

Gelsoline
in
Crustaceen

Nachweis, Charakterisierung und immunelektronenmikroskopische
Lokalisation von Gelsolinen in der Muskulatur
des amerikanischen Hummers (*Homarus americanus*)

Dissertation

zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
(Dr.rer.nat)

Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld

vorgelegt von
Dipl.Biol. Andreas Unger
aus Warendorf

im
Oktober 2007

Meiner geliebten Schwester Silvia
und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VI
1 Einleitung	1
1. Architektur und Organisation des kontraktiellen Apparates von Skelettmuskeln	1
1.1 Der Aufbau von Skelettmuskeln	1
1.2 Die calciumabhängige Skelettmuskel Kontraktion	4
1.3 Morphologie und biochemische Profile des Crustaceenmuskels	6
2 Actin und Actin bindende Proteine	9
2.1 Monomeres Actin und Actin-Isoforme	10
2.2 F-Actin	13
2.3 Actin bindende Proteine	17
2.4 Actinmodulatoren (Gelsoline)	18
2.4.1 40 kDa Actin-Modulatoren	19
2.4.2 80 kDa Actin-Modulatoren	20
2.5 Struktur, Funktion und Lokalisation von Gelsolin	21
2.5.1 Struktur und molekulare Interaktion mit Aktin	21
2.5.2 Die vielseitigen Funktionen von Gelsolin	25
2.5.3 Lokalisation von Gelsolin	28
2.5.4 Actinmodulatoren in Crustaceen	30
Zielsetzung der Arbeit	31
2 Material & Methoden	32
2.1 Materialien	32
2.1.1 Bezugsquellen der Materialien	32
2.1.2 Bezugsquellen der Organismen	32
2.1.3 Protein-Molekularmassenstandards	32

2.1.4	Protease-Inhibitoren	32
2.1.5	Säulenmaterial	33
2.2.	Methoden	34
2.2.1	Proteinpräparationen	34
2.2.1.1	Aufreinigung von G-Actin aus Skelettmuskel von Kaninchen	34
2.2.1.2	Pyren-Actin	36
2.2.1.3	Aufreinigung von Actomyosin	36
2.2.1.4	Aufreinigung von Gelsolin	36
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	38
2.2.2.1	Mikro-Biuret Proteinbestimmung	38
2.2.2.2	Bicinchoninsäure (BCA)-Proteinbestimmung	39
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	39
2.2.2.4	Proteinblotting	41
2.2.2.5	Densitometrische Vermessungen	42
2.2.2.6	Viskosimitrie	42
2.2.2.7	Fluorimetrie	44
2.2.2.8	Ermittlung der ATPase-Aktivität von Actomyosin	47
2.2.2.9	Limitierte proteolytische Spaltung	47
2.2.2.10	Chemische Quervernetzung	48
2.2.2.11	Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF MS	49
2.2.3	Immunologische Methoden	50
2.2.3.1	Herstellung polyklonaler Gelsolin Antikörper	50
2.2.3.2	Immunblotanalyse	50
2.2.3.3	Bindungsspezifität und Titer der Seren	51
2.2.3.4	Affinitätsreinigung der polyklonalen Gelsolin Antikörper	51
2.2.4	Lichtmikroskopische Methoden	53
2.2.4.1	Herstellung von Kryoschnitten	53

2.2.4.2 Präparation von Myofibrillen	54
2.2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz Mikroskopie	54
2.2.5 Elektronenmikroskopie	55
2.2.5.1 Herstellung und Bedampfung des Trägermaterials	56
2.2.5.2 Probenpräparation für Elektronenmikroskopie	57
2.2.5.3 Immunmarkierungen von Ultradünnschnitten	58
2.2.5.4 Kontrastierung	59
2.2.5.5 Elektronenmikroskopische Auswertungen	60
3 Ergebnisse	61
3.1 Biochemische Analyse von Gelsolin in verschiedenen Muskelgeweben	61
3.1.1 Identifizierung von Gelsolin in verschiedenen Muskelgeweben	61
3.1.2 Nachweis von postrationalen Modifikationen	62
3.1.3 Densitometrische Analyse von Hummergelsolin	62
3.1.4 Herstellung und Analyse polyklonaler Antikörper gegen HG2	65
3.1.5 Massenspektrometrische Analyse der Gelsolin Isoformen	67
3.2 Präparation von nativem Hummergelsolin	68
3.2.1 Isolierung der Gelsolin Isoformen	68
3.2.2 Limitierte proteolytische Spaltung isolierter Gelsolin Isoformen	72
3.2.3 Isolierung der Fragmente nach limitierte proteolytische Spaltung	75
3.3 Gelsolin Isoformen und Actin	77
3.3.1 Komplexbildung mit monomerem Actin	77
3.3.2 Hummergelsoline modulieren die Aktinpolymerisation	79
3.3.3 Fragmentation von F-Actin durch Hummergelsoline	80
3.3.4 Calciumabhängigkeit der ActomyosinATPasen	89
3.3.5 Cosedimentation der Gelsolin-Isoformen mit F-Actin	92
3.4 Immunlokalisation von Gelsolin in verschiedenen Muskeln	94
3.4.1 Immunhistologische Lokalisation von Gelsolin in Crustaceenmuskeln	94
3.4.2 Zur Ultrastruktur der Abdominalen- und Scherenmuskulatur	97

3.4.3 Immunelektronenmikroskopische Lokalisation von Gelsolin	101
3.4.4 Intrazelluläre Verteilung von Gelsolin unter modifizierten physiologischen Bedingungen	107
3.4.5 Immunlokalisation von Gelsolin in isolierten Myofibrillen	111
3.5 Hummergelsolin in embryonalen ZOEALarven	117
3.5.1 Identifikation von Gelsolin in der Muskulatur postembryonaler ZOEALarven	117
3.5.2 Lokalisation von Gelsolin in der Muskulatur postembryonaler ZOEALarven	119
4... Diskussion	121
4.1 Aufreinigung von Gelsolin aus Muskelzellen von Crustaceen	121
4.2 HG ₁ & HG ₂ sind Isoformen	122
4.3 Crustaceengelsoline sind „klassische“ Gelsoline	126
4.4 Lokalisation von Gelsolin	130
4.4.1 Ultrastrukturelle Eigenschaften unterschiedlicher Hummermuskeln	132
4.4.2 Immunlokalisation von Gelsolin unter physiologischen Bedingungen	134
4.4.3 Ultrastrukturelle Immunlokalisation von Gelsolin unter modifizierten physiologischen Bedingungen	136
4.4.4 Immunlokalisation von Gelsolin in isolierten Myofibrillen	137
4.5 Zur Funktion von Gelsolin in Muskelzellen	139
4.5.1 Der Proteinturnover in Muskelzellen	139
4.5.2 Myofibrilläre Dynamik in Muskelzellen	140
4.5.3 Invertebratenactine sind instabiler als Vertebratenactine	143
4.5.4 Zur Funktion von Gelsolin in Invertebratenmuskeln	144
Schlussbetrachtung	146
5. Literaturverzeichnis	147
6. Anhang: Sequenzvergleiche/MALDI-Messungen	

Abkürzungsverzeichnis:

[X]	Konzentration von X
a	anti
ABP	Actinbindeprotein
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat-p-Toluidinsalz
BSA	Rinderserumalbumin Bovine serum albumin
c	Konzentration
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	Komplementäre DANN
cLSM	Konfokale Laserscan Mikroskopie
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMAE	Dimethylaminoethyl
DTT	1,4-Dithio-DL-Treithol
Dnase	Desoxyribonuclease
EDC	1-Ethyl-3-(diethylaminopropyl)-Carbodiimid
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl-)Tetraessigsäure
EWAM	Regenwurm Actinmodulator
EtBr	Ethidiumbromid
F-Actin	Filamentöses Actin
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
FPLC	Fluid-Pressure-Liquid-Chromatography
G	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-Actin	Globuläres Actin
SKM	Skelettmuskel
HG	Hummergelsolin
kDa	kDa
L	Liter
LPA	Lysophosphosäure
M	$M \cdot L^{-1}$ (Molar)
m	milli
Min	Minute
NBT	Nitroblautetrazoliumsalz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PIP2	Phosphatidyl-4,5-Inositolphosphat
Pyren	N-(1-pyrenyl)-iodoacetamid
RPM	Umdrehung pro minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethlendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrodaminisothiocyanat
Triton-X	Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen Verhältnis
w/v	Gewicht/Volumen Verhältnis

Zusammenfassung:

Aktin-bindende Proteine übernehmen zentrale Aufgaben sowohl für die Ausbildung der Struktur und für die Dynamik des Actincytoskeletts, als auch in hochgeordneten Muskelsarkomeren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Isoformen aus der Familie der Gelsoline hinsichtlich dieser Funktion und deren Lokalisation in Crustaceenmuskeln untersucht.

Bei Proteinen aus der Gelsolinfamilie handelt es sich um multifunktionale Proteine, die sowohl für Vertebraten, als auch für Invertebraten beschrieben sind. Die modular aufgebauten Proteine lassen sich aufgrund ihrer Anzahl an repetitiven Segmenten und der Molekularmasse in 40 & 80kDa Modulatoren einteilen. Die Verteilung der Modulatorklassen innerhalb verschiedener Taxa legt eine evolutionäre Entwicklung durch mehrfache Genduplikation nahe.

Durch die SDS-PAGE wurden zwei Gelsolinisoformen mit unterschiedlichen apparenten Molekularmassen von 113kDa (HG₁) und 116kDa (HG₂) identifiziert, die in distinkten Anteilen in verschiedenen Muskelfasertypen des amerikanischen Hummers exprimiert werden. Die Identifikation zeigt die Expression von vorzugsweise einer Isoform in schnellkontrahierenden Muskelfasertypen, die der anderen in langsamen-tonischen Muskelfasern. Es wurde ein Aufreinigungsschema entwickelt und die Interaktion der beiden Isoformen mit Aktin eingehend charakterisiert. Die Hummergelsoline besitzen typische Gelsolineigenschaften: Beschleunigung der Nukleation durch Ausbildung von Nukleationskeimen, Fragmentation von Actinfilamenten und die Ausbildung einer Kappe am Plusende von Actinfilamenten.

Die Calciumabhängigkeit wurde im Bezug auf die jeweilige Aktivität der Isoformen untersucht. Dabei zeigten sich Unterschiede, die im Kontext mit Untersuchungen zur Actomyosin-ATPase Aktivität auch Unterschiede in der Calciumsensitivität der verschiedenen Muskelfasertypen nahelegen.

Die Koloalokalisation von Gelsolin und Actin ist umstritten. Lichtmikroskopische Befunde zeigten bis dato sowohl eine diffuse, cytoplasmatische Verteilung von Gelsolin, als auch eine Lokalisation von Gelsolin innerhalb der I-Z-I-Bereiche von Myofibrillen in Skelettmuskeln. Die Studien wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig auf ultrastruktureller Ebene durchgeführt und auf verschiedenen Muskelfasertypen ausgeweitet.

Unter physiologischen Bedingungen konnte eine Koloalokalisation von Gelsolin mit den dünnen Filamenten sowohl in langsamen~, als auch in schnellen Muskeln durch immunelektronenmikroskopische Verfahren eindeutig nachgewiesen werden. Dabei wurde ermittelt, dass ~90% des zellulären Gelsolins vollständig entlang der dünnen Filamente lokalisiert ist. Aus den Untersuchungen zeigte sich ebenfalls, dass es sich bei den beiden identifizierten Isoformen um intrazelluläre Varianten handelt, die sich bezüglich der Lokalisation nicht unterscheiden.

Aus ultrastrukturellen Lokalisationsstudien unter modifizierten physiologischen Bedingungen ging hervor, dass die Interaktion von Gelsolin mit den dünnen Filamenten in calciumabhängiger Weise reversibel ist. Immunmarkierungen an isolierten Myofibrillen verschiedener Muskelfasertypen zeigen ein Anteil von ~20% des myofibrillären Gelsolins, der bei niedriger Calciumkonzentration gebunden bleibt.

Die Existenz von Gelsolin wurden ebenfalls in ungeschlüpften Zoea-Larven des Hummers nachgewiesen. Ultrastrukturell Immunlokalisationen an verschiedenen Muskeln der Larven zeigen unter physiologischen Bedingungen eine Koloalokalisation der Gelsoline mit den dünnen Filamenten.

Das existierende Model der Gelsolin-Actin Interaktion wird mit den vorliegenden Bindungs- und Lokalisationsstudien erweitert. Die Befunde legen nahe, dass Gelsolin in Invertebratenmuskeln eine wesentliche Rolle beim *Turnover*prozess von Actin übernimmt und damit zur Aufrechterhaltung der Kontraktilität beiträgt.

1 Einleitung

1. Architektur und Organisation des kontraktilen Apparates von Skelettmuskeln

In Vertebraten kommen grundsätzlich drei verschiedene Muskeltypen vor, Glattmuskeln, Skelettmuskeln und Herzmuskeln. Basierend auf der Interaktion der Proteine Actin und Myosin erzeugen sie unidirektionale Bewegungen. Die Muskelformen unterscheiden sich grundsätzlich im Aktivierungsmechanismus, der Anordnung von kontraktilen Elementen und der hinsichtlich der Energieversorgung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit biochemischen Bindungsstudien und der Lokalisation von Proteinen aus der quergestreiften Muskulatur. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden verschiedene Skelettmuskeltypen aus der Muskulatur von Crustaceen verwendet. Unter den Invertebratenmuskeln ist der quergestreifte Crustaceenmuskel dem Vertebraten Skelettmuskel am ähnlichsten, parallel dazu wird durch ihn auch eine große Diversität an Skelettmuskelfhänotypen repräsentiert.

