cell Calcium* 10:189-203

- Gao Y, Gillen CM, Wheatly MG (2006) Molecular characterization of the sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) from crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 144:478-487
- Gardner CR, Walker RJ (1982) The roles of putative neurotransmitters and neuromodulators in annelids and related invertebrates. *Prog Neurobiol* 18:81-120
- Gerday C (1982) Soluble calcium-binding proteins from fish and invertebrate muscle. *Mol Physiol* 2:63-87
- Gerday C (1988) Soluble calcium binding proteins in vertebrate and invertebrate muscles. *Calcium and calcium-binding Proteins*. Springer Verlag, Berlin, pp 23-39
- Gerday C, Gillis JM (1976) Proceedings: The possible role of parvalbumins in the control of contraction. *J Physiol* 258:96P-97P
- Gillis JM (1985) Relaxation of vertebrate skeletal muscle. A synthesis of the biochemical and physiological approaches. *Biochim Biophys Acta* 811:97-145
- Gillis JM, Thomason D, Lefevre J, Kretsinger RH (1982) Parvalbumins and muscle relaxation: a computer simulation study. *J Muscle Res Cell Motil* 3:377-398
- Henzl MT, Tanner JJ (2008) Solution structure of Ca^{2+} -free rat alpha-parvalbumin. *Protein Sci* 17:431-438
- Henzl MT, Tanner JJ, Tan A (2011) Solution structures of chicken parvalbumin 3 in the Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -bound states. *Proteins* 79:752-764
- Hermann A, Pauls TL, Heizmann CW (1991) Calcium-binding proteins in *Aplysia* neurons. *Cell Mol Neurobiol* 11:371-386
- Hu H, Gan J, Jonas P (2014) Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin (+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* 345:31
- Huch R (1991) Dissertation. Untersuchungen zur Wechselwirkung löslicher Calcium-bindender Proteine (SCBP) aus der Regenwurmmuskulatur mit dem Actomyosin und dem sarkoplasmatischen Retikulum. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Huch R, D'Haese J (1992) Quantification of the soluble calcium-binding protein (SCBP) in various muscle tissues of the terrestrial oligochaete *Lumbricus terrestris*. *Soil Biol Biochem* 24:1231 – 1235
- Huch R, D'Haese J, Gerday C (1988) A soluble calcium-binding protein from the terrestrial annelid *Lumbricus terrestris*. *Journal of Comparative Physiology B* 158:325-334
- Kawasaki H, Nakayama S, Kretsinger RH (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals* 11:277-295
- Kelly LE, Phillips AM, Delbridge M, Stewart R (1997) Identification of a gene family from *Drosophila melanogaster* encoding proteins with homology to invertebrate sarcoplasmic calcium-binding proteins (SCPS). *Insect Biochem Mol Biol* 27:783-792

- Kerschbaum HH, Kainz V, Hermann A (1992) Sarcoplasmic calcium-binding protein-immunoreactive material in the central nervous system of the snail, *Helix pomatia*. Brain Res 597:339-342
- Kiehl E (2001) Dissertation. Lösliche Calcium-bindende Proteine (SCBP) bei Evertrebraten: Sequenzierung und Expression von SCBP Isoformen der Muskulatur des Anneliden *Lumbricus terrestris* und Vorkommen ähnlicher Proteine bei Dipteren und Nematoden. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Kiehl E, D'Haese J (1992) A soluble calcium-binding protein (SCBP) present in *Drosophila melanogaster* and *Calliphora erythrocephala* muscle cells. Comp Biochem Physiol B 102:475-482
- Kobayashi A, Tanaka H, Hamada Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K (2006) Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. Allergy 61:357-363
- Kretsinger RH, Nockolds CE (1973) Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. J Biol Chem 248:3313-3326
- Kuberappa PH, Bagalad BS, Ananthaneni A, Kiresur MA, Srinivas GV (2016) Certainty of S100 from Physiology to Pathology. J Clin Diagn Res 10:1
- Means A, Putkey J, Epstein P (1988) Organization and evolution of genes for calmodulin and other calcium binding proteins. In: Cohen P, Klee C (eds) Calmodulin. Molecular Aspects Of Cellular Regulation. Elsevier, Amsterdam, pp 17-33
- Müntener M, Käser L, Weber J, Berchtold MW (1995) Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92:6504-6508
- Omar SI, Albensi BC, Gough KM (2016) Protein Structural Analysis of Calbindin D28k Function and Dysregulation: Potential Competition Between Ca^{2+} and Zn^{2+} . Curr Alzheimer Res 13:777-786
- Pauls T, Cox J, Heizmann C, Hermann A (1993) Sarcoplasmic calcium-binding proteins in *Aplysia* nerve and muscle cells. Eur J Neurosci 5:549-559
- Pechere JF, Derancourt J, Haiech J (1977) The participation of parvalbumins in the activation-relaxation cycle of vertebrate fast skeletal-muscle. FEBS Lett 75:111-114
- Piront A, Lebacq J, Gillis JM (1980) Physiological properties of calcium binding proteins from crayfish muscle. J Muscle Res Cell Motil 1:468-469.
- Rabah G, Popescu R, Cox JA, Engelborghs Y, Craescu CT (2005) Solution structure and internal dynamics of NSCP, a compact calcium-binding protein. Febs J 272:2022-2036
- Raymackers JM, Gailly P, Schoor MC, Pette D, Schwaller B, Hunziker W, Celio MR, Gillis JM (2000) Tetanus relaxation of fast skeletal muscles of the mouse made parvalbumin deficient by gene inactivation. J Physiol 2:355-364
- Rome LC (2006) Design and function of superfast muscles: new insights into the physiology of skeletal muscle. Annu Rev Physiol 68:193-221
- Rusnak F, Mertz P (2000) Calcineurin: form and function. Physiol Rev 80:1483-1521

- Schneggenburger R, Han Y, Kochubey O (2012) Ca^{2+} channels and transmitter release at the active zone. *Cell Calcium* 52:199-207
- Schwaller B (2010) Cytosolic Ca^{2+} buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:13
- Schwaller B, Dick J, Dhoot G, Carroll S, Vrbova G, Nicotera P, Pette D, Wyss A, Bluethmann H, Hunziker W, Celio MR (1999) Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *Am J Physiol* 276:C395-403
- Takagi T, Cox JA (1990) Amino acid sequences of four isoforms of *Amphioxus* sarcoplasmic calcium-binding proteins. *Eur J Biochem* 192:387-399
- Takagi T, Kazuhiko K, Cox JA (1986) Amino acid sequence of two sarcoplasmic calcium-binding proteins from the protochordate *Amphioxus*. *Biochemistry* 25:3585–3592
- Takagi T, Konishi K (1984a) Amino acid sequence of alpha chain of sarcoplasmic calcium binding protein obtained from shrimp tail muscle. *J Biochem* 95:1603-1615
- Takagi T, Konishi K (1984b) Amino acid sequence of the beta chain of sarcoplasmic calcium binding protein (SCP) obtained from shrimp tail muscle. *J Biochem* 96:59-67
- Tashiro N, Yamamoto T (1971) The phasic and tonic contraction in the longitudinal muscle of the earthworm. *J Exp Biol* 55:111-122
- Telkes I, Csoknya M, Buzas P, Gabriel R, Hamori J, Elekes K (1996) GABA-immunoreactive neurons in the central and peripheral nervous system of the earthworm, *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Annelida). *Cell Tiss Res* 285:463-475
- Ushio H, Watabe S (1994) Carp parvalbumin binds to and directly interacts with the sarcoplasmic reticulum for Ca^{2+} translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 199:56-62
- Vijay-Kumar S, Cook WJ (1992) Structure of a sarcoplasmic calcium-binding protein from *Nereis diversicolor* refined at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 224:413-426
- White AJ, Northcutt MJ, Rohrback SE, Carpenter RO, Niehaus-Sauter MM, Gao Y, Wheatly MG, Gillen CM (2011) Characterization of sarcoplasmic calcium binding protein (SCP) variants from freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 160:8-14
- Wittenberg JB (1970) Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. *Physiol Rev* 50:559-636
- Zot HG, Potter JD (1984) The role of calcium in the regulation of the skeletal muscle contraction-relaxation cycle. In: Sigel H (eds) *Metal Ions in Biological Systems* vol 17. Dekker, New York, pp 381-410

Publikation 4

“Soluble calcium-binding proteins (SCBPs) of the earthworm *Lumbricus terrestris*: molecular characterization and localization by FISH in muscle and neuronal tissue”

Thiruketheeswaran P, Kiehl E, D'Haese J (2016) Histochemistry and Cell Biology 146:635-644.

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00418-016-1463-2>

Publikation 5

“Soluble calcium-binding proteins (SCBPs) of the earthworm *Lumbricus terrestris*: possible role as relaxation factors in muscle”

Thiruketheeswaran P, Ralf Huch, D'Haese J (2018) Journal of Comparative Physiology Part B. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1177-y>.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00360-018-1177-y>

Teil III

III. Der Actin-Modulator vom Regenwurm *Lumbricus terrestris*: Earthworm Actin Modulator

III.1 Earthworm Actin Modulator (EWAM) Isoformen

Aus dem Extrakt des Hautmuskelschlauches (in niedriger Ionenstärke und bei Abwesenheit von Ca^{2+}) lassen sich über die Anionen-Austauscherchromatographie drei Proteinfractionen auftrennen, die eine viskositätserniedrigende Gelsolin-Aktivität zeigen. Diese drei Aktivitätspeaks wurden entsprechend ihrem zeitlich versetzten Elutionsprofils (bei 30, 80 und 110 mM KCL) als EWAM-P1,-P2 bzw. -P3 gekennzeichnet (D'Haese und Hinssen 1987). Krüger (2001) konnte aus dem Muskelextrakt des Kaumagens zwei Gelsolin Fraktionen (bei 90 und 200 mM KCL) chromatographisch auftrennen und bei Verwendung derselben Chromatographiesäule unter identischen Elutionsbedingungen zeigen, dass der erste Aktivitätspeak aus dem Kaumagen dem dritten Aktivitätspeak aus dem Hautmuskelschlauch und damit P3 entspricht. Der zweite Aktivitätspeak aus dem Kaumagen, welcher im Vergleich zu P1-P3 erst bei hoher Salzkonzentration von 200 mM KCL eluierte, wurde als die vierte EWAM Isoform P4 bezeichnet. In der SDS-PAGE zeigte P1 eine apparente Masse von 43 kDa und P2-P4 eine etwas höhere Masse von 45 kDa.

III.2 Sequenzierung und Analyse der cDNAs von P3 und P4

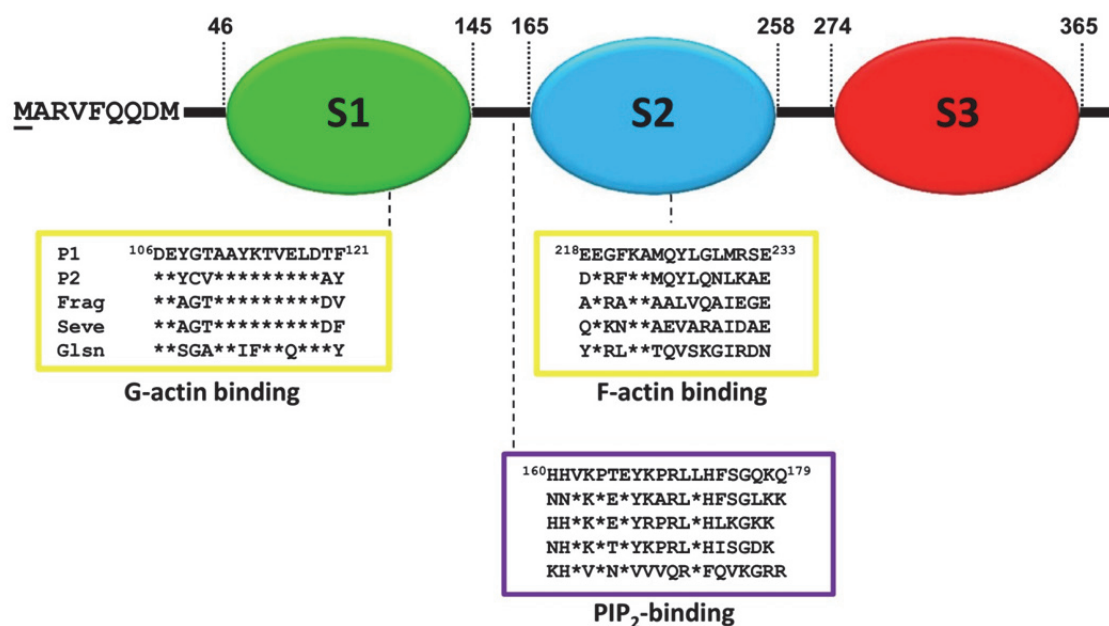
Durch RACE-PCRs (**R**apid **A**mplification of **c**DNA-**E**nds) konnten bei den eigenen durchgeführten Sequenzierungen die vollständigen cDNA Sequenzen von P3 und P4 ermittelt werden. Hierbei wurden im Vergleich mit der bekannten P1- und P2-Sequenz verschiedene konservierte Peptidmotive aus der Gelsolin Proteinfamilie als Grundlage für die Auswahl geeigneter RACE-Primer verwendet. Der offene Leserahmen (OLR) der P3 cDNA ist 1101 Bp (367 Aminosäuren, As) lang. Die flankierenden 5' und 3' untranslatierten Bereiche (UTR) von P2 (345 und 545 Bp) sind in den entsprechenden Nukleotidpositionen identisch mit der UTR von P3. P3 weist im Vergleich mit allen EWAM Isoformen die kürzeste 5' UTR von 141 Bp und die längste 3' UTR mit einer Länge von 1034 Bp auf. Der OLR von P4 unterscheidet sich von P2 und P3 nur durch ein zusätzliches Kodon (AAG) am carboxy-terminalen Ende. EWAM weist zwei unterschiedliche putative Polyadenylierungssignale (PAS) auf, nämlich ATAAAA in P2/P3 und AATAT in P1/P4. Wie für den eukaryotischen *initiation factor 2α* gezeigt, werden an den Polyribosomen mRNAs mit verschiedenen PAS unterschiedlich bevorzugt translatiert (Edwards-Gilbert et al. 1997). Variationen des PAS stellen daher einen möglichen Kontrollpunkt dar, um die Genexpression zu regulieren. Die verschiedenen PAS in EWAM sind daher möglicherweise ein Hinweis auf eine unterschiedlich regulierte Translation der EWAM

Isoformen. Für Quantifizierungsversuche konnten in dem Zeitrahmen dieser Arbeit trotz mehrfacher Versuche nicht die optimalen Bedingungen für eine quantitative Echtzeit-PCR etabliert werden, um sowohl eine Kontrolle als auch eine spezifische Amplifikation der einzelnen EWAM Isoformen zu gewährleisten. Proteinisolationen zeigen jedoch, dass der Gehalt an EWAM im schnell kontrahierenden Hautmuskelschlauch in einem vergleichbaren Bereich liegt wie in den langsamen Muskelzellen des Kaumagens (Krüger 2001). Demnach hängt der Gehalt des Modulators nicht von der Kontraktionsgeschwindigkeit der Muskelzellen ab. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der Lokalisation zweier Gelsolin Isoformen (HG1/2) in verschiedenen Muskelfasertypen im Hummer *Hommarus americanus* erzielt. Hierbei zeigte sich wie beim EWAM eine mengenmäßig gleiche aber distinkte Expression beider Isoformen in schnellen und langsamen Muskelzellen. HG1 wurde vorwiegend im schnellen abdominal- und HG2 im tonischen Scherenschließmuskel nachgewiesen (Unger und Hinssen 2010).

Sequenzvergleiche aller vier EWAM Isoformen zeigen Homologien der einzelnen Segmente (S), die insgesamt von S1-S3 abnehmen (62-100, 69-100 und 53-92 % Sequenzidentität; Abb.III-3A). S2 ist am stärksten konserviert, wobei dieses Segment in P2-P4 identisch ist. Im Vergleich mit dem drei-segmentigen Fragmin vom Schleimpilz *Physarum polycephalum* (UniProt-Zugangsnummer: [Q9XZD2](#); Ampe und Vandekerckhove 1987), Severin vom Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ([P10733](#); Eichinger und Schleicher 1992), EgAFP vom Hundebandwurm *Echinococcus granulosus* ([Q24800](#); Cortez-Herrera et al. 2001) sowie mit den ersten drei Gelsolinsegmenten von *D. melanogaster* ([Q07171](#); Stella et al. 1994) und von *Homo sapiens* ([P06396](#); Kwiatkowski et al. 1986) zeigt sich eine Sequenzidentität von 31-46 % wobei S1 die höchste Konservierung aufweist (Abb.III-3). Im Gelsolin der Vertebraten bindet S1 ein Actinmonomer (G-Actin) und ist im S1-S3 Komplex essentiell für die Fragmentation von Actinfilamenten (F-Actin) (McGough et al. 2003). Innerhalb des sechzehn Aminosäuren langen G-Actin Bindungsmotivs in S1 zeigen sich zwischen dem humanem Gelsolin und EWAM P1-P4 neun konservierte Aminosäuren. Im EWAM hat S1 eine G-Actin und S2 eine G- sowie F-Actin Bindungsregion. S1 und S2 sind sowohl bei der Nukleation als auch bei der Fragmentation involviert (Giebing et al. 1997). Die Bedeutung für die Actinbindung und –fragmentation erklärt daher auch die evolutive Konservierung von S1 bei Gelsolin. Im Gegensatz hierzu weisen die PIP₂ und F-Actin Bindungsregionen eine höhere Variabilität auf (Abb.III-1A, **Publikation 6, Abb. 2**).