1.1 Der Aufbau von Skelettmuskeln

In Skelettmuskelzellen sind die Filamente zu hochorganisierten Sarkomeren organisiert, die den Zellen im Mikroskop eine gestreifte Erscheinung geben (Abb.1.1A). Dabei weisen die Sarkomere alternierende Bereiche auf, die im polarisierten Licht als helle I-Bande (isotroph) und dunkle A-Bande (anisotroph) erscheinen. Sarkomere werden durch Zwischenscheiben, die Z-Scheiben, begrenzt. Die dünnen Filamente (\varnothing 7nm) sind beidseitig in den Z-Scheiben verankert und verlaufen parallel in Richtung Sarkomermitte (Abb.1.1B). Zwischen den dünnen Filamenten sind in ebenfalls paralleler Orientierung die dicken Myosinfilamente (\varnothing 15nm, MyosinII) positioniert. Die Kontraktion wird durch ATP erzeugt, das über hydrolytische Spaltung Myosine zwischen Actinfilamente gleiten läßt. Je nach Kontraktionsgrad erscheinen folglich unterschiedlich große *I-Banden*, in der sich nur dünne Filamente befinden. Der Bereich in der die dünnen und dicken Filamente überlappen, wird als *AI-Bande* bezeichnet, Bereiche in denen nur dicke Filamente lokalisiert sind, repräsentieren die *A-Bande*. Im expandierten Zustand wird in der Sarkomermitte der Myofibrillen ein heller Bereich sichtbar, in dem keine Actinfilamente

lokalisiert sind, die *H-Zone*. Innerhalb dieser Zone läßt sich oftmals eine *M-Linie* ermitteln, wo die dicken Filamente durch akzessorische Proteine (z.B. M-Proteine, Myomesin) miteinander in Verbindung stehen. Skelettmuskelzellen entstehen durch die Fusion von Myoblasten, die Zellkerne liegen in adulten Zellen in der Peripherie der Membranen (Sarkolemma), die Myofibrillen sind im Myoplasma positioniert. Die Myofibrillen sind über die Z-Scheiben durch intermediäre Filamente (Desmin) miteinander verbunden, randständige Z-Scheiben werden über sehr komplexe Strukturen, den Costameren, mit dem Sarkolemma verknüpft. Die Z-Scheiben (und die M-Linien) gewährleisten nicht nur die mechanische Zugfestigkeit bei der Muskelkontraktion, sondern sind auch für Signale sensitiv und in der Lage sie an die kontraktiellen Einheiten weiterzuleiten (Clark *et al.*, 2002).

In Skelettmuskelsystemen von Vertebraten sind neben Actin- und Myosinfilamenten zwei weitere Filamentsysteme lokalisiert (Littlefield & Fowler, 1998). Das dritte Filamentsystem des quergestreiften Muskels besteht aus Titin, dem größten bis dato identifizierten Protein (3,7 MDa). Das multifunktionale Molekül durchspannt die I- und A-Bande, seine Enden überlappen in der M-Linie und der Z-Scheibe. Titine formieren damit kontinuierliche Filamentsysteme in Myofibrillen aus, die Stabilität und Elastizität vermitteln (Sanger & Sanger, 2001). Neben der aktiven Kraft, die aus der Actomyosin-ATPase resultiert, produzieren Myofibrillen passive, in den Ruhezustand zurückführende Kräfte, die auf federartigen Elementen des Titins im Bereich der I-Bande basieren. Nebulinfilamente bilden das vierte Filamentsystem. Es wird angenommen, dass Nebulin entlang der dünnen Filamente bindet und als molekularer Längenregulator für Actinfilamente fungiert (Witt *et al.*, 2006,). Interaktionen mit Desmin deuten auch auf die Teilnahme an einem lateralen Vernetzungssystem der Z-Scheiben von benachbarten Myofibrillen. Herzmuskeln besitzen kein Nebulin, in ihnen wird ein kleines, nebulin-artiges Protein (Nebulette) exprimiert (Moncman & Wang 2002).

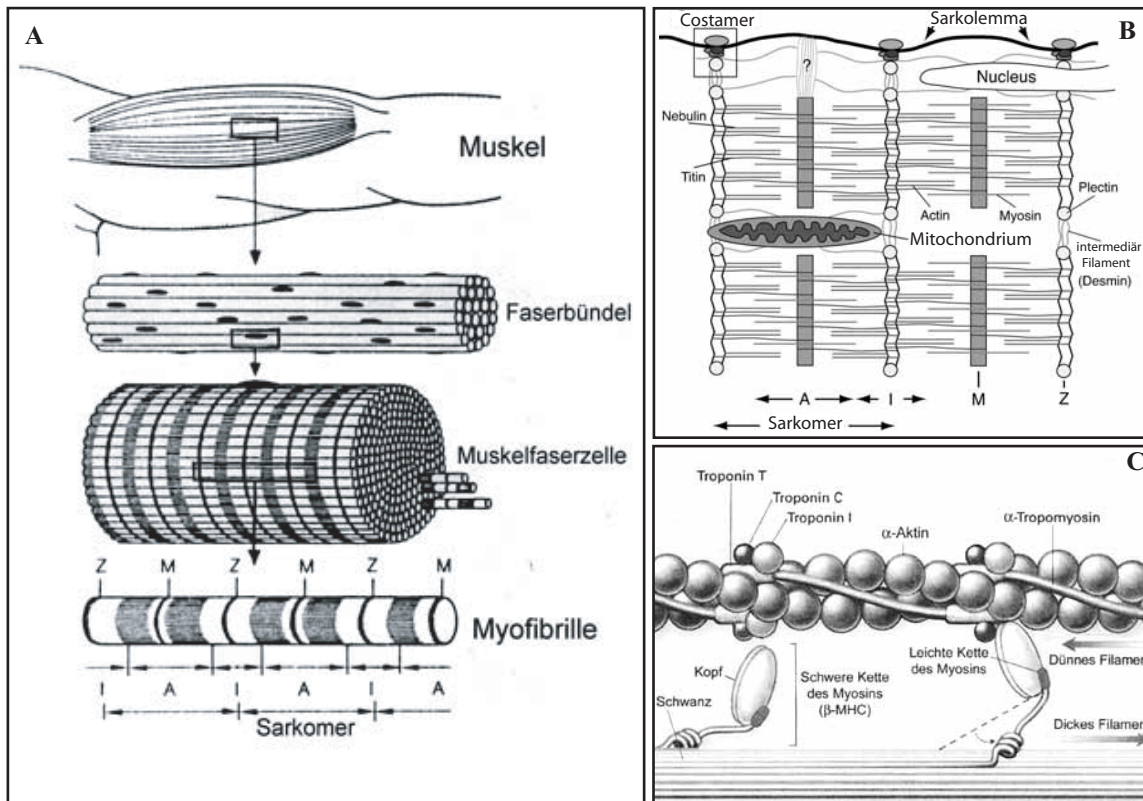


Abb.1.1.: Schematische Darstellungen der quergestreiften Mammalierskelettmuskulatur

(A) Muskelzellen bestehen aus den Myofibrillen, die wiederum aus den Sarkomeren, den kleinsten funktionellen Einheiten aufgebaut sind. (B) Diese Sarkomere sind neben assoziierten Proteinen aus vier Filamentsystemen aufgebaut: (1) dünne Actinfilamente, (2) dicke Myosinfilamente (3) Nebulinfilamente (4) Filamente des elastischen Systems (Titin). (C) Die Kontraktion der Muskeln wird durch das Ineinandergleiten der dicken Filamente zwischen die dünnen Actinfilamente ermöglicht. Die antiparallele Anordnung der Myosinmoleküle im Filament ermöglicht die Kontraktion, da sie die dünnen Filamente in den beiden Sarkomerhälften zueinander hin ziehen. (A: aus Bloom & Fawcett, 1975 modif.; B, C: aus Seidman & Seidmann 1995, modif.)

Serielle Verknüpfungen von Sarkomeren vermitteln die Kontraktionsgeschwindigkeit des Muskels, die Kraft wird durch die Zahl parallel kontrahierender Sarkomere determiniert. Grundsätzlich zeigen Skelettmuskelzellen nur zwei Stadien, inaktiv (=relaxiert) und aktiv (kontrahierend). Sie erzeugen aber eine große Vielfalt an Kontraktionen, von langsam und moderat, bis hin zu schnellen und kraftvollen Kontraktionen. Diese graduellen Kontraktionen basieren auf der Zahl der Muskelzellen, die durch stimulierende Signale des Nervensystems aktiviert werden. Die Nervenimpulse stimulieren einen transienten Anstieg an cytoplasmatischem Calcium, das dann die kontraktile Einheit aktiviert.

1.2 Die calciumabhängige Skelettmuskel-Kontraktion

Sowohl bei Vertebraten, als auch bei Invertebraten werden die Muskeln von einem verzweigten Röhrensystem, dem transversalen Tubulus-System durchzogen. Ein sich von der motorischen Endplatte über die Plasmamembran der Muskelzelle ausbreitendes Aktionspotential setzt sich über dieses Tubulus System fort (Review: Ebashi, 1991; Schneider, 1994). Innerhalb der Muskelfasern befindet sich ein weiteres Netzwerk des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), das als Calciumspeicher fungiert und mit dem tubulärem System in Verbindung steht. Eine Erregung hat zur Folge, dass im Tubulisystem spannungsabhängige Dihydropyridin-sensitive Calciumkanäle geöffnet werden und mit Ryanodin-sensitiven Calcium Rezeptoren der SR-Membran in Kontakt treten (Rios & Brum, 1987). Die Interaktion stimuliert die Freisetzung großer Mengen von Calciumionen aus den terminalen Cisternen des SR, die entlang des Konzentrations-Gradienten aus den Lumen in den Intrazellularraum diffundieren (McPherson & Campbell, 1993). Dort wird die Ca^{2+} Konzentration von unter $0,1 \mu M$ auf $1 \mu M$ erhöht.

Mechanische Interaktionen zwischen den Ryanodinrezeptoren bewirken eine laterale Ausbreitung der Aktivierung, die zur simultanen Aktivierung der Calciumausschüttung führt. Diese Calcium-induzierte Calciumfreisetzung bewirkt den Beginn der Interaktion dünner und dicker Filamente, die zur Verkürzung der Sarkomere (isotonische Kontraktion) oder auch zum Aufbau von Muskelspannung führen kann (isometrische Kontraktion). Entgegen des Konzentrations-Gradienten pumpen E1E2 Calcium-ATPasen Ca^{2+} -Ionen noch vor der Krafterzeugung durch Kontraktion aus dem Cytoplasma zurück ins SR (Pette und Staron, 1990), wo Proteine (z.B. verankerte Calsequestrine) niedrigaffin Calcium mit hoher Calcium-Bindungskapazität reversibel sequestrieren. Die Calciumpumpen sind permanent aktiv und sorgen so für niedrige intrazelluläre Konzentrationen, was erneut wiederholende Aktionspotentiale zur Erhöhung des cytoplasmatischen Calciumspiegels notwendig macht.

Neben diesen auf Aktionspotentialen basierenden und stark fluktuierenden Calciumniveaus gibt es noch weitere, sehr komplexe Mechanismen, die in lokalen Bereichen erhöhte Calciumkonzentrationen induzieren können. Calcium stimulierte, kontraktionsunabhängige Prozesse, wie sie beispielsweise in peripheren Bereichen von Zelle ablaufen, können so reguliert werden.

Die Kontraktion, die auf der Interaktion von Actin- und Myosinfilamenten basiert, wurde von Huxley (1953) erstmalig beschrieben und als Querbrückenzyklus bezeichnet. Im Ruhezustand sind die identischen Kopfdomänen mit den Actinbindungsstellen der

Myosinköpfe (Margossian & Lowry, 1973) durch Tropomyosine auf dem Aktinfilament sterisch blockiert und verhindert einen mechanischen Kontakt. Zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen sind am Troponin C unbesetzt. Durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zur Interaktion von dicken und dünnen Filamenten: Die kooperative Bindung von Ca^{2+} -Ionen an die Troponin-C Untereinheit, die eine Konformationsänderung in der tropomyosin-bindenden Domäne auslösen, initiiert eine Verschiebung des Tropomyosinstranges auf dem Aktinfilament (Bremel *et al.*, 1973, Potter *et al.*, 1995). Die ATP/ADP+ P_i tragenden Myosinköpfe können nun mit dem Actin interagieren, was eine Aktivierung der MyosinATPase zur Folge hat zur Freisetzung des anorganischen Phosphates führt. Dadurch kommt es zu einer ersten Krafterzeugung, die eine weitere Translokation des Tropomyosins erzeugt und den Raum für eine vollständige Interaktion der Myosinköpfchen mit dem Actin öffnet (Abb.1.1 C).

Die MyosinATPase wird durch die Bindung an Actin stimuliert, das stellt einen Nukleotid-Austauschfaktor für Myosin dar. In Abwesenheit des Nukleotides bindet der Myosinkopf eng an Actin und formiert so die Rigor Stellung. Die Bindung von ATP an die ATPase Seite der Myosinquerbrücke führt zur schnellen Dissoziation des Actomyosinkomplexes. Die Aktivierung der MyosinATPase durch Actin bewirkt die Hydrolyse des ATPs unter Bildung eines stabilen ADP + P_i Myosin Komplexes. Durch Interaktion mit Actin kommt es zur Dissoziation des Produkts, die Rekombination des Actomyosinkomplexes führt zur Konformationsänderung der Myosinquerbrücke und zur Freisetzung der Produkte ADP und P_i aus der Motorregion des Myosins (Lymn & Taylor 1971). Es resultiert der Kraftschlag und damit auch die Verschiebung der beiden Filamente. Die antiparallele Anordnung der Myosinmoleküle im Filament ermöglicht dann die Kontraktion, da sie die dünnen Filamente in den beiden Sarkomerhälften zueinander hin ziehen.

Arthropoden besitzen vergleichsweise große Dihydropyridin-sensitive Calciumkanäle (Takekura & Franzini-Armstrong, 2002), die durch die Depolarisation der Membranoberfläche mit Ryanodinrezeptoren in Kontakt treten und so die Erhöhung intrazellulärer Calciumkonzentrationen initiieren (Smith, 1966; Hoyle, 1973). In den Skelettmuskeln von Arthropoden wird die Calciumfreisetzung somit ebenfalls durch Calcium induziert (Györke & Palade, 1991). Es ist lange bekannt, dass zwei auf Ca^{2+} basierende, distinkte regulatorische Systeme für die Kontraktion in Muskelsystemen verschiedener Taxa vorhanden sind. Bei vielen Invertebraten wirkt eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration nicht nur auf Troponin C, sondern auch auf die regulatorische, schwerere der beiden leichten Ketten des Myosins (Lehman & Szent-Györgyi, 1975). Das

vermittelt eine Phosphorylierung dieser Kette durch eine MLC-Kinase, bei Insekten konnte gezeigt werden, dass die ATPase Aktivität dann um das fünffache gesteigert werden kann (Winkelman & Bullard, 1980). Dieser duale Mechanismus ist jedoch nicht generell etabliert, in vergleichenden Untersuchungen zur Calciumregulation der Actomyosin-ATPase verschiedener Crustaceen wurden konsistente Unterschiede zwischen verschiedenen Muskelsystemen deutlich (Lehman & Szent-Györgyi, 1975, Waternabe *et al.*, 1982). Dabei wurde u.a. an Homariden gezeigt, dass die Kontraktionen langsamer Muskelfasern dual reguliert werden, schnell-kontrahierende Muskelfasern aber kein Myosin-basierendes Ca^{2+} -Regulationssystem besitzen. Bei Mollusken scheint die Regulation der Kontraktion nur über eine Bindung von Calcium an das Myosinmolekül zu erfolgen (Kendrick-Jones *et al.*, 1970; Maruyama, 1985). Vergleichende Daten aus Untersuchungen zur Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung der Actomyosin-ATPase unterschiedlicher Muskeln des Hummers werden in dieser Arbeit ebenfalls vorgelegt, um sie im Kontext mit der Aktivität von Gelsolin zu diskutieren.

An die dicken Filamente vieler Invertebraten bindet Paramyosin (2x 100kDa), das in zahlreichen Isoformen mit unterschiedlichen Molekulargewichten exprimiert wird (Chen *et al.*, 1988). Paramyosin bildet nur den Schwanzteil des Myosin IIs in Form zweier *coiled coil* α -Helices aus und coaggregiert mit Myosin. Es liegt dann meist in der Kernregion dicker Filamente vor und kann dort auch den Hauptbestandteil ausmachen (Epstein *et al.* 1985). Die Präsenz und die Konzentration in einem Muskel korrelieren mit der Kontraktionsgeschwindigkeit, daher besitzen langsame Invertebratenmuskeln oft stark paramyosinhaltige und sehr lange Myosinfilamente (Ashton *et al.*, 1987). Die kontraktiellen Eigenschaften eines Muskels hängen aber auch von der Zusammensetzung von Actin- und Tropomyosinisoformen ab, da die verschiedenen Tropomyosine unterschiedlich stark auf dem Actinfilament verschoben werden (Lehmann *et al.*, 2000).

1.3 Morphologie und biochemische Profile des Crustaceenmuskels

Unter den Invertebratenmuskeln ist der quergestreifte Skelettmuskel von Arthropoden dem Vertebratenskelettmuskel am ähnlichsten (Bonilla *et al.*, 1992). Bei Arthropoden besteht die viscerele, cardiale und skeletale Muskulatur, ausschließlich aus diesem vielkernigen Zelltyp (Govind, 1986). Die kontraktiellen Eigenschaften sind divers, die funktionellen Unterschiede stehen im direkten Zusammenhang mit der Zusammensetzung der myofibrillären Isoformen individueller Fasern (Schiaffino & Reggiani, 1996). Innerhalb der Crustaceenmuskulatur konnten funktionell sehr unterschiedliche Muskeln identifiziert

werden. Fahrenbach (1967) differenzierte grundlegend die Superkategorien segmentaler und intersegmentaler Muskulatur, vergleichende Studien zur Diversität der Crustaceenmuskeln wurde dann von Hoyle (1967) und Jahromi und Atwood (1968, 1969) vorgelegt. Auf der Basis struktureller Kriterien (Silvermann *et al.* 1987, West, 1997) und der spezifischen Zusammensetzung myofibrillärer Proteine (Mykles, 1988, 1997) konnte für die einzelnen Muskeln ein Klassifikationsschema etabliert werden. Mit diesem Schema werden die Crustaceenmuskeln in schnelle, langsam-phasische (S1) und langsam-tonische (S2) Muskeltypen eingeteilt. Schnelle Fasern weisen Sarkomere mit einer Länge von maximal vier Mikrometern auf (Jahromi & Atwood, 1971; West, 1997), besitzen hohe myofibrilläre ATPase-Aktivität (Ogonowski *et al.*, 1980; Silvermann *et al.*, 1987) und sind durch die Expression spezifischer Proteinisoformen (Mykles *et al.*, 2002; Medler *et al.*, 2004) gekennzeichnet. Analog zum schnellen Muskel ist auch der Scherenmuskel von Homariden mit seinen tonischen Kontraktionen ein gut untersuchtes, charakteristisches Model: die langsamen Fasern, die starke isometrische Zugkräfte produzieren können, sind ebenfalls durch spezifische Proteinstreifen (Lang *et al.*, 1977, Costello & Govind, 1984, Mykles 1985), eine Sarkomerlänge von 6-12 Mikrometern und ein hohes Verhältnis von dicken und dünnen Filamenten gekennzeichnet (Bevendut *et al.*, 1993).

Immuncytochemische Studien zur Verteilung und Expression von muskeltyp-spezifischen Myosinisoformen (LaFramboise *et al.* 2000; Brown & Cantino, 2001) zeigten konsistente Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der dicken Filamente. Hummer besitzen mindestens zwei Isoformen der Myosin-Schwere-Kette, die in schnellen und langsamen Muskeln unterschiedlich exprimiert werden (Mykles, 1985). Die Muskelfunktion wird auch durch sehr niedrigen Temperaturen nicht beeinträchtigt (Holmes *et al.*, 2002), in Hummern kommt es nicht zur Expression temperaturabhängiger Isoformen der Myosin-Schwere Kette, wie es beispielsweise bei Fischen der Fall ist (Magnay *et al.*, 2003).

Auch für α -Actinin, Troponin T und Troponin I konnten Unterschiede in der Muskelzusammensetzung am Model von *H. americanus* gezeigt werden (Mykles *et al.*, 2002). Molekulare Studien adulter Skelettmuskeln aus dem amerikanischen Hummer belegen ebenfalls differenzielle Expressionen von Myosin und Actin in schnellen, S1 und S2 Fasern (Medler & Mykles, 2003). Den schnellen Fasern wurden verschiedene Isoformen von Paramyosin, TnT₂, TnI_{1, 3, 5} zugeordnet, für die S1 (*slow-phasic*) und S2 (*slow-tonic*) Fasern wurde die Isoformen TnT₃, TnI₂ identifiziert. Der wesentliche Unterschied zwischen den S1 und S2 Fasern besteht demnach in der Expression der TnT₁ Isoform in S2 Fasern. Diese Isoform wurde als Marker für den Fasertyp verwendet (Mykles *et al.* 2002). Die

Kombination von TnI₂ und TnI₄ Isoformen wurde in S₂ Fasertypen gezeigt, in S₁ liegen die Isoformen TnI₁ und TnI₂ kombiniert vor. Daten zur Einordnung der *myosin-heavy chains*, die primäre Determinanten für kontraktile Eigenschaften darstellen (Schiaffino & Reggiani, 1996), ließen sich bis jedoch nicht in das Fasersystem einordnen. Diese biochemischen Unterschiede beziehen sich nicht nur auf unterschiedliche Muskeltypen, sondern auch auf unterschiedliche Muskeln mit vergleichbaren physiologischen Eigenschaften, die Muster gleichen der Fasertyp-Heterogenität. Bei der Untersuchung des Schneidescherenschließmuskels konnten durch elektrophoretische Analysen 18 verschiedenen Regionen voneinander differenziert werden (Mykles, 1985b). Die Innervierungsmuster und deren Stärke können mit der Expression regulatorischer Proteinenisoformen korrelieren (Mykles *et al.*, 2002). Entsprechend der dynamischen Plastizität des Vertebratenskelettmuskels, unterliegen auch die Hummermuskeln während der Entwicklung einem Prozess des „*Fasertypswitchings*“ (Govind, 1987, 1992; Mykles, 1997).

Die Myogenese findet während der Entwicklung des Hummers zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt, beispielsweise baut sich die abdominal Schwimmbein~(Pereopoden) Muskulatur während der frühen Embryonalentwicklung auf (Govind *et al.*, 1988), welche vorwiegend in der Zeit nach dem Ausschlüpfen Funktion finden, wohingegen die abdominale Laufbein~(Pleopoden) Muskulatur erst in juvenilen Stadien aufgebaut wird, wenn die Tiere zur benthischen Lebensweise übergehen (Govind, 1992). Bei den Larven sind die thorakalen Exopoditen prinzipiell nur Lokomotionsorgane. Während der juvenilen Entwicklung werden Charakteristika wie die Sarkomerlänge, das Verhältnis von Aktin und Myosinfilamenten, sowie auch die Proteinprofile etabliert, da es bei Crustaceen jedoch kein finales Häutungsstadium gibt, nimmt dieses Wachstum kontinuierlich zu. Eine zentrale Frage stellt sich, wie neue Fasern beim Wachstum addiert werden (Mykles & Skinner, 1985; West *et al.*, 1995). Bei einigen Muskeln, wie zum Beispiel akzessorischen Flexormuskeln ist die Anzahl der einzelnen Fasern konstant (Lang *et al.*, 1970), während bei anderen (z.B. Scherenschließmuskeln) Muskeln eine dynamische Erhöhung angenommen wird (Jahromi & Atwood, 1971; Govind *et al.*, 1977). Studien von Bittner und Trout (1972) konnten die Verlängerungen von Sarkomeren zeigen, Myofibrillen des abdominalen Flexormuskels des Flusskrebsses (*Procambarus*) verlängerten sich von 20µm (larval) auf über 400µm (adult). Govind *et al.* (1977) bestätigte Sarkomerverlängerung in frühen, larvalen Stadien, wies aber auch die Addition von Sarkomeren in späten Stadien von Hummermuskeln nach. Neben der Verlängerung der Myofibrillen durch terminale Addition von Sarkomeren wurde ebenfalls longitudinales Faserwachstum durch mediale

Sarkomerspaltung (H-Zonen) und dortiger *de novo* Generation von Sarkomeren beobachtet (Jahromi & Charlton, 1979). Dieses Sarkomer-*splitting* ermöglicht ein longitudinales Wachstum der Muskelzelle, ohne die kontraktilen Eigenschaften des Muskels wesentlich zu verändern. Ein kontinuierlicher Wachstumsprozess konnte für Intermoult-Zyklen ermittelt werden, wo Verlängerungen existierender Filamente durch Addition von Actin, Myosin und weiteren akzessorischen Muskelproteinen angenommen werden (El-Haj *et al.*, 1986; Govind *et al.*, 1977). An den Prozessen des Muskelwachstums und seiner Reorganisation ist möglicherweise auch Gelsolin beteiligt, was in dieser Arbeit eingehend beleuchtet werden wird.

Neben einem durch Reflexaktivitäten resultierenden Scherendimorphismus, der bis zum zehnten larvalen Stadium determiniert wird, zeigen distinkte Innervierungsmuster auch Einflüsse auf die Sarkomerphänotypen und Zielmuskelentwicklungen. Jeder Muskel besteht aus einer einzigartigen motorneuralen Kombination von Innervierungsmustern (Atwood, 1976; Lang *et al.* 1980; Costello & Govind, 1983), Studien zur Korrelation von Muskelfasertypen mit den Innervierungsmustern belegen eine Beziehung zwischen der Stärke der Innervation und der Expression von Troponinisoformen in langsamen Fasern (Mykles *et al.* 2002; Medler und Mykles 2003).

2 Actin und Actin bindende Proteine

Die Gestalt eukaryontischer Zellen beruht auf der dynamischen Struktur des Cytoskeletts, das intrazellulär ein komplexes Netzwerk aus Proteinfilamenten und assoziierten Proteinen darstellt. Die dynamischen Eigenschaften resultieren aus einer koordinierten Interaktion der Mikrofilamente, Intermediärfilamente und der Mikrotubuli, die gemeinsam das Cytoskelett konstituieren.

Actin ist das Hauptstrukturprotein der Mikrofilamente eukaryontischer Zellen, das die zentrale Rolle bei der Muskelkontraktion, der Zellmotilität und vielen weiteren Zellprozessen spielt. Die Mikrofilamente sind beispielsweise auch in der Signaltransduktion, der Regulation von Enzym- und Membrankanalaktivitäten (Pollard & Cooper 1986, Maximov *et al.*, 1997) und möglicherweise auch in die Transkription involviert (Scheer *et al.*, 1984). In Pflanzen übernehmen Mikrofilamente ebenfalls bedeutende Funktionen, wie die Aufrechterhaltung der Zellform und Architektur, bei der Cytokinese, der cytoplasmatischen Strömung und der Bewegung der Chloroplasten (Kropf *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu den dünnen Filamenten in Myofibrillen aus den Skelett-

oder Herzmuskeln, die sich während der Myogenese zusammensetzen und dann als relativ stabile Filamente existieren, weist das Actin-basierte Cytoskelett eine hohe Dynamik auf, die im wesentlichen auf zwei Faktoren beruht: der Fähigkeit sich durch eine reversible Transformation aus dem monomeren Status (G-Actin) zum Polymer (F-Actin) zu entwickeln und der Interaktion des Actins mit Actin-bindenden Proteinen, die eine Polymerisation inhibieren und auslösen können, Actinfilamente quervernetzen und es an Zellmembranen koppeln können (Review: Jockusch & Hinssen, 1996). Proteine der Gelsolinfamilie können beispielsweise an der Modulation der dynamischen Actinpolymerisation beteiligt sein.

2.1 Monomeres Actin und Actin-Isoformen

Actin wurde erstmals 1942 aus der Kaninchenmuskulatur isoliert und charakterisiert (Straub, 1942), erst 25 Jahre später wurde dann von Hatano und Oosawa (1966) die Isolation aus Nichtmuskelzellen gezeigt. Heute ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Aufreinigungsverfahren von Actin bekannt (Sheterline & Sparrow, 1994). In verschiedenen Muskel- und Nichtmuskelzellen werden unterschiedliche Actinisoformen synthetisiert. Die primäre Struktur von Actin, die biochemischen Eigenschaften des Proteins, als auch die Sequenzen sind vergleichsweise konservativer, als bei vielen anderen Proteinen (Vandekerckhove & Weber, 1978, 1984), Hinweise zur Evolution des Proteins deuten auf enge Verknüpfungen mit der Entstehung des eukaryontischen Lebens (Doolittle, 1992). In vielen Prokaryoten wurde das Actinohomolog MreB nachgewiesen, das eine wichtige Rolle für die äußere Zellform und bei der Teilung übernimmt (Jones *et al.*, 2001, Egelman, 2001), daher scheinen Actine auch für Eukaryonten keine wirkliche evolutionäre Neuheit darzustellen.