Dem drei-segmentigen EWAM fehlt eine carboxy-terminale *tail-latch* Helix (Abb.III-2). Diese Helix blockiert bei Abwesenheit von Ca²⁺ die Actinbindung in S2 und wird erst bei einem Ca²⁺-Anstieg im mikromolaren Bereich (10⁻⁶ M) freigegeben (Ashish et al. 2007; Lück et al. 2000; Lin et al. 2000). Das Fehlen dieser *tail-latch* zeigt sich beim EWAM durch eine schnellere Aktivierung schon bei submikromolaren Ca²⁺-Konzentrationen (Hinssen et al. 1986; D’Haese, persönliche Mitteilung).

A



B

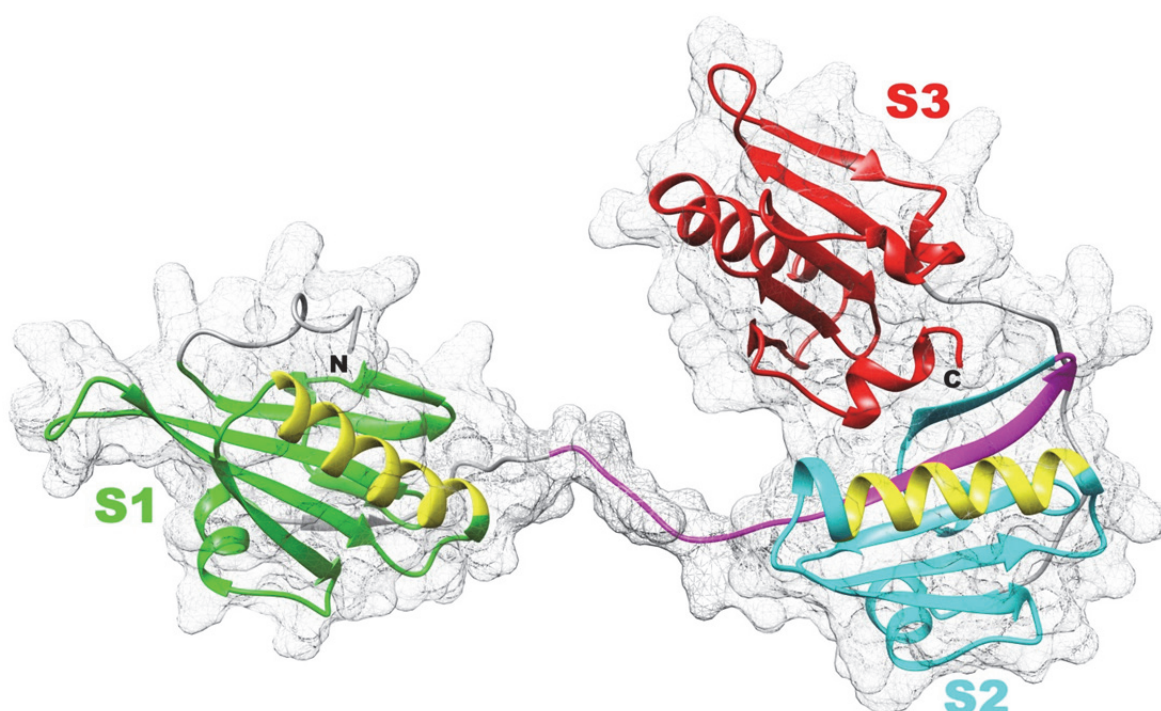


Abb.III-1 Segmentale (S1-S3) und putative 3D-Struktur des Ca²⁺-aktivierten EWAMs.

(A) Konservierte G-, F-Actin und PIP₂- Bindestellen von EWAM-P1 bzw. -P2 sind im Vergleich zu Fragmin von *Physarum polycephalum* (Uniprot-Zugangsnummer: [Q9XZD2](#)), Severin von *Dictyostelium discoideum* ([P10733](#)) und humanem Gelsolin ([P06396](#)) dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind mit einem * gezeigt. Bei

der genomischen Analyse der EWAM Isoformen wurde eine zweite EWAM-P2 Sequenz gefunden, welche im Vergleich zu der durch RACE ermittelten P2 cDNA amino-terminal um acht Aminosäuren (MARVFQQD) elongiert ist und ein zweites Methionin (M) im richtigen Leseraster aufweist. **(B)** Jedes Segment besteht aus einer Gelsolin-homologen Domäne (GH-Domäne) aus 100-130 Aminosäuren, die ein fünf-strängiges β -Faltblatt mit zwei flankierenden α -Helices ausbildet. Aus Sequenzvergleichen wurde postuliert, dass der drei bzw. sechs-segmentige Modulator durch eine Triplikation einer einzelnen GH-Domäne und einer anschließenden Duplikation evolviert ist (Way et al. 1989; Kwiatkowski et al. 1986). 3D-Modell wurde mit *Phyre*² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) mit der *Protein Data Bank*-Vorlage *clrgiG* berechnet. Amino (N)- und carboxyl (C)-Enden sind markiert.