Dennoch gibt es einige Regionen im Actinmolekül, die variabler als andere Bereiche erscheinen. Ein Bereich ist der N-Terminus der Polypeptidkette, in dem einige saure Aminosäuren vorliegen. Die Variabilität verschiedener Actine äußert sich in der Nettoladung einzelner Moleküle und erzeugt in der isoelektrischen Fokussierung unterschiedliche Mobilitäten. Diese unterschiedlichen Laufverhalten stellen die Grundlage für die Definition von α , β , und γ -Actinen in der Reihenfolge ihrer Basizität (Garrels & Gibson, 1976). In Nichtmuskelzellen aus Mammaliern kommen die β - und γ -Actin Isoformen vor (Rubenstein & Spudich, 1977), in Skelett- und Herzmuskeln gibt es distinkte α -Actin Isoformen. Eine weitere α -Actinform wird in vaskulären, glatten Muskeln exprimiert, in intestinalen Glattmuskeln prädominiert die γ - Actin Isoform. Alpha-Actine

aus dem Herz- und Glattmuskel unterscheiden sich vom Skelettmuskel durch vier und acht Aminosäuresubstitutionen. Glattmuskel γ -Actine weisen im Gegensatz zum Skelettmuskel α -Actin sechs unterschiedliche Aminosäuren auf, cytoplasmatische β und γ -Actine sind weitreichend identisch (Khaitlina, 2001). Viele Actine aus Invertebratenmuskeln sind zueinander und auch zu cytoplasmatischen Vertebratenactinen homolog. Einen besonderen Fall stellen β -Actine aus Muskeln von Mollusken dar, die sich durch vier AS-Substitutionen von Mammalier- β -Actinen unterscheiden (Vandekerckhove & Weber, 1984). Die Präsenz von Actin-Isoformen ist eher gewebs- als artspezifisch.

Durch Färbungen von Skelettmuskelzellen mit isoformspezifischen Antikörper konnte ermittelt werden, dass α -Actin im Zentrum der Zelle an den Myofibrillen lokalisiert ist, wohingegen cytoplasmatische Isoactine in der Peripherie im corticalen Actinnetzwerk vorhanden sind (Lubit & Schwartz, 1980; Pardo *et al.*, 1983). Letztere konnten durch Markierungsexperimente ebenfalls an den Costameren lokalisiert werden. Antikörper gegen γ -Actin zeigten die Kolokalisation an Mitochondrien (Pardo *et al.*, 1983) In ventriculären Cardiomyocyten wird neben dem α -Actin ebenfalls auch Glattmuskel- α -Actin synthetisiert. Das cardiäre α -Actin wurde ausschließlich in perinuclearen Regionen lokalisiert, wohingegen Glattmuskelactin in nicht-gestreiften Stressfasern außerhalb der myofibrillären Bereiche akkumuliert vorliegt (Harden *et al.*, 1996). In Übereinstimmung mit biochemischen Experimenten zeigte sich die simultane Synthese multipler Actinisoformen, die zur Kompartimentierung der Actine führt.

In Muskelzellen sind Muskelactine in myofibrillären Systemen, hingegen Nichtmuskelactine an Prozessen in cytoplasmatischen Bereichen beteiligt. Die Anteile der beiden cytoplasmatischen β - und γ -Actine sind in den Zellen unterschiedlich, dennoch scheint abseits morphologischer und herkunftsspezifischer Unterschiede der Zellen eine Koexistenz der Actine in einem Verhältnis von 2:1 vorzu liegen (Khaitlina, 2001). Es wird angenommen, dass die verschiedenen Actine sich im Bezug auf ihre Polymerisationseigenschaften eher wenig unterscheiden, der Austausch N-terminaler Aminosäuren sich aber auf die spezifischen Bindungseigenschaften bei Proteininteraktionen auswirkt (Rubenstein, 1990, Herman, 1993). Interessanterweise konnte durch Lokalisationsexperimente bereits gezeigt werden, dass in diese Kompartimentierung lokaler Actinisoformen auch distinkte Myosin- und Tropomyosinisoformen integriert sind (Gunning *et al.*, 1998). Möglicherweise wird so eine unabhängige Kontrolle ähnlicher biologischer Prozesse in unterschiedlichen Regionen der Zelle erreicht. Wie die einzelnen Isoformen durch zelluläre Mechanismen sortiert werden, ist bis dato noch unklar. Es wird

Molekülstruktur wird dann durch Wasserstoffbrücken und Ionenbindungen stabilisiert, ein Verlust von Nucleotid und Kation führt zur Denaturierung des Proteins. Die beiden Domänen werden durch zwei Strangbereiche der Polypeptidkette zusammen gehalten, die aber auch als ein Gelenk fungieren, damit relative Bewegungen der beiden Domänen ermöglicht werden. Da in den meisten Zellen die intrazelluläre Konzentration an Mg^{2+} Ionen weitaus größer ist, als die Konzentration freier Ca^{2+} Ionen, die durch die Calciumpumpen permanent aus dem Cytoplasma entfernt werden, ist die Bindungsstelle für das zweiwertige Kation des Actins *in vivo* wahrscheinlich durch Mg^{2+} besetzt, *in vitro* wird das Magnesium durch freie Calciumionen verwendeter Puffers verdrängt: $K_{Diss} Mg^{2+}$: 10 nM; $K_{Diss} Ca^{2+}$: 2 nM (Gershman *et al.*, 1986).

2.2 F-Actin

Actin kann als Monomer (G-Actin), als auch als Polymer (F-Actin) vorliegen. Der reversible Prozess der Polymerisation stellt im Wesentlichen eine Kondensationsreaktion dar. Die wesentlichen Schritte dieses Prozesses sind (1) eine langsame, initiale Assoziation der Monomere zu Dimeren, die eher dissoziieren, als sich zu stabilen Trimeren (2) zu erweitern, welche dann die Basis für die Formation und Elongation von Filamenten (3) darstellen. Final resultieren Filamente, die in einem dynamischen Gleichgewichtszustand mit freien Monomeren vorliegen. Globuläres Actin polymerisiert unter physiologischen Bedingungen spontan zu Filamenten (Oosawa *et al.*, 1972), der Prozess verläuft in Gegenwart von 50 – 150 mM KCL und 1-2 mM $MgCl_2$, einem neutralen pH-Wert und erhöhten Temperaturen (Asakura *et al.*, 1960) optimal. Die Anwesenheit von Mg^{2+} Ionen beschleunigt die durch monovalente Kationen induzierte Polymerisation, in Anwesenheit millimolarer Calciumkonzentrationen wird die Reaktion (Selden *et al.*, 1986) inhibiert. Die Actinpolymerisation kann ebenfalls durch polyvalente Kationen oder durch Myosine und deren proteolytische Fragmente induziert werden (Miller *et al.* 1988).

In den Zellen wird die spontane Polymerisation durch monomer bindende Proteine (z.B Profilin, Thymosin β 4) inhibiert (Dos Remedios *et al.*, 2002). Polymerisationsbedingungen induzieren Konformationsmodifikationen am G-Actin, die eine Assoziation der Monomere begünstigen und zum ersten Schritt der Polymerisation, der Monomeraktivierung, führen (Rich & Estes, 1976). Eine Zusammenlagerung zu Filamenten kann nur stattfinden, wenn die Monomerkonzentration oberhalb einer *kritischen Konzentration* liegt. Die Monomere assoziieren relative langsam in Form kurzer Oligomere (*Nuclei*), die dann aus mindestens drei Monomeren bestehen; den Zeitraum innerhalb der Actinpolymerisation bezeichnet

man als lag-Phase (Carlier, 1989, 1998; Sheterline *et al.*, 1995). Die trimeren Nuclei elongieren nach ihrer Bildung rapide bis die Monomerkonzentration unter die kritische Konzentration fällt und das System ein Fließgleichgewicht (*steady-state*) erreicht. Die Polymerisationsgeschwindigkeit ist von verschiedenen Faktoren abhängig, beispielsweise werden *in vitro* Trimere schneller durch aktivierte ATP-G-Actine gebildet, als durch ADP-G-Actine (Estes *et al.*, 1992). Actinfilamente besitzen eine strukturelle Polarität, die beiden Enden des Polymers sind daher nicht äquivalent, am + Ende (*barbed end*) ist die Polymerisationsrate weitaus höher als am –Ende (*pointed end*) (Pollard & Cooper, 1986). Die Addition von Monomeren am +-Ende wird schließlich durch eine Dissoziation von G-Actin am –Ende begleitet. Der resultierende Fluß in Gegenwart der kritischen Konzentration wird als *treadmilling* Mechanismus, einem dynamischen Gleichgewichtszustand, bezeichnet (Wegner, 1982).

Prinzipiell gibt es keinen Schritt in der Actinpolymerisation, der die Länge der Filamente determiniert, allein die mechanische Stabilität limitiert die Länge eines Filaments. Die Actinpolymerisation wird durch die stöchiometrische Hydrolyse des G-Actin gebundenen Nucleotids bei der Inkooperation von Monomeren in das Filament begleitet (Wegner 1976), ist jedoch nicht daran gekoppelt. Die Affinitäten der Filamentenden unterscheiden sich ebenfalls im Bezug zu Ihrer Affinität zu ATP~ und ADP Monomeren, Das Plusende besitzt eine höhere Affinität zu ATP-haltigen Monomeren, als das Minusende (Pollard & Cooper, 1986). Im Zustand eines dynamischen Gleichgewichtes werden ATP-G-Actine also am Plusende in das Filament integriert und ADP-Actine am Minusende wieder dissoziiert. Der besonders durch Profilin, aber auch durch Thymosin beschleunigte Recyclingprozess, in dem ADP durch ATP an freien Monomeren getauscht wird, stellt einen wesentlichen Faktor für die Polymerisationskinetik dar. Ist die Hydrolyse des ATPs durch die actineigene ATPase-Aktivität langsamer als die Inkooperationsrate des ATP-G-Actins, kommt es zur Ausbildung einer ATP-Kappe. Diese erzeugt eine Stabilisierung des Endes und damit einen Schutz vor Dissoziation (Abb.2.2C). Wenn nun die Konzentration freier Monomere sinkt und die Assoziationsrate unterhalb der Rate der ATP-Hydrolyse fällt, verschwindet die ATP-Kappe vom Filamentende (Carlier, 1989, 1998), was die Depolymerisation begünstigt. Für die Actinpolymerisation sind folglich die kritische Konzentration und die Reaktionsraten von Bedeutung. Die thermodynamische Stabilität der Filamente wird durch die Stärke der Monomerinteraktionen gewährleistet. Die Rate der ATP-Hydrolyse charakterisiert die Assoziation und Dissoziation von G-Actin an den Filamentenden. *In vivo*

wird die Polymerisation und die Dynamik existierender Filamente zusätzlich durch eine Vielzahl an Actin-bindenden Proteinen moduliert.

Elektronenmikroskopischen Untersuchungen zufolge ist filamentöses Actin aus einer rechtsgängigen Doppelhelix aufgebaut, die aus 13 Monomeren pro Windung (=72 nm) besteht (Hanson & Lowry, 1963; Kabsch & Holmes, 1991). Ebenfalls wurde aus elektronenmikroskopischen Experimenten, bei dem die fischgrätenartigen Filamente mit Myosinfragmenten dekoriert wurden, die Polarität der Filamente deutlich (Abb.2.2.B) Huxley, 1963). Die Kontakte der Actinuntereinheiten innerhalb der Stränge sind stabiler, als die Wechselwirkung zwischen den Strängen (Holmes *et al*, 1990). Da die Konformation des G-Actins von seinem gebundenem Nucleotid und Kation abhängt, sind unterschiedliche strukturelle Stadien des F-Actins möglich (Strzelecka Golaszewska, 2000). Aus dem Kontakt der Monomere resultiert eine Kooperativität, die eine wesentliche Eigenschaft der Filamente darstellt (Egelman & Orlova, 1995) Liganden, oder auch Actin bindende Proteine können die Filamentstruktur modulieren wie es beispielsweise für Gelsolin gezeigt wurde, das für die Generierung der Filamente als Nukleationsverstärker eingesetzt wurde (Khaitlina & Hinssen, 1997).