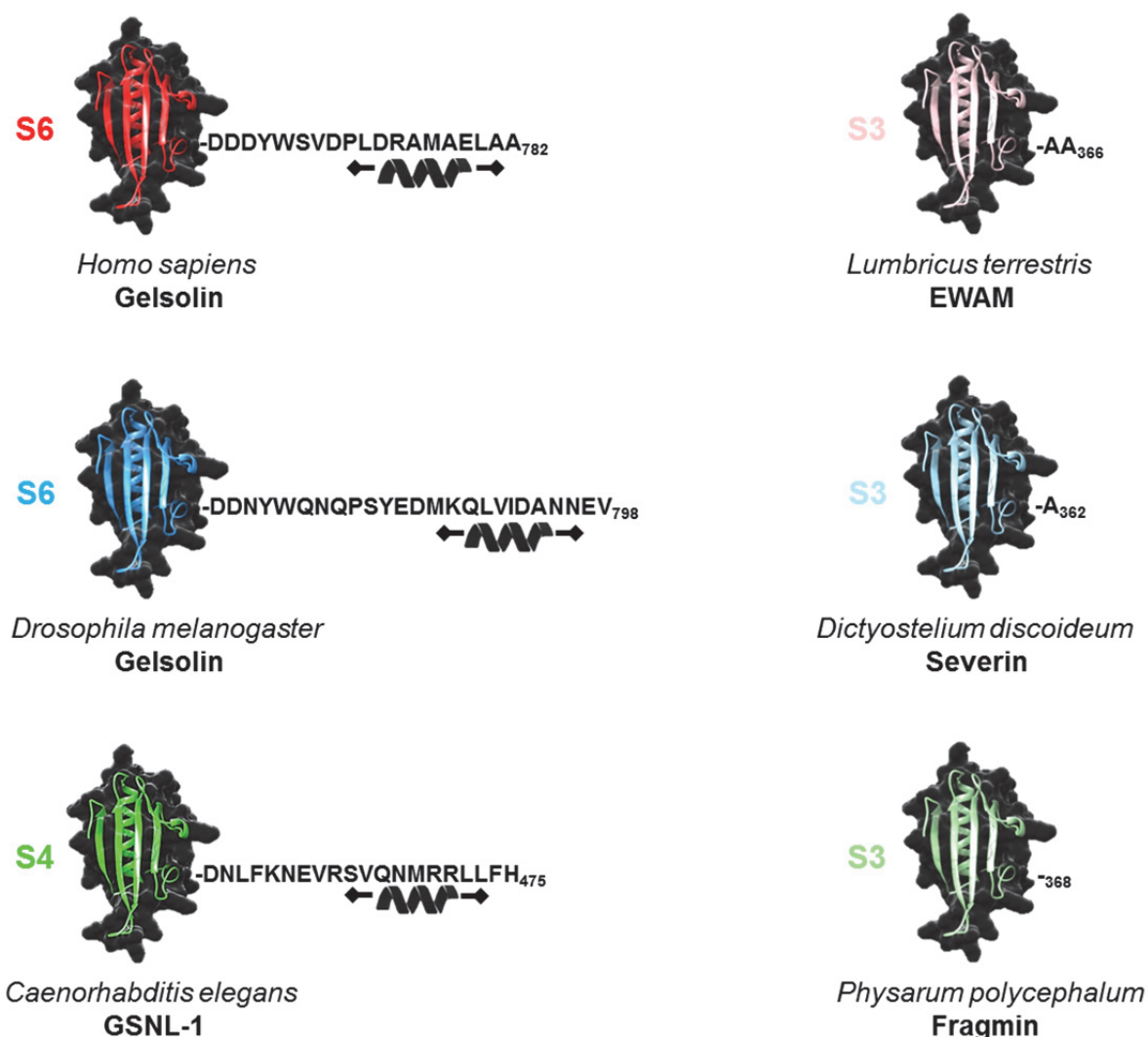


Abb.III-2 Vergleich der carboxy-terminalen Enden von Gelsolin und drei-segmentigen Actin-Modulatoren. Die sechs-segmentigen (S1-S6) Gelsoline vom Menschen und *Drosophila melanogaster* (Uniprot-Zugangsnummer: [Q07171](#)) sowie das vier-segmentige (S1-S4) GSNL-1 von *Caenorhabditis elegans* ([Q21253](#)) weisen carboxy-terminal am letzten Segment eine *tail-latch* Helix von neun oder zehn Aminosäuren auf (gekennzeichnet durch ein schwarzes spiralförmiges Band). Diese *tail-latch* blockiert bei Abwesenheit von Ca^{2+}

die Actinbindung in S2 und wird erst bei einem Ca^{2+} -Anstieg im mikromolaren Bereich (10^{-6} M) freigegeben (Ashish et al. 2007; Lück et al. 2000; Lin et al. 2000). Den drei-segmentigen Actin-Modulatoren EWAM, Severin von *Dictyostelium discoideum* und Fragmin von *Physarum polycephalum* fehlen carboxy-terminal eine *tail-latch* Helix, was eine schnellere Aktivierung schon bei submikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen ermöglicht. Sekundärstrukturen, für das humane Gelsolin siehe Burtnick et al. 1997, wurden durch *Jpred4* (Drozdetskiy et al. 2015) ermittelt. *Uniprot*-Zugangsnummern für das humane Gelsolin, Severin und Fragmin siehe Abb.III-1.

III.3 Genomische Organisation

Die vier EWAM Isoformen werden von vier unterschiedlichen Genen kodiert (**Publikation 6, Abb. 3A**). Während P1 und P2 ein Intron aufweisen, wurden bei P3 und P4 keine Intronsequenzen gefunden. Vier distinkt exprimierte EWAM Gene sind außergewöhnlich innerhalb der Actin-Modulator Genfamilie der bisher untersuchten Organismen. Die cytoplasmatischen und sekretorischen Gelsolin Isoformen beim Menschen als auch bei *Drosophila melanogaster* werden durch alternatives Spleißen von einem einzelnen Gen prozessiert (Stella et al. 1994; Kwiatkowski et al. 1986). Beim Zebrafisch *Danio rerio* wurden zwei Gelsolin Gene nachgewiesen, wobei ein Gen als Überbleibsel einer Genomverdopplung in einem Vorfahren der Knochenfische angesehen wird (Jia et al. 2007). Bis dato wurden die Genome von zwei Anneliden, des marinen Polychaeten *Capitella teleta* (Borstenvurm) und des Egels *Helobdella robusta* (kalifornischer Platt-Egel) vollständig sequenziert. *C. teleta* weist zwei und *H. robusta* ebenfalls wie *L. terrestris* vier Gene auf (*EnsemblMetazoa* Datenbanknummern: [CapteG177948](#), [CapteG154247](#); [HelroG177421](#), [HelroG185261](#), [HelroG85143](#), [HelroG186285](#)). Die ermittelten Sequenzdaten von EWAM liefern Hinweise, die auf mögliche Duplikationsereignisse des EWAM Gens hindeuten. Die vier EWAM Isoformen lassen sich in zwei Typen trennen, nämlich in den P1 (P4)- und P2 (P3)-Typus mit jeweils gleichem offenen Leserahmen (OLR), Polyadenylierungssignal, N- sowie C-terminus. Hierbei sind die 5' und 3'-untranslatierten Bereiche (UTRs) von P2 in den entsprechenden Nukleotidpositionen identisch mit der UTR von P3. Trotz der übereinstimmenden UTR-Abschnitte lassen sich jedoch unterschiedliche Gene für P2 bzw. P3 nachweisen. Durch Punktmutationen unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen der OLRs von P2 und P3 in insgesamt zehn Positionen, von denen vier konserviert und ein Austausch semi-konserviert ist. Weiterhin lassen sich durch eine phylogenetische Rekonstruktion mit EWAM und 3-segmentigen EWAM-homologen Proteinen im Entwicklungsast von EWAM drei putative Duplikationsereignisse identifizieren. Hierbei zeigt sich eine Dichotomie von P1 zu P2-P4 und eine Gruppierung von P2 mit P3 mit 100 % *bootstrap*-Unterstützung (**Publikation 6, supplementary Abb. S2**). Die Sequenzdaten und die phylogenetische Analyse von EWAM lassen daher den Schluss zu, dass zumindest die Gene für P2 bzw. P3 durch Duplikationen entstandene (paraloge) Genkopien sind. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit bisherigen phylogenomischen Analysen bei Anneliden, die eine Genomvergrößerung durch Genduplikationen demonstrieren (Zwarycz et al. 2015; Cho et al. 2012). Bei der genomischen Untersuchung der EWAM Isoformen wurde eine zweite P2-Sequenz

gefunden, welche im Vergleich zu der durch RACE ermittelten P2 cDNA amino-terminal um acht Aminosäuren (MARVFQQD) elongiert ist. Diese Verlängerung beinhaltet ein zweites Startkodon, welches im gleichen Leseraster liegt und damit theoretisch als eine weitere P2 Isoform translatiert werden könnte (Abb.III-1A, **Publikation 6, Abb. 2A**). Datenbankabgleiche zeigen für das MARVFQQD-Motiv keine eindeutige Zuordnung zu Signalpeptiden für eine mögliche sekretorische Variante des EWAMs. Der Nachweis einer sekretierten Exportform im Blut vom polychaeten Anneliden *Arenicola marina* (unveröffentlichte Ergebnisse) lassen jedoch vermuten, dass auch in *L. terrestris* eine sekretorische Exportform existieren könnte.

III.4 Northern Blot Analyse

Northern Blots mit drei Sonden (kodierende Sequenz von P1 sowie amino- und carboxy-terminale Hälfte der kodierenden Sequenz von P3), gegen die mRNA aus dem Hautmuskelschlauch und Kaumagen, zeigen drei Transkripte im Hautmuskelschlauch und zwei im Kaumagen (**Publikation 6, Abb. 3B**). Aufgrund der relativ geringen Sequenzübereinstimmung der verwendeten P1-Sonde mit P2-P4, wurde eine Kreuzreaktion dieser spezifischen P1-Sonde mit P2-P4 ausgeschlossen. Die kodierenden Sequenzen von P2-P4 hingegen zeigen untereinander eine hohe Sequenzidentität der Nukleotid- (Nt) und Proteinsequenz (As) (P2/P3: 95 % Nt/As, P2/P4: 85 % Nt/As und P3/P4: 88 % Nt und 87 % As), wodurch mittels einer unspezifischen P3-Sonde die Transkripte von P2-P4 detektiert werden konnten. Die spezifische P1-Sonde zeigt nur gegen die Hautmuskelschlauch mRNA ein Signal bei 3100 Nt. Die detektierten Banden mit den beiden P3-Sonden konnten aufgrund der bekannten gewebespezifischen Proteinnachweise, P1-P3 im Hautmuskelschlauch und P3 sowie P4 im Kaumagen, eindeutig zugeordnet werden. Die Bande mit der Größe von 2300 Nt, die sowohl in der Hautmuskelschlauch als auch in der Kaumagen mRNA detektiert wurde, konnte als das P3 mRNA Transkript identifiziert werden. Damit war die verbleibende zweite Bande in der Kaumagen mRNA mit 1700 Nt P4 und die Bande mit 2100 Nt in der Hautmuskelschlauch mRNA das P2 Transkript. Die ermittelten Transkriptgrößen für P1-P4 zeigen im Vergleich mit den sequenzierten cDNAs Abweichungen von 100-200 zusätzlichen Nts, was auf die unbekannten Poly(A⁺)-Längen zurückzuführen sein kann. Die Northern Blot Analyse validiert, dass alle vier EWAM Gene im adulten Tier transkribiert werden. Damit wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein gewebespezifisches Expressionsmuster der EWAM Isoformen bestätigt, nämlich P1-P3 im Hautmuskelschlauch und P3 und P4 im Kaumagen.