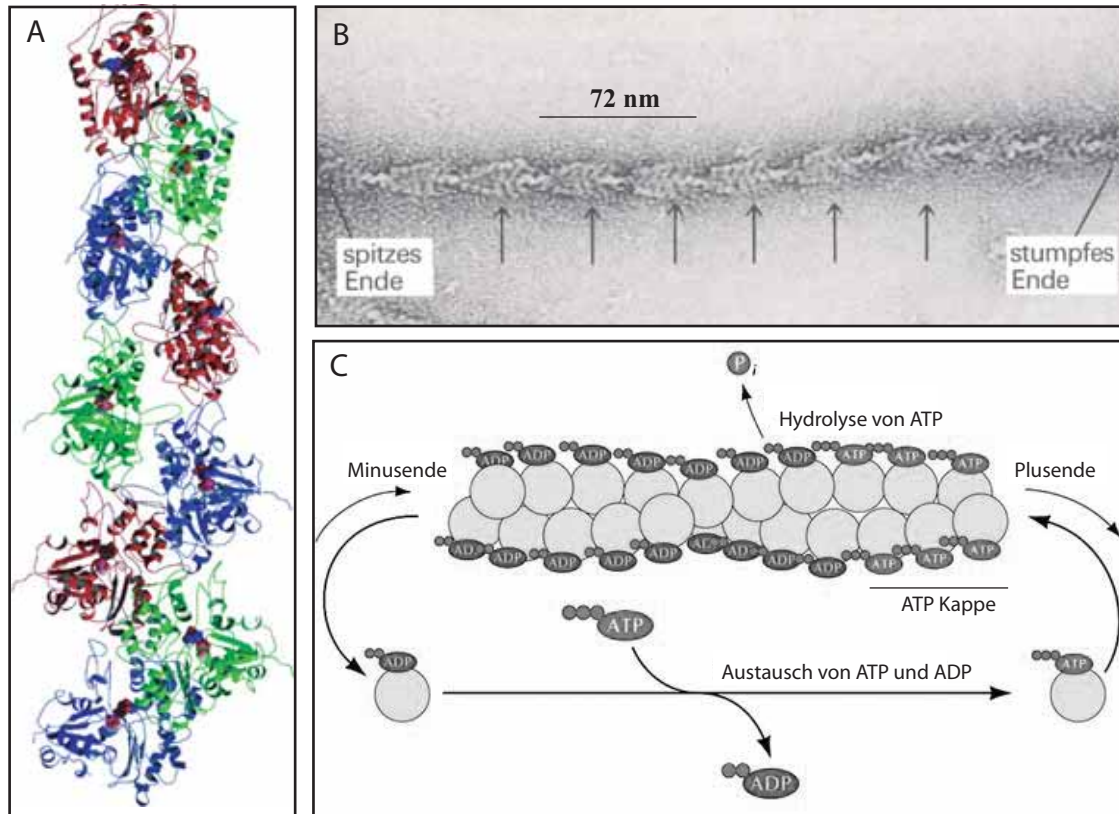


Abb.2.2.: Struktur und Dynamik des F-Actins. In (A) ist die dreidimensionale Struktur des F-Actins wiedergegeben (Holmes et al., 1990). (B) Elektronenmikroskopische Darstellung eines Actin-filamentes, das mit Myosin S1 Fragmenten dekoriert wurde. Durch die Bindung der S1 Fragmente wird die polare Anordnung der Untereinheiten im Filament sichtbar, das Filament wird dort dicker und die pfeilspitzenähnliche Struktur wird sichtbar (Pfeile). Aus der Polarität des Filamentes resultiert ein stumpfes und ein spitzes Ende. (C) Im Zustand eines dynamischen Gleichgewichtes von Actinfilamenten und freiem G-Actin werden ATP-G-Actine am Plusende in das Filament integriert und ADP-Actine am Minusende wieder dissoziiert. Ist die Hydrolyse des ATPs durch die actineigene ATPase-Aktivität langsamer als die Inkooperationsrate des ATP-G-Actins, kommt es zur Ausbildung einer filamentstabilisierenden ATP-Kappe. Der Austausch von ADP~ zu ATP G-Actin ist daher für die Filamentbildung ein geschwindigkeitsbestimmender Prozess, der *in vivo* durch Actinbindende Proteine (z.B. Profilin, Thymosin) beschleunigt wird (nach Pollard, 1990 & 1992, modifiziert).

2.3 Actin bindende Proteine

Die Organisation der Actinfilamente wird in Zellen nicht nur durch die Ionenbedingungen, die Temperatur, den pH-Wert oder durch die Verfügbarkeit von Monomeren reguliert, sondern basiert hauptsächlich auf dem Einfluss Actin-bindender Proteine. Im *steady-state* Zustand liegt der *Actin-turnover* in einem Filament etwa bei $2\mu\text{m/h}$. Das ist vergleichsweise langsam wenn bedacht wird, dass die Zellmotilität z.T. auf der Actindynamik basiert. Die Aufgabe die Rate *in vivo* zu beschleunigen wird von Actin bindenden Proteinen erfüllt. Auf Basis der Funktion wurden verschiedene Ansätze zur Klassifikation dieser Proteine vorgenommen (Stossel *et al.*, 1985; Vanderkerckhove, 1990; Hartwig & Kwiatkowski, 1991, Pollard 1992; Weeds & Maciver, 1993; Schleicher *et al.*, 1995; DosRemedios *et al.*, 2003). Da sich jedoch einige Proteine durch ihre Multifunktionalität (z.B Gelsolin, Profilin, Cofilin) einer konsequenten Kategorisierung entziehen und in den letzten Jahren auch eine Vielzahl neuer Proteine entdeckt wurden, ist eine allein auf der Funktion basierende Zuordnung in bestimmte Klassen schwierig (Carlier & Pantaloni, 1997; DosRemedios *et al.*, 2003). Mit der Zunahme von Daten zur Struktur durch die Röntgenkristallographie wurden nun auch Ansätze diskutiert, die Proteine aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur der Actin-bindenden Domänen zu kategorisieren (Pollard, 1992, Van Troys *et al.*, 1999). Das hier nachfolgend wiedergegebene System (nach DosRemedios *et al.*, 2003) soll demnach vorwiegend einen konzeptionellen Überblick vermitteln:

1) Monomer-bindende Proteine: 40% des zellulären Actins ist G-Actin. Diese Proteine Sequestrierung G-Actin, was sich auf die Polymerisation auswirkt. Beispiel: VitaminD-binding-Protein, Thymosine (in Thrombocyten binden sie 70% des G-Actins), DNase1. Häufig wird auch das G-Actin bindende Profilin genannt, allerdings bindet es nur ~20% zellulärer Monomere und sorgt für deren Nucleotidaustausch, was in einer Polymerisationsbegünstigung resultiert.

2) Filament depolymerisierende Proteine: Diese Proteine induzieren die Konvertierung von F~ zu G-Actin, wie beispielsweise ADF/Cofilin und CapZ.

3) An Filamentenden bindende Proteine: Durch die Bindung von Tropomodulin am Minusende oder am Plusende durch CapZ wird der Austausch, sowie die Ab~ und Anlagerung von Monomeren verhindert. Solche Filamente finden sich in Muskelsarkomeren oder an Erythrocytenmembranen. Gelsolin verbleibt nach der Fragmentation von Filamenten ebenfalls als Kappe am Plusende.

4) Filament schneidende Proteine: Diese Proteine binden seitlich an die Filamente und fragmentieren sie durch eine Veränderung ihrer Konformation. Daraus entstehen Fragmente mit Minusenden, die rasch depolymerisieren können. Die resultierende Desintegration von Netzwerken führt so zu einem erhöhten *turn-over* der Filamente. (z.B. Cofilin, Fragmin, Gelsolin, Scinderin).

5) Quervernetzende Proteine: Sie sind meist mit zwei Bindestellen für F-Actin ausgestattet und für den Aufbau von Bündeln, Verzweigungen und Netzwerken verantwortlich. Beispiele: α -Actinin, Filamin, Villin, Spectrin, Arp2/3

6) Filamentstabilisierer: Die mechanische Stabilität, aber auch der Verlust von Monomeren kann durch laterale Assoziation dieser Proteine gewährleistet werden (Tropomyosin, Nebulin)

7) Motorproteine: Die Filamente werden als Schienen genutzt, bekannteste Vertreter gehören zur Familie der Myosine

2.4 Actinmodulatoren (Gelsoline)

Eine weitere Definition Actin modulierender Proteine wurde von (Hinssen, 1981) vorgeschlagen. Darunter verstehen sich Proteine mit einer Anzahl funktioneller Eigenschaften. Sie binden sowohl G~, als auch F-Actin, inhibieren die Actinpolymerisation durch Blockierung des Plusendes, Fördern die Nucleation und verkürzen in Abhängigkeit von Calcium durch Fragmentation die Filamente. Es sind zwei Größenklassen bekannt, Proteine mit einem relativen Molekulargewicht von ~40 und mit einem Gewicht von ~80kDa. Vertreter der Gelsolinfamilie konnten bereits in Myxomyceten (Hasegawa *et al.* 1980; Hinssen 1981, a, b; Yamamoto *et al.*, 1982), in Invertebraten (D'Haese & Hinssen, 1987) und in Vertebraten (Yin & Stossel, 1979; Bretscher & Weber 1980a; Hinssen *et al.*, 1984; Rouayrence *et al.*, 1984) nachgewiesen werden. Jedes dieser Proteine besteht entweder aus drei oder sechs Wiederholungen homologer Segmente von 120-130 Aminosäuren. Diese Domänenstruktur Actin modulierender Proteine führte zu der Vermutung, dass sich diese Prototypen aus einem Profilin-artigen, 14 kDa Vorläufer evolviert haben könnten (Bazari *et al.*, 1988; Finidori *et al.*, 1992), wobei die Modulatoren des 40 kDa Typs durch Gentriflikation entstanden und die Modulatoren des 80 kDa Typs durch eine weitere Genduplikation entstanden sein könnten (Andre *et al.* 1988, Langer *et al.* 1998). Eine Alternative zu dieser Hypothese basiert auf Daten zur Beschreibung des Protovillins in Dictyostelium (Hoffmann *et al.*, 1993) sowie der Beschreibung eines Gelsolins in Drosophila (Heinzelman *et al.*, 1993). Lück (1995) hypothetisierte einen auf

Sequenzvergleiche basierenden, möglichen evolutionärer Verlauf für Actin-bindende Modulatoren aus Crustaceen, der durch Daten des Villins (Bazari *et al.*, 1988; Bock *et al.*, 1994) unterstützt wurde.

2.4.1 40 kDa Actin-Modulatoren

Zur Gruppe der 40kDa Actin Modulatoren gehören Fragmin aus dem azellulären Schleimpilz *Physarum polycephalum* (Hasegawa *et al.*, 1980; Hinssen, 1981 a,b), Severin aus *Dictyostelium discoideum* (Yamamoto *et al.*, 1982) und EWAM (Earthworm-Actin Modulator), der aus der schräggestreiften Muskulatur von *Lumbricus terrestris* isoliert und biochemisch charakterisiert werden konnte (D'Haese & Hinssen, 1987). Im Adductormuskel von *Pecten jacobaeus* (Bivalvia) wurde ein Vertreter der 40kDa Modulatoren nachgewiesen (Remmert & Hinssen, 1996), auch in unbefruchteten Eiern von *Hemicentrotus pulcherrimus* (Echinoida) wurde ein 40kDa Protein identifiziert, das mit Actin 1:1 Komplexe ausbilden kann (Coluccio *et al.*, 1986).

Fragmin, das zunächst als Physarum-Actinin bezeichnete wurde, ist ein 42 kDa-Protein. Es wurde zunächst mit Actin komplexiert isoliert und konnte durch Calciumkonzentration $>10^{-6}$ aktiviert werden (Hinssen 1981 a, b). Die Aktivität wird durch saure Phospholipide moduliert (Gettemanns *et al.*, 1995), sie induzieren die Dissoziation von Actin in einen 1:1 Komplex und inhibieren so 50 % der Cappingaktivität. Im Gegensatz zur Cappingaktivität des Gelsolins kann dieser Komplex dann nicht weiter dissoziieren. Von den Domänen eins bis drei, welche im Fragminmolekül mit Aktin assoziieren können, sind die ersten beiden Domänen für PIP₂ sensitiv. Eine mögliche Bildung eines 2:1 Komplexes mit monomerem Actin (Hasegawa *et al.*, 1980) ist nicht eindeutig geklärt, (Ampe & Vandekerckhove, 1987).

Severin (40 kDa) aus *Dictyostelium discoideum* weist drei Aktinbindestellen auf und bildet sowohl EGTA-stabile 1:1, als auch einen EGTA sensitive 2:1 Komplexe aus (Giffard *et al.*, 1984; Eichinger und Schleicher, 1992). Es zeigt zum Gelsolin identische, calciumabhängige Fragmentationsaktivität. Eine Verstärkung der Nukleation von G-Actin konnte nicht nachgewiesen werden (Yamamoto *et al.*, 1982, Yin *et al.*, 1990). Severin aus Dictiostelium besitzt je zwei Bindungsstellen für Ca²⁺ und für saure Phospholipide, welche durch Assoziation die Aktivität des Proteins regulieren (Eichinger & Schleicher 1992).

Der 40 kDa Actin Modulator aus der schrägen Muskulatur des Anneliden *Lumbricus terrestris* (EWAM) stellt das erste Gelsolin-artige Protein dar, dass aus Invertebraten

isoliert wurde (D'Haese & Hinssen, 1987). Es konnten zwei bezüglich ihrer Actininteraktion identische Isoformen (43/45 kDa) identifiziert werden. Mit monomerem Actin bildet EWAM einen EGTA-stabilen 1:1 und einen EGTA-sensitiven 1:2 Komplex aus, letzterer inhibiert die Fragmentationsaktivität. Die Domäne 1 bindet nur globuläre Actine, wohingegen die benachbarte Domäne 2 auch zusätzlich filamentöses Aktin zu binden vermag, Nukleations- und Fragmentationsaktivität werden durch benachbarte Domänen ermöglicht; die Regulation durch Calciumionen wird durch die Bindung an Domäne drei gewährleistet (Giebing *et al.*, 1997). Fragmin, EWAM und Gelsolin (isoliert aus der glatten Muskulatur des Schweinemagens) wurden direkt miteinander verglichen (Hinssen, 1986). Es zeigte sich abseits der Molekularmassenunterschiede kein Unterschied in der calciumabhängigen Fragmentationseffizienz. Da sich EWAM und Gelsolin hinsichtlich der Förderung der Nucleationsaktivität und der Komplexbildung mit Actinmonomeren nicht unterscheiden, wurde zwischen den beiden Modulatoren eine engere Verwandtschaft postuliert als zum Fragmin, das unter experimentell vergleichbaren Bedingungen mit nur einem G-Actin interagiert. Auch der 50kDa Actin Modulator aus dem Adductormuskel von Jakobsmuscheln zeigte eine vergleichbare, calciumabhängige Fragmentationsaktivität und Eigenschaften die eine Ausbildung von ternären Komplexen mit Actinmonomeren ermöglichen. Diese Komplexe scheinen aber durch Calciumentzug nicht dissoziierbar zu sein (Remmert & Hinssen, 1996).