III.5 Lokalisation der EWAM Isoformen durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Lokalisation der EWAM Isoformen durch FISH zeigt eine distinkte Expression im schnell und langsam kontrahierenden Muskelzelltypen. Die Detektion von P1 mittels einer spezifischen P1-Sonde zeigt im Hautmuskelschlauch eine charakteristische Färbung der proximalen Bereiche der Ring- und Längsmuskulatur (**Publikation 6, Abb. 4A**). Dieses Verteilungsmuster korreliert mit der Verteilung der regulatorischen Myosin-leichte-Kette (rMLC) mit einer Masse von 25 kDa. Diese Muskelzellen besitzen eine hohe Myosin ATPase-Aktivität und eine niedrige Succinatdehydrogenase-Aktivität (D'Haese und Carlhoff 1987; Carlhoff und D'Haese 1987). Diese charakteristische Enzymausstattung ist ein typisches Merkmal schnell kontrahierender Muskelzellen, welche anaerob arbeiten und ihren Energiebedarf überwiegend durch Glykogenabbau decken (Mabuchi und Sreter 1980; Burke et al. 1971; Brooke und Kaiser 1970). Diese schnell kontrahierenden Muskelzellen befähigen den Regenwurm zu schnellen Fluchtreaktionen. Die Verteilung von P1 im Hautmuskelschlauch ist damit in Übereinstimmung mit der Lokalisation und Mengenverteilung von SCBP im Hautmuskelschlauch und bestätigt damit die Korrelation des SCBP-Gehaltes mit der Kontraktionsgeschwindigkeit des Muskels in *L. terrestris* (siehe II.3a). Hybridisierungen mit der P2-Sonde zeigt eine besonders starke Markierung der mRNAs in den distalen Bereichen der Längs- und Ringmuskulatur des Hautmuskelschlauches sowie einer gleichmäßigen Färbung der Muskelschichten des Kaumagens (**Publikation 6, Abb. 4B**). Charakteristisch für diese Zellen ist die 28 kDa Isoform der rMLC. Die typischen Kennzeichen dieser Muskelzellen sind eine hohe Succinatdehydrogenase-Aktivität und eine niedrige Myosin und Actomyosin ATPase-Aktivität (D'Haese und Carlhoff 1987; Carlhoff und D'Haese 1987). Aufgrund dieser typischen Enzymausstattung werden die Muskelzellen des Kaumagens und der distalen Bereiche des Hautmuskelschlauches als langsam kontrahierend eingestuft. Diese Zellen besitzen einen erhöhten Mitochondriengehalt und decken ihren Energiehaushalt überwiegend über den Citratzyklus. Möglicherweise befähigt diese langsame Muskulatur den Regenwurm durch langanhaltende, tonische Aktivität den Coelomdruck aufrecht zu erhalten (D'Haese und Carlhoff 1987). Auf Proteinebene konnten bereits, durch indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen anti-P2-Antikörpern, P2-P4 in den distalen Bereichen des Hautmuskelschlauches, im Kaumagen, in der muskelhaltigen Hülle des Bauchmarks, im Dorsalgefäß, in der Ring- und Längsmuskulatur des Darms und der Dissepimente lokalisiert werden (Krüger 2001; **Publikation 6, Abb. 5**). Eine Gegenfärbung mit affinitätsgereinigten anti-P1-Antikörpern war bisher aufgrund starker Kreuzreaktionen mit anderen Zellproteinen an Gefrierschnitten nicht möglich. Durch FISH konnte nun erstmals auf mRNA-Ebene mit einer spezifischen Sonde P1 in schnell kontrahierenden Muskelzellen lokalisiert werden.

III.6 Physiologische Bedeutung von vier EWAM Isoformen

Die physiologische Bedeutung von vier EWAM Isoformen für zwei Muskelzelltypen, schnell kontrahierender Hautmuskelschlauch und langsam kontrahierender Kaumagen, muss im Hinblick auf die spezifische Funktion von Actin-Modulatoren im Muskel betrachtet werden. Hierbei liegt in der Muskulatur von Vertebraten und Evertrebraten das Gelsolin Ca^{2+} -abhängig entlang der Actinfilamente gebunden vor (Unger und Hinssen 2010; Gonsior und Hinssen 1995). Während in der Myogenese Actin-Modulatoren die Polymerisation der Myofibrillen regulieren, kann hiernach ihre Hauptfunktion im Muskel in der Fragmentation und damit beim Austausch von G-Actin Monomeren liegen. Wie vergleichende proteolytische Spaltungsversuche zeigen, ist das G-Actin von Evertrebraten instabiler als das von Vertebraten (Khaitlina et al. 1999). Die Expression von verschiedenen EWAM Isoformen ist daher möglicherweise eine Adaptation an die Actin-Dynamik instabiler G-Actine. Ausgehend davon, dass zwei distinkte Actin Isoformen in *L. terrestris* exprimiert werden (Lewke und Weber 1996), könnten bestimmte EWAM Isoformen mit unterschiedlicher Ca^{2+} -Abhängigkeit und Bindungsstärke an verschiedene Actin Isoformen binden. Diese Annahme wird durch andere Actin-bindende Proteine unterstützt, für die bereits eine selektive und unterschiedlich starke Bindung an verschiedene Actin Isoformen demonstriert worden ist (De La Cruz 2005; Tzima et al. 2000; Shuster et al. 1996; Yao et al. 1996; Namba et al. 1992; Weber et al. 1992; Larsson und Lindberg 1988). Weiterhin könnte die Aktivität von EWAM durch die Interaktion mit Actin-bindenden Proteinen wie beim Vertebraten Gelsolin moduliert werden. Für das Vertebraten Gelsolin ist eine Interaktion mit Actin-bindenden Proteinen bisher mit Tropomyosin und Calponin beschrieben worden, die einen inhibierenden Effekt auf die Fragmentation bzw. Nukleation haben (Khaitlina et al. 2013; Ferjani et al. 2006). Gleichmaßen wäre ein modulierender Effekt der beiden Tropomyosin Isoformen in *L. terrestris* (Ditgens und D'Haese 1985) auf EWAM denkbar. Durch die Expression von vier EWAM Isoformen ergibt sich damit eine vielfältige Adaptation und Spezifität. Eine weitere mögliche spezifische Funktion einzelner EWAM Isoformen könnte auch mit den Stadien in der Entwicklung korrelieren. Im adulten Tier werden jedoch alle vier EWAM Isoformen exprimiert und sind daher für die Organisation und *turnover* der Actinfilamente von Bedeutung.

Abb.III-3 Sequenzvergleich von EWAM mit Gelsolin und drei-segmentigen Actin-Modulatoren. (A) Sequenzvergleich der Proteinsequenzen der EWAM Isoformen P1-P4 mit dem drei-segmentigen Actin-Modulator Fragmin von *Physarum polycephalum* (Uniprot-Zugangsnummer: Q9XZD2), Severin von *Dictyostelium discoideum* (P10733), ECHGR (Hundebandwurm, *Echinococcus granulosus*, Q24800) und den ersten drei Segmenten vom Gelsolin von *Drosophila melanogaster* (Q07171) und von *Homo sapiens* (P06396). Gelsolinsegmente S1-3, G-, F-Actin und PIP₂ Bindestellen sind farblich analog zur Darstellung in Abb.III-1 markiert. P2 hat mit pH 6,5, ermittelt durch isoelektrische Fokussierung, den höchsten isoelektrischen Punkt (pI). P4 dagegen den niedrigsten errechneten pI von 5,73 und ist damit vergleichbar mit Fragmin (pI 5.7). Der theoretische pI von P3 liegt zwischen P2 und P4 bei 5,93 (D'Haese und Hinssen 1987). **(B)** Unter den EWAM Isoformen liegt die höchste Sequenzidentität zwischen P2 und P3 mit 97 %. Von den drei-segmentigen Modulatoren zeigt Fragmin mit 45 bzw. 46 % die höchste Sequenzidentität mit EWAM (45 bzw. 46 %). Sequenzen wurden mit *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) verglichen. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) und konservierte Substitutionen durch einen Doppelpunkt (:) dargestellt.

A

P1	-----MATGLIKAKEYDWK--DSNL-ALFGSDTEKQVKKD	32
P2	-----MSGLVKAKRYDWK--DSNL-AMFGSALDKSVKKE	31
P3	-----MSGLVKAKRYDWK--DSNL-ALFGSALDKSVKKE	31
P4	-----MATGLIKAKEYDWK--DSNL-ALFGSDTEKQVKKD	32
Fragmin	-----MQKAKVYNIA--DSNI-ANLGTELEKKVKLA	28
Severin	-----MIKNRKLDIT--STNV-AGIGTDLDKKCRLD	28
ECHGR	-----MAGLVKAKDYDWK--DSNM-ELFGSSKDRQVKKE	31
Drome	MDASGAATMAVLSSLLVFLALSSSLCSAGTLNARPAF----PVQSGEIQPSG-QNSKQAA	55
Human	MAPHRP-----APALLCALSLALCALSLP-VRAATASRGASQAGAPQGRV-PEARPNS	51

S1

P1	SAATEPAWKAGQK--EGLKIWRIVNFKVTEWPQNQHKGKFYNGDSYIILNTYKPDPKSNE	90
P2	SALKEAAWKGVGEK--VGLKIWRIVNFKVTEWPEKDYGSFFSGDSYIILNTYKLGK-REE	88
P3	SALKEAAWKGVGEK--VGLKIWRIVNFKVTEWPEKDYGSFFSGDSYIILNTYKLGK-REE	88
P4	SAATEPAWKAGQK--EGLKIWRIVNFKVTSFPEKDYGSFFSGDSYIILNTYKLGK-REE	89
Fragmin	AAETEQAQWKGVGKQ--VGLDIWRINQFKVTQVPKNAYGQFYSGDSYIVLWYTKQ---NDR	83
Severin	AASTEQAQWKGVGQA--PGLKIWRINQFKVTPVPPESSYGKFDGDSYIILHTFKE---GNS	83
ECHGR	SAMTEKCWEPVGRATSPFLMVVRVNFQFTLEPVPSDEIGNFYNGDSYVICKATRSPG-GDK	90
Drome	RRVMHPSFANAGRT--PGLIWRINQFEPVIYPKTNYGKFTYTGDSFIVLNTIENKK-DKK	112
Human	MVVEHPEFLKAGKE--PGLQIWRVEKFDLVPVPTNLYGDDFTGDAYVILKTVQL-R-NGN	107
	: * * :*: :*	

P1	LAYDVHFWIGSQSSQDEYGTAAAYKTVELDTFLDDKPVQHREVQGYESELFRNYFKQGL--	148
P2	LAYDVHFWIGSKSTQDEYCVAAAYKTVELDAYLDDAAIQHRDAEGNESDLFLSYFENGL--	146
P3	LAYDVHFWIGSKSTQDEYCVAAAYKTVELDAYLDDAAIQHRDAEGNESDLFLSYFENGL--	146
P4	LAYDVHFWIGSKSTQDEYATAAYKTVEVDTYLDDKAIQHREAEGYESELFQSYFP-HI--	146
Fragmin	LAWDVHFWLGTYYTQDEAGTAAYKTVELDDVLGGAPVQHREVQGYESQRFSLSYFPNGI--	141
Severin	LKHDIHFFLGTFTTQDEAGTAAYKTVELDDFLGGAPIQYRQCQSYESPSFLSLFPKY---	140
ECHGR	LLYNVHFWIGKHSTADEYGTAAAYKTVELDTFLDDAAVQHREVEGYESQLFKSYFDKLVIL	150
Drome	LSWDVHFWLGLTSTDEAGAAAILTVQLDDLNGGFPVQHREVQDHESQLFLSYFKNGI--	170
Human	LQYDLHYWLGNECSQDESGAAAIFTVQLDDYLNGRAVQHREVQGFESATFLGYFKSGSL--	165
	* :*:*: * : ** ** ***: *	

G-Actin

Downloaded from <http://ajph.org/> on November 10, 2015

*** ** * * *

PIP₂

$$\begin{array}{ccccccc} \bullet & * & & * & * & \cdot & \cdot \\ \vdots & & & & & \vdots & \vdots \end{array}$$

F-Actin

© 2006 The Authors
 Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd

[illegible]

• *

P1	A	367
P2	A	366
P3	A	366
P4	A	367
Fragmin	-	368
Severin	A	362
ECHGR	E	374
Drome	-	395
Human	-	394

B

	P1	P2	P3	P4	Fragmin	Severin	ECHGR	Drome	Human
P1		61	62	66	45	43	42	33	32
P2			97	85	46	42	42	31	31
P3				87	46	42	42	31	31
P4					46	43	42	31	31
Fragmin						53	41	37	37
Severin							38	36	35
ECHGR								30	29
Drome									44

III.7 Literatur

- Ampe C, Vandekerckhove J (1987) The F-actin capping proteins of *Physarum polycephalum*: cap42(a) is very similar, if not identical, to fragmin and is structurally and functionally very homologous to gelsolin; cap42(b) is *Physarum* actin. *Embo J* 6:4149-4157
- Ashish, Paine MS, Perryman PB, Yang L, Yin HL, Krueger JK (2007) Global structure changes associated with Ca^{2+} activation of full-length human plasma gelsolin. *J Biol Chem* 282:25884-25892
- Brooke MH, Kaiser KK (1970) Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23:369-379
- Burke RE, Levine DN, Zajac FE, 3rd (1971) Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* 174:709-712
- Burtinck LD, Koepf EK, Grimes J, Jones EY, Stuart DI, McLaughlin PJ, Robinson RC (1997) The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell* 90:661-670
- Carlhoff D, D'Haese J (1987) Slow type muscle cells in the earthworm gizzard with a distinct, Ca^{2+} -regulated myosin isoform. *J Comp Physiol B* 157:589-597
- Cho SJ, Valles Y, Kim KM, Ji SC, Han SJ, Park SC (2012) Additional duplicated Hox genes in the earthworm: *Perionyx excavatus* Hox genes consist of eleven paralog groups. *Gene* 493:260-266
- Cortez-Herrera E, Yamamoto RR, Rodrigues JJ, Farias SE, Ferreira HB, Zaha A (2001) *Echinococcus granulosus*: Cloning and Functional in Vitro Characterization of an Actin Filament Fragmenting Protein. *Exp Parasitol* 97:215-225
- D'Haese J, Carlhoff D (1987) Localization and histochemical characterization of myosin isoforms in earthworm body wall muscle. *J Comp Physiol B* 157:171-179
- D'Haese J, Hinssen H (1987) Isolation and characterization of a Ca^{2+} -activated actin-modulating protein from obliquely striated muscle. *Journal of Comparative Physiology B* 157:615-623
- Ditgens A, D'Haese J (1985) Heterogeneity of tropomyosins in earthworm body wall muscle. In: Alia L, Arena L, Russo MA (eds) *Contractile Proteins in Muscle and Non-muscle Cell Systems*. Praeger Publishers, New York, pp 137-147
- De La Cruz EM (2005) Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J Mol Biol* 346:557-564
- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ (2015) JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*
- Edwards-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C (1997) Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* 25:2547-2561