2.4.2 80 kDa Actin-Modulatoren

Neben den aufgeführten 40 kDa Actinmodulatoren aus Mollusken und Oligochaeten konnten ebenfalls zwei weitere Modulatoren in verschiedenen Taxa innerhalb der Spiralerstammlinie identifiziert werden, die der Gruppe der 80 kDa Actin Modulatoren angehören. Diese Gelsolin-artigen Proteine wurden in der Crustaceenmuskulatur von *Astacus leptodactylus* (Bock *et al.*, 1994) und *Homarus americanus* (Lück *et al.* 1995), sowie in *Drosophila melanogaster* (Heintzelmann *et al.*, 1993; Stella *et al.*, 1994) lokalisiert. Analog zu Studien von Gelsolin aus Vertebraten (Hinssen *et al.* 1984, Weeds *et al.*, 1986), wurden in *Drosophila* ebenfalls Proteine der Gelsolinfamilie in Form einer cytoplasmatischen und einer sekretorischen Isoform nachgewiesen. Funktionelle Analysen und Sequenzvergleiche von Gelsolin aus der glatten Muskulatur von Ascidien belegen eine nähere Verwandtschaft zu Vertebratengelsolinen, als zu den Actin Modulatoren aus Arthropoden (Langer *et al.*, 1998, Ohtsuka *et al.*, 1997). Im phylogenetischen Kontext deutet dies primär auf eine konvergente Evolution der 80kDa Modulatoren innerhalb der

Metazoen, möglicherweise entstanden die 80kDa Modulatoren der Arthropoden und der Vertebraten zwei Mal unabhängig aus Genduplikationsprozessen (Andre *et al.*, 1988).

Weitere Modulatoren der 80kDa Klasse sind das mit Aktin vollständig reversibel interagierende Adseverin (Maekawa & Sakai, 1990, Sakurai *et al.*, 1990) und das 92 kDa Protein Villin (Bretschel & Weber, 1979). Villin kommt in adsorptivem Epithel vor, weist die für Actin-Modulatoren charakteristischen Eigenschaften auf (Glenney *et al.* 1981, Matsudaira *et al.*, 1985) und besitzt am carboxyterminalen Ende eine 8.8 kDa schwere „headpiece“ Domäne, welche durch eine zusätzliche Actinbindestelle die ausschlaggebende Fähigkeit zur Actinbündelung vermittelt (Friederich *et al.* 1989, Pope *et al.*, 1993). Diese Eigenschaft ist für Gelsolin nicht bekannt. Funktionelle Vergleiche zwischen Gelsolin und Villin belegten stark ähnliche Eigenschaften, Villins Aktivität unterliegt jedoch auch einer größeren Calciumabhängigkeit (Janmey & Matsudeira, 1988).

2.5 Struktur, Funktion und Lokalisation von Gelsolin

2.5.1 Struktur und molekulare Interaktion mit Aktin

Gelsolin ist ein komplexes Actin-bindendes Protein, das modular aus sechs Domänen (G1-G6) aufgebaut ist (Kwiatkowi *et al.*, 1986). Die Domänen besitzen unterschiedliche Eigenschaften, die jeweiligen Module stehen durch unterschiedlich lange Abschnitte der Polypeptidkette in Kontakt. Untersuchungen zur Domänenstruktur des Vertebraten Gelsolins belegen in Anwesenheit von Calciumionen drei Bindungsstellen mit Actin (Bryan 1988; McLaughlin, 1993), G1 und G4 binden G-Actin (Pope *et al.*, 1996), wohingegen G2 vorzugsweise F-Actin binden kann (Maciver *et al.*, 2000). Durch proteolytische Spaltungsexperimente wurde deutlich, dass die Bindungsstellen im G1-G3 Fragment calciumunabhängig Actin binden können, eine Assoziation von G4-G6 an G-Actin aber nur in Anwesenheit von Calcium erfolgt (Bryan, 1988). Sequenzanalysen konnten zeigen, dass die Module G1 und G4, G2 und G5, G3 und G6 jeweils hohe Homologien aufweisen.

Das gesamte Molekül wird nicht nur durch Calciumionen, sondern auch durch die Bindung an saure Phospholipide (PIP₂) reguliert, welche an zwei Seiten von G1 und G2 assoziieren können (Hartwig 1989; Burtnick *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen zur Struktur deuten darauf hin, dass Gelsolin möglicherweise nicht nur an Actin bindet. Für Mammaliengelsolin wurde eine Bindung der Domäne 2 an Tropomyosin postuliert (Koeppf & Burtnick, 1992; Maciver *et al.*, 2000). Die Interaktion von Tropomyosin und G2 ist aber umstritten, denn die vorgelegten Daten basieren auf Lichtstreuungsmessungen bei denen es zur Aggregation

von exprimiertem G2 und Tropomyosin gekommen sein könnte. Durch Experimente mit nativem Protein konnte eine mögliche Interaktion von Tropomyosin mit der G2 Untereinheit noch nicht gezeigt werden.

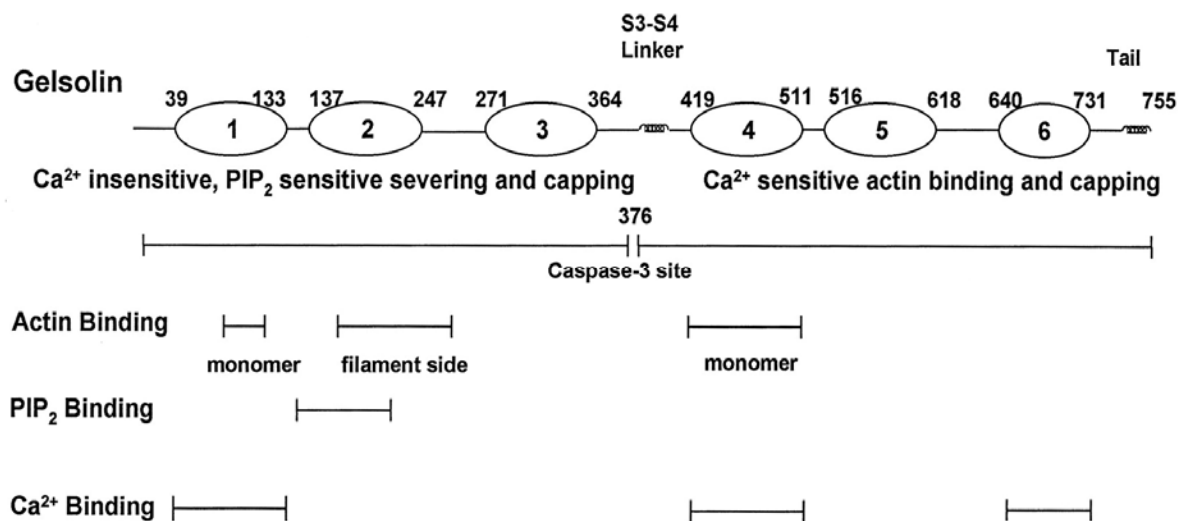


Abb.2.3: Struktur Funktions Domänen von Gelsolin Die Aminosäuren sind wie bei Plasma-Gelsolin durchnummeriert, Segmentgrenzen des modularen Proteins basieren auf kristallographischen Analysen. Die Bereiche in denen Actin, PIP₂ und Calcium bindet sind separat indiziert (aus Sun *et al.*, 1999).

In der Gegenwart von micromolarem Calciumkonzentrationen besitzt Gelsolin die Fähigkeit Actinfilamente zu schneiden. Nach der Fragmentation verbleibt es am schnell wachsenden Plusende als Kappe. Damit wird unter Bedingungen der Depolymerisation oder in Gegenwart hoher Profilinkonzentrationen ein Verlust von Untereinheiten am anderen Filamentende (*pointed end*) möglich. Die Domänen G1 und G2 sind für die Fragmentation von F-Actin verantwortlich, wobei G1 die Fragmentationsaktivität vermittelt (Way *et al.* 1992), eine Bindung des F-Actins an G2 für die Fragmentation aber Voraussetzung ist (Renoult *et al.*, 2001). Zwei Calciumionen koordinieren möglicherweise die Bindung zwischen Gelsolin und Actin (Choe *et al.* 2003; Burtnick *et al.*, 2004). Das nur aus drei Domänen aufgebaute Protein Severin zeigt ebenfalls, obgleich vergleichsweise schwächer, die Nucleations-, Fragmentations und Cappingaktivität des Gelsolins (Andre *et al.* 1988; Yin *et al.* 1990). Selden (1998) konnte zeigen, dass die volle Fragmentationsaktivität auf der Kooperation der C- und N-terminalen Hälften basiert. In den letzten Jahren wurde durch Kombinationen von Röntgenstruktur-, NMR-spektroskopischen- und elektronenmikroskopischen Analysen Fortschritte zur Aufklärung des Fragmentationsprozesses gemacht, dennoch ist der exakte Ablauf noch unklar. Der Prozess besteht aus vier wesentlichen Schritten (Abb.2.4, McGough *et al.* 2003):

- 1) A: Der erste Schritt besteht in der Aktivierung durch Calcium: Es sind dabei zwei Typen von Calciumionen von Bedeutung, Typ I bindet an Bereiche des Moleküls, die durch die Assoziation von Gelsolin mit Actin entstehen, Typ II besetzt Bindestellen an dem alleinigen Gelsolinmolekül. In Gegenwart submikromolarer Konzentrationen werden durch Ca^{2+} TypII-Bindestellen an G5 und G6 belegt. Dadurch wird ein interne Peptidbrücke (*Latch*-Helix) verschoben, was zu einer massiven Konformationsänderung des Moleküls führt, so dass an G2 die Bindungsstelle für F-Actin frei wird (Choe *et al.*, 2002; Kiselar *et al.* 2003). Damit eine Fragmentation ausgeführt werden kann, müssen höhere Calciumkonzentrationen verfügbar sein; die Ionen binden wahrscheinlich an G1, G2 und G4, sättigen damit das Molekül ab und vermitteln nach der Bindung von F-Actin vollständige Fragmentationsaktivität. Insgesamt gibt es bis zu acht potentielle Calciumbindestellen am Gelsolinmolekül, es bleibt jedoch unklar, ob alle möglichen Bereiche besetzt werden.
- 2) Filamentbindung: Nach der Aktivierung durch Calcium ist eine Bindung an F-Actin durch G2 möglich. Wenn dies geschieht, rückt die calciumunabhängig-G-Actin bindende G1 Domäne in die Nähe der Actinbindestelle. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass G2 auch in Abwesenheit von Calciumionen an F-Actin binden kann (Bryan 1988, Way *et al.*, 1989, 1992).
- 3) Filamentfragmentation: G1 inseriert zwischen zwei Monomeren, die longitudinal an einem Actinstrang angeordnet sind. Es sieht derzeit danach aus, als würde das Aufbrechen der Verbindung eines Stranges reichen, um auch die Verbindung auf dem parallelen Strang zu destabilisieren und die vollständige Fragmentation zu gewährleisten.
- 4) Filamentcapping/Uncapping: Vermutlich wird für die Ausbildung einer Kappe durch das Gelsolinmolekül eine Interaktion von G4 mit einem terminalen Monomer des Plusendes benötigt, es bleibt unklar, welches Monomer mit G4 assoziiert (B, 1 & 2). Während der Fragmentation steht Gelsolin mit drei Monomeren des F-Actins in Kontakt, als Kappe verbleibt aber nur der Kontakt mit zwei G-Actinen (Pope *et al.*, 1991). Diese Kappe am Actinfilament kann durch Interaktionen mit Polyphosphoinositiden an der N-terminalen Hälfte des Gelsolins (zwischen G1 und G2, lysinreiche Region) entfernt werden.