- Eichinger L, Schleicher M (1992) Characterization of actin- and lipid-binding domains in severin, a Ca^{2+} -dependent F-actin fragmenting protein. *Biochemistry* 31:4779-4787
- Ferjani I, Fattoum A, Maciver SK, Benistant C, Chahinian A, Manai M, Benyamin Y, Roustan C (2006) A direct interaction with calponin inhibits the actin-nucleating activity of gelsolin. *Biochem J* 396:461-468
- Fletcher DA, Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463:485-492
- 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* 225:773-779
- Giebing T, Obermann WM, Fürst D, D'Haese J (1997) C-terminally deleted fragments of 40-kDa earthworm actin modulator still show gelsolin activities. *FEBS Lett* 417:191-195
- Gonsior S, Hinssen H (1995) Exogenous gelsolin binds to sarcomeric thin filaments without severing. *Cell Motil Cytoskeleton* 31:196-206
- Hinssen H (1981) An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. II. Ca^{2+} -dependence and other properties. *Eur J Cell Biol* 23:234-240
- Hinssen H, Engels FE, D'Haese J (1986) Kinetics of Modulator-Actin Interactions: A Comparison of *Physarum* Fragmin with Actin Modulators from Different Muscle Types. In: Dove WF, Dee J, Hatano S, Haugli FB, Wohlfarth-Bottermann K-E (eds) *The Molecular Biology of Physarum polycephalum*. Springer New York, Boston, MA, pp 199-206
- Huber F, Boire A, Lopez MP, Koenderink GH (2015) Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up. *Curr Opin Cell Biol* 32:39-47
- Jia S, Omelchenko M, Garland D, Vasiliou V, Kanungo J, Spencer M, Wolf Y, Koonin E, Piatigorsky J (2007) Duplicated gelsolin family genes in zebrafish: a novel scinderin-like gene (scinla) encodes the major corneal crystallin. *Faseb J* 21:3318-3328
- Khaitlina S, Antropova O, Kuznetsova I, Turoverov K, Collins JH (1999) Correlation between polymerizability and conformation in scallop beta-like actin and rabbit skeletal muscle alpha-actin. *Arch Biochem Biophys* 368:105-111
- Khaitlina S, Fitz H, Hinssen H (2013) The interaction of gelsolin with tropomyosin modulates actin dynamics. *Febs J* 280:4600-4611
- Klaavuniemi T, Yamashiro S, Ono S (2008) *Caenorhabditis elegans* gelsolin-like protein 1 is a novel actin filament-severing protein with four gelsolin-like repeats. *J Biol Chem* 283:26071-26080
- Krüger E (2001) Dissertation. Untersuchungen zur Diversität und Lokalisation Gelsolin-verwandter Proteine des Regenwurms *Lumbricus terrestris*. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Kwiatkowski DJ, Stossel TP, Orkin SH, Mole JE, Colten HR, Yin HL (1986) Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature* 323:455-458
- Larsson H, Lindberg U (1988) The effect of divalent cations on the interaction between calf spleen profilin and different actins. *Biochim Biophys Acta* 953:95-105

- Lewke N, Weber K (1996) Nucleotide sequence of two actin genes of *Lumbricus terrestris*. *Gene* 178:199-200
- Lin K-M, Mejillano M, Yin HL (2000) Ca^{2+} Regulation of Gelsolin by Its C-terminal Tail. *Journal of Biological Chemistry* 275:27746-27752
- Lück A, Yin HL, Kwiatkowski DJ, Allen PG (2000) Calcium regulation of gelsolin and adseverin: a natural test of the helix latch hypothesis. *Biochemistry* 39:5274-5279
- Mabuchi K, Sreter FA (1980) Actomyosin ATPase. II. Fiber typing by histochemical ATPase reaction. *Muscle Nerve* 3:233-239
- McGough AM, Staiger CJ, Min JK, Simonetti KD (2003) The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett* 552:75-81
- Nag S, Larsson M, Robinson RC, Burtnick LD (2013) Gelsolin: the tail of a molecular gymnast. *Cytoskeleton* 70:360-384
- Namba Y, Ito M, Zu Y, Shigesada K, Maruyama K (1992) Human T cell L-plastin bundles actin filaments in a calcium-dependent manner. *J Biochem* 112:503-507
- Ono S (2010) Dynamic regulation of sarcomeric actin filaments in striated muscle. *Cytoskeleton* 67:677-692
- Pollard TD (2016) Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 17: a018226
- Retelska D, Iseli C, Bucher P, Jongeneel CV, Naef F (2006) Similarities and differences of polyadenylation signals in human and fly. *BMC Genomics* 7:176
- Shuster CB, Lin AY, Nayak R, Herman IM (1996) Beta cap73: a novel beta actin-specific binding protein. *Cell Motil Cytoskeleton* 35:175-187
- Stella MC, Schauerte H, Straub KL, Leptin M (1994) Identification of secreted and cytosolic gelsolin in *Drosophila*. *J Cell Biol* 125:607-616
- Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH (2000) Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem* 267:4720-4730
- Unger A, Hinssen H (2010) Electron-microscopical localization of gelsolin in various crustacean muscles. *Cell Tissue Res* 341:313-323
- Way M, Gooch J, Pope B, Weeds AG (1989) Expression of human plasma gelsolin in *Escherichia coli* and dissection of actin binding sites by segmental deletion mutagenesis. *J Cell Biol* 109:593-605
- Weber A, Nachmias VT, Pennise CR, Pring M, Safer D (1992) Interaction of thymosin beta 4 with muscle and platelet actin: implications for actin sequestration in resting platelets. *Biochemistry* 31:6179-6185
- Xiang Y, Huang X, Wang T, Zhang Y, Liu Q, Hussey PJ, Ren H (2007) Actin Binding Protein 29 from *Lilium pollen* plays an important role in dynamic actin remodeling. *Plant Cell* 19:1930-1946

- Yao X, Cheng L, Forte JG (1996) Biochemical Characterization of Ezrin-Actin Interaction. *Journal of Biological Chemistry* 271:7224-7229
- Zwarycz AS, Nossa CW, Putnam NH, Ryan JF (2015) Timing and Scope of Genomic Expansion within Annelida: Evidence from Homeoboxes in the Genome of the Earthworm *Eisenia fetida*. *Genome Biol Evol* 8:271-281

Publikation 6

“Four paralog gelsolin genes are differentially expressed in the earthworm
Lumbricus terrestris”

Thiruketheeswaran P, Thomalla P, Krüger E, Hinssen H, D'Haese J (2017) Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Physiology 209:58-67.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096495917300519?via=ihub>

Zusammenfassung

Das Calciumion (Ca^{2+}) ist ein intrazelluläres Signalmolekül, das als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) eine Vielzahl zellulärer Prozesse steuert. Hierzu wird in jeder Zelle ein spezifischer Satz von Ca^{2+} -bindenden Proteinen für die Signaltransduktion exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurden Ca^{2+} -bindende Proteine und deren Isoformen, die an der Muskelkontraktion, Muskeler schlaffung sowie der Modulation des Actins beteiligt sind, hinsichtlich ihrer Unterschiede in der Regulation, Struktur und zellulären Lokalisation charakterisiert.

In Fortsetzung früherer Arbeiten am Actin des Bärtierchens *Hypsibius klebelsbergi* (Ecdysozoa= Häutungstiere, Tardigrada) wurde die Muskelregulation von *H. klebelsbergi* und des Stummelfüßers *Peripatus novaezealandiae* (Ecdysozoa, Onychophora) untersucht. Ein besonderes Merkmal der Tardigraden ist ihre Fähigkeit zur Kryptobiose, wodurch sie in der Lage sind extreme Umweltbedingungen zu überdauern. Mit Hinblick auf Adaptationen für die Kryptobiose und der umstrittenen Phylogenie der Tardigraden und Onychophoren wurden vier Ca^{2+} -bindende Proteine aus der EF-Hand Proteinfamilie (CTER-Gruppe) sequenziert und analysiert. CTER-Proteine wirken als molekulare Ca^{2+} -Schalter die Actin- oder Myosin-gekoppelt die Muskelkontraktion steuern und das Actomyosin in einen aktiven oder inaktiven Zustand versetzen. Die phylogenetische Stellung von Tardigraden und Onychophoren wurde ebenfalls bei eigenen Untersuchungen am Actin-bindenden Gelsolin von *P. novaezealandiae* und des Tardigraden *Hypsibius dujardini* untersucht.

Während die EF-Hand Proteine der CTER-Gruppe die Muskelkontraktion regulieren, ist bei der Muskeler schlaffung ein weiteres EF-Hand Protein nämlich das Parvalbumin beteiligt. Bei der Suche nach Parvalbumin in der Muskulatur von Evertrebraten fand man anstelle des Parvalbumins ein analoges lösliches Ca^{2+} -bindendes Protein, nämlich das SCBP. Bislang gibt es keine Funktionsstudien zur Rolle von SCBPs als „löslicher relaxierender Faktor“ und Ca^{2+} -Transporter in Evertrebraten. Zur Klärung der Frage, ob SCBPs in ihrer Funktion dem Vertrebraten Parvalbumin gleichen, wurde der Einfluss des SCBPs vom Regenwurm *Lumbricus terrestris* auf die Ca^{2+} -Regulation des Actomyosins und der möglichen Funktion von SCBPs als Ca^{2+} -Transporter getestet.

Ca^{2+} -bindende Proteine regulieren nicht nur die Interaktion der Actin- und Myosinfilamente bei der Muskelkontraktion und -erschlaffung sondern auch den Polymerisationsgrad von Actinfilamenten. Der drei-segmentige Actin-Modulator von *L. terrestris* (EWAM) war der erste Actin-Modulator der aus der Muskulatur eines Evertrebraten isoliert und biochemisch charakterisiert worden ist. Basierend auf den vorausgegangenen Ergebnissen war es das Ziel durch eine vollständige Sequenzierung, genomische- und Transkript-Analyse eine differentielle Expression der EWAM Isoformen P1-P4 zu untersuchen. Weiterhin sollte durch eine histochemische Lokalisation das Expressionsmuster der EWAM Isoformen nachgewiesen werden. Dies sollte die Frage nach der Bedeutung der verschiedenen Actin-Modulator Isoformen des Regenwurms (EWAM) beantworten und darüber Aufschluss geben,

ob die Dynamik der Actinfilamente verschiedener Muskelzelltypen im Regenwurm die Aktivität spezifischer Modulator Isoformen erfordern.