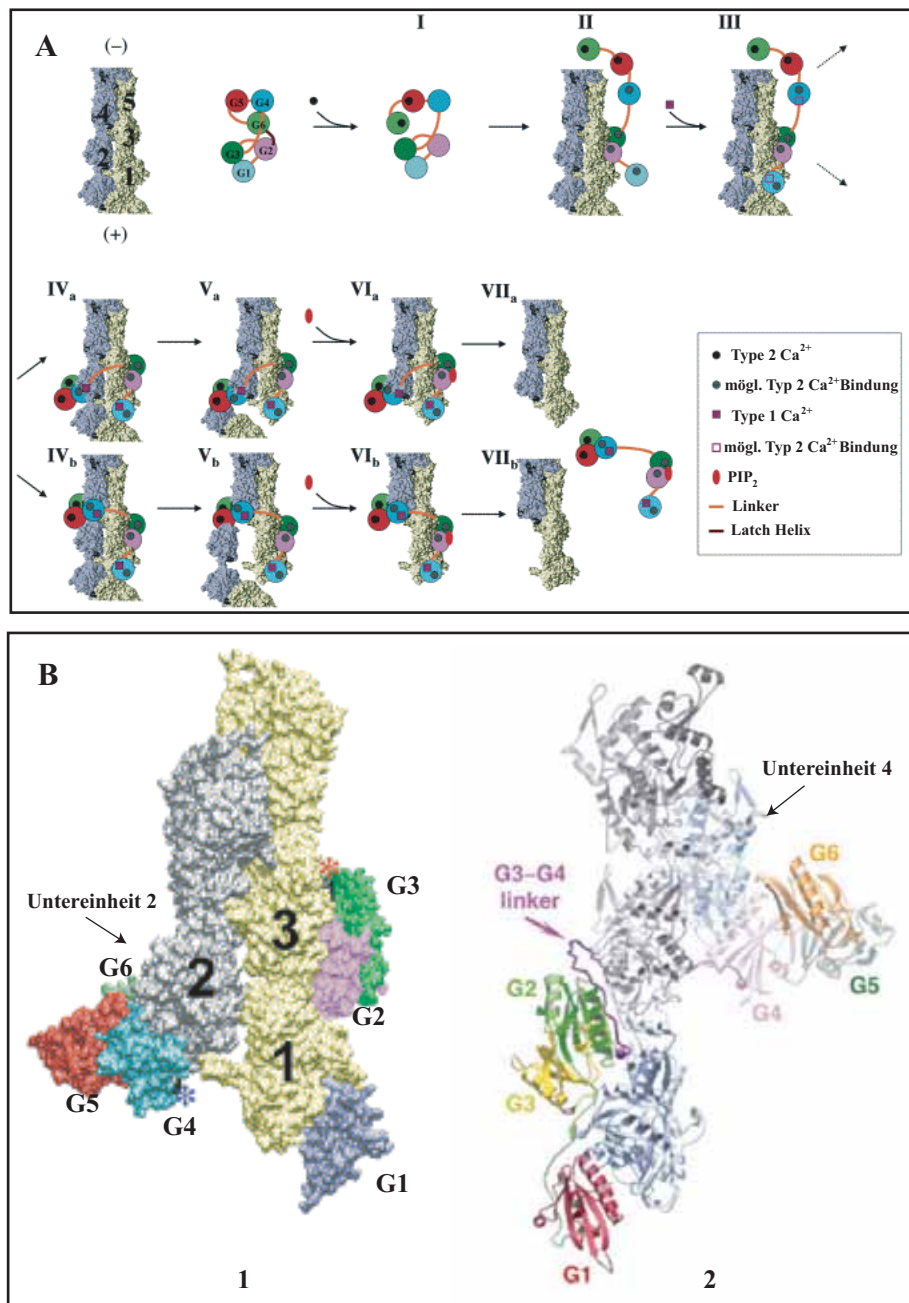


Abb.2. 4.: Schematisches Model des Fragmentations~ und Cappingprozesses

(A) In Gegenwart von EGTA bildet Gelsolin eine kompakte Struktur aus, in der möglicherweise die Actinbindestellen durch interne Domänenkontakte und einer C-terminalen *latch*-Helix maskiert sind. I: Durch Bindung von Calcium an G6 werden Salzbrücken zwischen G2 und G6 aufgelöst und die F-Actinbindestelle an G2 exponiert. Bindung von Calcium an G5 stimuliert weitere Bewegungen, die zu einer vollständigen Aktivierung führen. II: Das aktivierte Gelsolin vollzieht eine Konformations-änderung, die eine Bindung von G2 an zwei longitudinal-benachbarte Actinuntereinheiten des Filaments möglich macht. III: Nach der Bindung von G2 wird G1 an das Filament angelagert. Typ 1 Calciumionen binden in der Gegenwart von Actin an G1 und G4. IV-V: Die Fragmentation und die Ausbildung der Kappe vollziehen sich unter Bindung von G4 an Actin. Gelsolin verbleibt nach dem Schneiden als Kappe und schützt das Filament vor der Addition von Monomeren. Die meisten Modelle plazieren G4 auf der Actinuntereinheit 2 (VI a), aber auch die Actinuntereinheit 4 (VI b) ist nahe genug um G4 zu binden. VI-VII: Die Bindung von PIP₂ im Bereich zwischen G1 und G2 befreit das Filament von Gelsolin (aus McGough et al, 2003, modifiziert). (B) Die möglichen Modi der Ausbildung einer Kappe am Plusende des Filaments nach der Fragmentation. 1: nach A (VIa) G1 (blauviolett) ist an die terminale Untereinheit des Actinfilaments (gelb, 1) angedockt, G4-G6 liegen auf der Untereinheit 2 (grau) des Actins (aus McGough et al, 2003, modifiziert) 2: Im alternativen Model bindet G4 an Untereinheit 4 des Actinfilaments (aus Burtneck *et al.*, 2004, modifiziert).

Es gibt zwei grundsätzliche Möglichkeiten, die zur Entfernung der Kappe führen: 1) Die Affinität von Gelsolin zu Phospholipiden könnte höher als die zu Actin sein, wie es bereits für andere Actin-bindende Proteine gezeigt werden konnte. In Konkurrenz um Bindung wird Gelsolin von Actin sequestriert. 2) Die Bindung von Phospholipiden erzeugt eine Konformations-modifikation im Gelsolinmolekül, die zur Destabilisierung der Gelsolin-Actin Interaktion führt (Xiang & Janmey, 2002; Yin & Janmey, 2003).

2.5.2 Die vielseitigen Funktionen von Gelsolin

Gelsolin ist in Geweben von Vertebraten als auch Invertebraten lokalisiert, wobei für Vertebratengelsoline cytoplasmatische und eine sekretorische Varianten nachgewiesen wurden (Nodes *et al.* 1987; Kwiatkowski, 1988). Das Plasmagelsolin wird hauptsächlich von Muskelgewebe gebildet (Nodes *et al.*, 1987; Kwiatkowski *et al.*, 1988). Beide Isoformen werden von einem Gen codiert und alternativ gespleisst (Kwiatkowski *et al.*, 1986) und besitzen funktionell gleiche Eigenschaften. Die sekretorische Isoform besitzt eine N-terminale Extension, die beim Menschen aus 25 zusätzlichen Aminosäuren besteht (Kwiatkowski *et al.*, 1988). Es wird angenommen, dass diese Isoform bei Vertebraten filamentöses Actin aus beschädigten Zellen fragmentiert und somit die Viskosität der extrazellulären Flüssigkeit reguliert (Haddad *et al.*, 1990). Im Plasma begünstigen die physiologischen Bedingungen Elongationen von Actinfilamenten (Burtnick *et al.*, 1997), die eine Erhöhung der Viskosität des Blutes zur Folge haben und dann möglicherweise auch Kapillaren verstopfen könnten, was vermutlich durch Funktionen des Plasmagelsolins verhindert wird. Weitere Untersuchungen zeigen auch, dass sezerniertes Gelsolin als Lipid-Carrier Protein fungieren könnte, da es in der Lage ist Lysophosphatidylsäure effektiv zu binden (Meerschaert *et al.*, 1998).

Die actinhaltigen Strukturen in Zellen zeigen eine hohe Dynamik, welche durch extrazelluläre Signale beeinflusst werden (Yin *et al.*, 1999). Die Aktivität von Gelsolin während zellulärer Bewegungen und der cytoskeletalen Reorganisationen (Sun *et al.*, 1999) wird vielfach reguliert: nach einer Fragmentation kann Gelsolin durch saure Phosphoinositide sequestriert und in einem inaktiven Stadium an der Zellmembran, verankert werden. Das gebundene Aktin wird möglicherweise durch Konkurrenz (s.o) verdrängt und Gelsolin somit zurück in einen reaktivierbaren Zustand überführt. Calcium aktiviert erneut freies Gelsolin und es ist dann ermöglicht Aktinfilamente zu schneiden und zu blockieren. Es wurde beobachtet, dass Actinfilamente PIP₂ reicher Membranen ungecappt bleiben, was eine weitergehende Aktinpolymerisation ermöglicht (Janmey & Stössel, 1987;

Yin & Janmey, 2003). Durch die Inhibition von Gelsolin durch Phosphatidylinositide wird folglich selektives Wachstum von Aktinfilamenten ermöglicht. Es ist dabei aber unklar, ob die nukleationsfördernde Eigenschaft von Gelsolin physiologisch von Bedeutung ist. In diesem Zusammenhang konnte aktuell gezeigt werden, dass Gelsolin auch mit actin-ungebundenem Calponin interagiert. Die Ausbildung von 2:1 Komplexen führt zur Reduktion der Nucleationsaktivität um 50% bei gleichzeitiger Erhaltung der vollen Fragmentationsaktivität (Fattoum *et al.*, 2006). Die Bedeutung der Gelsolin-Aktivitäten variiert in unterschiedlicher Zelltypen. Die Aktivierung von Blutplättchen initiiert beispielsweise die Freisetzung von Gelsolin über eine kontinuierliche Erhöhung der PIP₂-Hydrolyse, begleitet von der erhöhten Freisetzung von Calciumionen, was zur Fragmentation von Filamenten führt (Hartwig *et al.*, 1995).

Eine Motilität am Leitsaum einer Zelle kann mittels Hydrolyse von PIP₂ durch die Phospholipase C, damit vermittelter Freisetzung von Gelsolin und resultierender Filamentfragmentierung beschleunigt werden (Chou *et al.*, 2002). Die Hydrolyse der Phosphoinositide führt ebenfalls zur Aktivierung weiterer Actin-bindender Proteine, wie beispielsweise Cofilin und Profilin, woraus eine Erhöhung des Actin *turnovers* resultiert. Bindungsstellen für die Phosphoinositide wurden sowohl in C-terminalen (Feng *et al.*, 2001), als auch in N-terminalen Regionen des Gelsolinmoleküls ermittelt (Janmey und Stössel 1987), wobei es simultan zwischen ein bis drei PIP₂s in Lipidvesikeln binden kann. Diese Bindungen werden nicht nur durch modale Kompositionen (Flanagan *et al.*, 1997) und Geometrien der Doppellipidschicht diktiert (Tuominen *et al.*, 1999), sondern auch durch die Calcium- und pH-Wert abhängige Konformation und dem damit verbundenen Affinitätswechsel von Gelsolin. Der Actinmodulator wird durch saure Phospholipide reguliert, moduliert selbst aber auch den Metabolismus der Lipide, was im weiteren einen Effekt auf die Mitogenität der gesamten Zelle hat (Yin, 1988). Der Einfluss von Gelsolin auf den Lipidmetabolismus zeigt sich durch den erhöhten Phospholipid *turnover* und durch selektive Effekte auf die Remodellierung von Inositollipiden durch Aktivierung von Phosphatidylinositol-Kinasen und Phospholipase D (Sun *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang steht auch die Vermittlung sequenzieller Schritte des Imports von Kollagen (Arora *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die calciumabhängige Fragmentation die Bindungsschritte bei der Kollagenphagozytose beschleunigt, auf der anderen Seite ist die PIP₂ abhängige Regulation der Gelsolinaktivität wichtig, da eine Aktinassemblierung für die Internalisierung von Kollagen benötigt wird.

Für glatte Muskelzellen wird eine direkte Beeinflussung der Calciumsensitivität der Actomyosin ATPase durch Gelsolin diskutiert (Teubner *et al.*, 1994; Gusev *et al.*, 1994), indem die Caldesmon-Inhibition reduziert wird. Gelsolin hat demnach einen positiven Effekt auf die Fähigkeit von Calmodulin, die Inhibierung der Actin-aktivierten Myosin ATPase durch Caldesmon aufzuheben (Gusev *et al.*, 1994). Gelsolin aktiviert *in vitro* die Actomyosin-ATPase durch Verkürzung der Actinfilamente (Gailly *et al.*, 1990). Gelsolin aus der Aorta von *bos tauris* verstärkt in der Gegenwart von Tropomyosin die Actin-aktivierten MyosinATPase durch die Verkürzung von F-Actin um das Vielfache (Ebisawa & Nonomura, 1985).

Gelsolin ist nicht nur an der Regulation der Zellmotilität beteiligt, es zeigt auch seine vielgesichtige Rolle durch antiapoptotische Aktivität. Die Domänen G4-G6 können die spannungsabhängigen Anionenkanäle blockieren und somit den Verlust des mitochondriale Membranpotentials, was zu einem weiteren sukzessiven CytochromC Verlust führt, inhibieren (Furukawa *et al.* 1997, Kusano *et al.* 2000). Das modulare Gelsolinmolekül besitzt zwei „Tandem“-homologe Seiten, der G1-G3 Komplex, welcher als unabhängiges N-terminales Fragment während der Apoptose durch Caspasen aus dem intakten Protein gespalten wird zeigt calciumunabhängige Fragmentationsaktivität (Janmey & Stossel, 1987; Kothakota *et al.* 1997; Azuma *et al.*, 2000) und andererseits somit auch apoptosefördernde Funktionen. Dass Krebszellen, die eine erniedrigte apoptoserate aufweisen, auch eine verringerte Gelsolin Expression zeigen, unterstützt die These der proapoptotischen Wirkung von Gelsolin (Kwiatkowski, 1999). Die Expression von Gelsolin wird bei der Carcinogenese um 60-90% herunterreguliert (Kuzumaki *et al.*, 1998). Die Bedeutung von Gelsolin in Zellen wurde auch nach Untersuchungen von Gelsolin-„knockout“ Mäusen diskutiert, da diese ohne wesentliche phänotypische Defekte überleben. Für das Fehlen Gelsolins wurden kompensatorische Mechanismen vermutet (Witke *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1997; Azuma *et al.*, 1998). Dennoch konnte für perinatale Stadien Dispositionen bei motilen Zellen (Kwiatkowski *et al.* 1999), Modifikationen in der Rac stimulierten Signaltransduktion (Azuma *et al.*, 1998), reduzierte Neurit-retraktionen (Lu *et al.*, 1997) und es konnten Defekte in der Wundheilung festgestellt werden.

Neben der Modulation der Aktinfilamentnetzwerke wurde die Bedeutung von Gelsolin für weitere Prozesse verdeutlicht, dazu gehört beispielsweise die Herabregulation von Gelsolin während der Carcinogenese in vielen Geweben (Kwiatkowski *et al.*, 1999), als auch das Auslösen der Amyloidosekrankheit bei Mutation in seiner Nukleotidsequenz. Letztere resultiert in der Disposition von Amyloidproteinen, die zu neurologischen und

dermatologischen Schäden führt (Kiuru *et al.*, 1998). Lee *et al.* (1992) beschreibt das Zusammenspiel von sekretorischem Plasmagelsolin mit VitaminD-bindenden Protein, welches monomeres Actin komplexieren kann. Das regulative „*Actin Scavenger System*“ kontrolliert so die Viskosität des Blutes durch Fragmentation und Inhibition der Polymerisation des Aktins.

2.5.3 Lokalisation von Gelsolin

Elektronenmikroskopische Studien haben zeigen können, dass Gelsolin bei Makrophagen und Blutplättchen vorwiegend in der Peripherie der Zelle im Bereich des Kortex von Actinfilamenten vorliegt, wo es möglicherweise an Polyphosphoinosite gebunden wird (Hartwig *et al.*, 1989). Teubner *et al.* (1994) demonstrierten, das Gelsolin in den Zellen des Maus-Ovars für die Regulation des Actin-Cytoskeletts verantwortlich ist, wenn die Zellen beim Wachstum der Follikel verkleinert werden und die Mikrovilli sich verkürzen. In neuronalen Zellen konnte Gelsolin in Oligodendrocyten (Lena *et al.*, 1994; Tanaka & Sobue 1994; Vouyiouklis & Brophy, 1997) und am Wachstumskegel lokalisiert werden (Tanaka *et al.*, 1993). Gelsolin ist demzufolge nicht nur am dynamischen Umbau von Aktinstrukturen beteiligt, sondern auch möglicherweise initiierender Ausgangspunkt für die Bildung der Filamente. In diesem Zusammenhang wurde neben dem bekannten cytoplasmatischen Gelsolin eine mRNA identifiziert, die aus alternativem Splicing des gleichen Gens hervorgeht und möglicherweise eine weitere Isoform codiert (Vouyiouklis & Brophy, 1997). Die Sequenz dieser Variante enthält keine N-terminale Extension, die auf eine extrazelluläre Form deutet, daher wurde vermutet, dass es sich bei der Gelsolinisoform um eine cytoplasmatische Form handelt.