Die Sequenzanalysen der CTER-Proteine von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* zeigen, dass die Voraussetzungen für eine duale Regulation mit einem Actin-gekoppelten Troponin System und einer Myosin-gekoppelten Regulation durch die regulatorische Myosin-leichte-Kette vorhanden sind. Durch Versuche mit rekombinant exprimierten chimären Tardigraden-rMLC Konstrukte kann geschlossen werden, dass bei *H. klebelsbergi* das Actomyosin über die Phosphorylierung der rMLCs reguliert wird. Eigene Kladogramme mit CTER-Proteinen von *H. klebelsbergi* und *P. novaezealandiae* zeigen keine eindeutige Klassifizierung zu Ecdysozoa. Bei den eigenen Sequenzierungen konnte bei *P. novaezealandiae* ein sechs-segmentiges Gelsolin ermittelt werden. Demgegenüber zeigen die Sequenzauswertungen ein drei-segmentiges Gelsolin bei *H. dujardini*. Versuche mit SCBP demonstrieren, dass das Ca^{2+} zunächst vom Actomyosin gebunden und erst hiernach vom SCBP entzogen wird. Das Ca^{2+} -beladene SCBP kann vom sarkoplasmatischen Reticulum (SR) decalcifiziert werden. Der gemessene Ca^{2+} -Flux in einer dreikammerigen Diffusionsapparatur zeigt eine Erhöhung auf 170% durch SCBP. In Gewebeschnitten des Regenwurms konnte SCBP-mRNA in proximalen Muskelzellen der Längs- und Ringmuskulatur des Hautmuskelschlauches lokalisiert werden. Im Kaumagen zeigt sich nur eine schwache SCBP Expression. Für die bereits bekannten vier Actin-Modulator Isoformen von *L. terrestris* (EWAM P1-P4) konnten bei den eigenen Untersuchungen die vollständigen cDNA Sequenzen von P3 und P4 ermittelt sowie vier unterschiedliche Gene und mRNAs identifiziert werden. Lokalisation der EWAM Isoformen in Gewebeschnitten des Hautmuskelschlauches und Kaumagen zeigen eine distinkte Expression.

Aus den Sequenzanalysen der EF-Hand Proteine von *H. klebelsbergi* lassen sich für die Kryptobiose bei Tardigraden keinerlei Adaptationen herleiten. Eine Schwestergruppen-Beziehung zwischen Arthropoda und Onychophora kann aus einem sechs-segmentigen Gelsolin von *P. novaezealandiae* abgeleitet werden, dass sich möglicherweise wie in Arthropoden entwickelt hat. Dagegen unterstützt ein drei-segmentiges Gelsolin von *H. dujardini* die Stellung der Tardigraden als basalste Gruppe der Panarthropoda. Die erzielten Ergebnisse mit Regenwurm-SCBPs unterstützen die Annahme, dass das SCBP von *L. terrestris* wie das Vertebraten Parvalbumin als Ca^{2+} -Transporter zwischen Troponin C und dem SR interagieren kann. Ähnlich dem Parvalbumin konnte SCBP erstmals im Nervengewebe nachgewiesen werden. Die Lokalisation von SCBP im Muskelgewebe ist in Übereinstimmung mit der bereits bekannten quantitativen Analyse des SCBP-Gehaltes, wo im Hautmuskelschlauch drei Zehnerpotenzen mehr SCBP gefunden worden ist als im Kaumagen. Vier EWAM Isoformen ermöglichen durch die Bindung an verschiedene Actin Isoformen sowie die Interaktion mit Actin-bindenden Proteinen eine vielfältige Adaptation und Spezifität. Die Sequenzdaten und die phylogenetische Analyse von EWAM lassen den Schluss zu, dass zumindest die Gene für P2 bzw. P3 durch Duplikationen entstandene Genkopien sind. Eine unterschiedliche Verteilung der vier EWAM Isoformen ist in Übereinstimmung mit dem SCBP-Gehalt in schnellen und langsamen

Muskelzelltypen in der Ring-, Längs- und Kaumagenmuskulatur. Die Bindung an verschiedene Actin Isoformen sowie die Interaktion mit Actin-bindenden Proteinen, könnte die distinkte Expression von EWAM begründen.

Anteilserklärung

I. Untersuchung der Muskelregulation in *Hypsibius klebelsbergi* (Tardigrada) und *Peripatus novaezealandiae* (Onychophora)

Publikation 1:

“EF-hand proteins and the regulation of actin-myosin interaction in the eutardigrade *Hypsibius klebelsbergi* (Tardigrada)”

Thiruketheeswaran P, Greven H, D'Haese J (2012) Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology 317:311-320.

Prof. Greven und Prof. D'Haese haben gemeinsam die Arbeit im Rahmen der Dissertation betreut.

Publikation 2 :

“EF-hand proteins in onychophorans as compared to tardigrades and other ecdysozoans”

Thiruketheeswaran P, Greven H, D'Haese J (2013) Journal of Limnology 72:36-43.

Prof. Greven und Prof. D'Haese haben gemeinsam die Arbeit im Rahmen der Dissertation betreut.

Publikation 3 :

“Gelsolin in Onychophora and Tardigrada with notes on its variability in the Ecdysozoa”

Thiruketheeswaran P, Greven H, D'Haese J (2017) Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Physiology 203:47-52.

Prof. Greven und Prof. D'Haese haben gemeinsam die Arbeit im Rahmen der Dissertation betreut.

Bei den Publikationen 1-3:

Herr Prasath Thiruketheeswaran war für die experimentelle Planung, Durchführung und Auswertung der praktischen Experimente verantwortlich. Er trug entscheidend bei der Manuskripterstellung bei (je 80%).

II. Lösliche Ca²⁺-bindende Proteine (SCBP) vom Regenwurm *Lumbricus terrestris*

Publikation 4:

“Soluble calcium-binding proteins (SCBPs) of the earthworm *Lumbricus terrestris*: molecular characterization and localization by FISH in muscle and neuronal tissue”

Thiruketheeswaran P, Kiehl E, D'Haese J (2016) Histochemistry and Cell Biology 146:635-644.

In Fortführung der Promotionsarbeit von Dr. Ernst Kiehl hat Herr Prasath Thiruketheeswaran die noch offenen Fragen experimentell bearbeitet. Dazu war er für die Planung und Durchführung der Experimente sowie für die Auswertung sämtlicher Analysen verantwortlich. Er trug maßgeblich zur Entstehung der Publikation bei (75%).

Publikation 5:

“Soluble calcium-binding proteins (SCBPs) of the earthworm *Lumbricus terrestris*: possible role as relaxation factors in muscle”

Thiruketheeswaran P, Ralf Huch, D'Haese J (2018) Journal of Comparative Physiology Part B. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1177-y>.

Herr Prasath Thiruketheeswaran war sowohl bei dem experimentellem Ansatz als auch bei der Auswertung und Interpretation beteiligt. Er trug entscheidend bei der Manuskripterstellung bei (50%).

III. Der Actin-Modulator vom Regenwurm *Lumbricus terrestris*: Earthworm Actin Modulator (EWAM)

Publikation 6:

“Four paralog gelsolin genes are differentially expressed in the earthworm *Lumbricus terrestris*”

Thiruketheeswaran P, Thomalla P, Krüger E, Hinssen H, D'Haese J (2017) Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Physiology 209:58-67.

Herr Prasath Thiruketheeswaran führte die experimentelle Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente weitgehend selbstständig durch. Er war maßgeblich bei der Manuskripterstellung beteiligt (75%).

weitere Publikation:

“The actin gene of *Hypsibius klebelsbergi* (Eutardigrada) – complete sequence and comparison with actin from related and non-related taxa”

D’Haese J, Traore-Freitag A, Kiehl E, **Thiruketheeswaran P**, Greven H (2011) Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 49:84-89

Herr Prasath Thiruketheeswaran war für die Sequenzanalysen, Erstellung der putativen Strukturen und Interpretationen beteiligt (25%).

Prasath Thiruketheeswaran

Prof. Dr. Jochen D’Haese

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Prasath Thiruketheeswaran