Von Gelsolin wird angenommen, es sei zellulär generell in actinreichen Regionen lokalisiert (Yin *et al.* 1981). An Mausfibroblasten wurde gezeigt, dass Gelsolin nicht ausschließlich an Actinfilamentebündeln assoziiert ist, sondern auch diffus im cytoplasmatischen Raum verteilt vorliegt (Cooper *et al.*, 1987, 1988). Dissmann und Hinssen (1994) zeigt andererseits, daß Gelsolin in Fibroblasten an Streßfasern gebunden vorliegt, während es in myogenen Zellen und an Skelettmuskelmyofibrillen hauptsächlich in den I-Z-I Regionen lokalisiert ist, letzteres wurde ebenfalls durch Lokalisationsstudien am Herzmuskel gezeigt (Rouayrenc *et al.*, 1984). Chaponnier *et al.* (1985) verwiesen ebenfalls auf eine diffuse cytoplasmatische Verteilung von Gelsolin in weißen Blutzellen, was zuvor auch für kultivierte Lymphzellen gezeigt wurde (Thorstensson *et al.*, 1982). Koloalationen von Gelsolin mit Actin wurden von einigen Autoren als

fixierungsbedingte Ergebnisse gedeutet, die *in situ* nur kurzzeitiger Natur seien. Eine eindeutige Immunlokalisierung in Vertebraten könnte demnach auch oft durch die hohe Konzentration (0,2 mg/ml) von Gelsolin im Serum beeinträchtigt worden sein (Kwiatkowski *et al* 1988b), was folglich zu fehlerhaften Folgerungen aus Annahmen einer Lokalisation entlang der Filamente permeabilisierter Zellen führe (Carron *et al.*, 1986). Hier wurde gezeigt, dass sich Gelsolin in Blutplättchen vorwiegend in der Zellperipherie befindet. Guttman *et al.* (2006) zeigte eine Kolokalisation von Gelsolin und Actin an ektoplasmatischen Bereichen von Sertolizellen. Einige Monate später wurden die Daten zur Lokalisation auf unspezifische Bindungen durch die Präsenz von Gelsolin in Blockpuffern zurückgeführt und reevaluiert (Guttman *et al.*, 2007). Andererseits wurde unter Ausschluss von xenogenem Gelsolin die Assoziation von Gelsolin an Actinfilamenten in Fibroblasten (Kanno & Sasaki, 1989) und im Bereich der I-Z-I Region im quergestreiften Vertebratenmuskel gezeigt (Dissman und Hinssen, 1994). Eine lichtmikroskopische Kolokalisation von Gelsolin und ähnlichen Proteinen mit Aktinfilamenten wurde für die glatte Muskulatur des Huhns (Gonsior & Hinssen, 1995), als auch für den glatten Teil von Adduktormuskeln aus Mollusken gezeigt (Remmert *et al*, 1999). Es scheint demnach im Muskel an Aktinfilamente zu binden, ohne sie zu schneiden.

Es bleibt folglich weiterhin umstritten, ob, wie und zu welchen Anteilen Gelsolin mit Actinfilamenten assoziiert ist und wie die Verteilung in Zellen vorliegt. Die vorliegende Arbeit widmet sich ausführlich dieser Problematik und erweitert die bisherigen Erkenntnisse durch immunelektronenmikroskopische Studien.

Andere Untersuchungen zur Lokalisationen von Proteinen der Gelsolinfamilie zeigen ein eindeutigeres Bild. Villin wurde in Mikrovilli mit Actin kolokalisiert nachgewiesen (Matsudeira *et al.*, 1992), Severin wurde hochkonzentriert am Leitsam von Dictyostelium (Brock und Pardee, 1985) ausgemacht. Fragmin liegt in den Plasmodien von *Physarum polycephalum* mit Actin kolokalisiert vor (Naib-Majani *et al.*, 1983; T'Jampens *et al.*, 1997), EWAM wurde in unterschiedlichen Geweben der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms ebenfalls mit Actin in Kolokalisation nachgewiesen (Krüger, Dissertation, Universität Düsseldorf, 2001).

2.5.4 Actinmodulatoren in Crustaceen

Actinmodulatoren konnten bereits in der Schwanzmuskulatur des amerikanischen Hummers (*Homarus americanus*) und des europäischen Flusskrebse (*Astacus fluviatilis*) identifiziert und aus ihnen isoliert werden (Bock *et al.*, 1994; Lück *et al.*, 1995). Die Modulatoren zeigen grundsätzlich Gelsolin-charakteristische Eigenschaften. Die beiden Proteine sind bei *Astacus* und *Homarus* offenbar fast identisch, ähnliche Befunde werden für Gelsoline aus verschiedenen Mammaliern gedeutet (Way & Weeds, 1988; Kwiatkowski *et al.*, 1996). Crustaceengelsoline unterscheiden sich von Vertebraten-Gelsolin durch eine niedrigere Affinität zu Aktin (Bock *et al.*, 1994). Unklarheit entsteht durch Daten, welche die Modulatoren mit drei G-Aktin Bindestellen ausweisen, da in Vertebratengelsolinen und anderen Actinmodulatoren nur zwei G-Aktin Bindestellen vorhanden sind. Die Hummergelsolin-Aktin Komplexe sind bei geringen Ca^{2+} Konzentrationen vollständig reversibel (Bock *et al.*, 1994).

Vergleichende Studien zur Fragmentationsaktivität von Crustaceengelsolinen und denen aus Vertebraten deuten auf eine geringere Aktivierungsschwelle durch Calcium bei den Invertebraten-Actin-Modulatoren (Hinssen *et al.*, 1986). Hinweise auf Abweichungen vom Laufverhalten in der SDS-PAGE ergaben sich aus der Aminosäuresequenz und damit auch die Zuordnung zur Gruppe der 80kDa Actin Modulatoren, apparente Molekulargewichte in der SDS-PAGE von über 100kDa erscheinen als Folge zahlreicher saurer Aminosäurereste (Lück *et al.*, 1995). Daten zur strukturellen Natur des Gelsolins aus Homariden ergaben sich durch limitierte Proteolyse, die resultierenden Spaltfragmenten, die mit Villin Spaltungen verglichen wurden, deuten auf deren evolutionäre Verwandtschaft.

Screenings mit einem polyclonalen (Crustaceen) Gelsolinantikörper ermöglichten die Synthese eines Klons aus einer cDNA Datenbank, die in einem λ -Expressionsvektor konstruiert wurde. Das cDNA *insert* wurde dann sequenziert. Durch Sequenzvergleiche mit Proteinen der Gelsolinfamilie zeigten sich starke Homologien zu Gelsolin aus *Drosophila*, menschlichem Gelsolin und Villin. Die Sequenz des Hummergelsolins enthält keine N-terminale Extension, die auf eine extrazelluläre Variante deutet, daher wurde vermutet, dass es sich bei dem Hummeraktinmodulator um eine cytoplasmatische Form handelt. Durch diese Vergleiche konnten auch Motive für eine PIP_2 -Bindestelle am N-Terminus aufgedeckt werden, die Aufklärung einer weiteren, kryptischen Bindestelle für Phospholipide im C-Terminus des Moleküls bleibt aufgrund einer Sequenzdisposition unklar. Das rekombinante, Gelsolin-artige Protein wurde in *E.coli* exprimiert und als

renaturiertes Protein mit native-isoliertem Gelsolin aus der Hummermuskulatur funktionell verglichen. Zwischen den Proteinen wurde dann kein signifikanter Unterschied im Bezug auf die biologische Aktivität ermittelt.

Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war zunächst geplant, durch unterschiedliche Methoden Klarheit darüber zu erlangen, welche Verteilung des Actinmodulators in den unterschiedlichen Muskeltypen des Hummers vorliegt. Durch immunologische Kreuzreaktionen eines Antikörpers mit einer mutmaßlich weiteren Variante wurde die Existenz von Isoformen impliziert. Die verschiedenen Muskelgewebe wurden dann hinsichtlich unterschiedlicher Expressionsmuster untersucht.

Um Unterschiede zwischen den Varianten zu ermitteln, wurde eine Methode zur nativen Aufreinigung der einzelnen Formen entwickelt und ein polyklonaler Antikörper gegen die neue Variante hergestellt. Durch limitierte Proteolyse der isolierten Modulatoren sollten die Spaltmuster vergleichend untersucht werden. Weiterhin war beabsichtigt, mittels massenspektroskopischer Analyse und nachfolgendem Sequenzvergleich die Existenz von Isoformen zu belegen. Biochemische Charakterisierungen und Bindungsstudien sollten darüber hinaus Vergleiche zwischen den Varianten und auch mit Daten anderer Actin Modulatoren ermöglichen. Damit liegt ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in einer detaillierten, vergleichenden Analyse der Eigenschaften von Actinmodulatoren aus Crustaceen, die im Gegensatz zu Vertebratengelsolin weitgehend ungeklärt sind.

Die Kolokalisation von Gelsolin und Actin ist umstritten. Mittels immunelektronenmikroskopischen Studien sollten die Gelsoline in unterschiedlichen Muskegeweben des Hummers nachgewiesen und die Verteilung eingehend analysiert werden. Es wird dabei erstmalig auf ultrastruktureller Ebene gezeigt, ob und zu welchen Anteilen Gelsolin mit Actin in quergestreiften Skelettmuskeln kolokalisiert ist. Die Lokalisationsexperimente sollten auch mit den immuncytochemischen Daten zur Existenz von Isoformen evaluiert werden und Aufschluss über isoformspezifische Verteilungsmuster vermitteln. Die unterschiedlichen Muskelfasertypen des Hummers sind bereits physiologisch und biochemisch gut untersuchte Modelle und können möglicherweise zusammen mit den Verteilungsmustern wesentliche Erkenntnisse über die Bedeutung der Isoformen und der Funktion von Gelsolin in quergestreiften Skelettmuskelzellen geben.

2 Material und Methode

2.1 Materialien

2.1.1 Bezugsquellen der Materialien

Laborchemikalien wurden in Analysequalität von Fluka, Roth, Gerbu, Serva oder Sigma bezogen. Elektronenmikroskopisches Material wurde von Aurion und Plano erworben. Andere Bezugsquellen wurden entsprechend vermerkt.

2.1.2 Bezugsquellen der Organismen

Lebende Exemplare des amerikanischen Hummers (*Hommarus americanus*) wurden entweder vom Großhandel Deutsche See, Bielefeld oder von Klötzer Feinkost, Bielefeld käuflich erworben. Zoea Larven des europäischen Hummers (*H.gammarus*) wurden von der Biologischen Anstalt Helgoland mitgebracht, Bestimmung und Einbettung der Stadien fand direkt vor Ort statt. Kaninchen wurden von Händlern und Züchtern aus Bielefeld erworben.

2.1.3 Protein-Molekularmassenstandards

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene Molekularmassenstandards verwendet. Der HMW (*high molekular weight*) 6H (Sigma) wurde am häufigsten eingesetzt und ermöglicht Zuordnungen im Bereich von 29 kDa bis 205 kDa. Aus laboreigenen Proteinen wurde ebenfalls ein Marker hergestellt und eingesetzt. Er enthielt die Proteine CapZ α_1 (36 kDa), Actin (42 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Gelsolin (81 kDa), α -Actinin (100 kDa), Vinculin (117 kDa), Metavinculin (125 kDa), Myosin-Schwere Kette-(205 kDa) und Filamin (280 kDa).

2.1.4 Protease-Inhibitoren

Inhibitor	Spezifität	Hersteller
Benzamidin	Serinproteasen	Applichem
Leupeptin	Cystein~und Serinproteasen	Applichem
Pepstatin A	Saure Proteasen	Applichem

PMSF (Phenylmethan- sulfonylchlorid)	Cystein~ und Serinproteasen (z.B.Trypsin, Chymotrypsin)	Fluka
TPCK (L-1-Chlor-3-(4- torsyl-amido)-4 phenyl-2-butanon)	Cystein~ und Serinproteasen (irreversibel α -Chymotrypsin)	Serva

2.1.5 Säulenmaterial

Produkt	Verwendung	Matrix	Eigenschaften	Hersteller
Fractogel [®] EMD TMAE 650	Anionen austauscher: Primäre Aufreinigung der Gelsoline (durch lineare KCl Gradienten)	Organische Copolymere mit hydrophober Oberfläche Tentakel: -CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ - (CH ₃) ₃ (KornØ:20-40µm)	Quaternärer Anionenaustauscher: Die Proteine werden an Tentakelgruppen gekoppelt. Die Affinität wird durch sukzessive Erhöhung der Salzkonzentration im Gradienten verringert	Merck
DEAE- Sepharose [®] CL-6B	Primäre Aufreinigung der Hummergelsoli ne (durch lineare KCl Gradienten)	6%Agarose Suspension mit kovalenten DEAE Gruppen (KornØ:50- 160µm)	Schwacher Anionenaustauscher: Proteine werden an die DEAE-Gruppen gebunden und durch Erhöhung der Salzkonzentrationen eluiert	Pharmacia (Healthcare)

ACA 44 Ultrogel	Präparative Gelfiltration: Sekundäre Aufreinigung der Gelsoline	Vorgequollene Suspension; Matrix aus 4% Acrylamid und 4 % Agarose (KornØ: 60-140 µm)	Hohe Auflösung bei Trennung globulärer Proteine bis 130 kDa	LKB
MonoQ™ HR 5/5	Peptid- und Isoformtrennung durch gestaffelten KCl-Gradienten	Vorgepackte Säule reaktive Gruppen: Tetraethyl- aminoethyl PartikelØ: 10 µm	Starker Anionenaustauscher	Pharmacia
Hydroxyl- appatit	Unspezifischer Ionenaustauscher Aufreinigung der Gelsolin- Isoformen	Aufreinigung Ca ²⁺ bindender Proteine (KornØ 20-80 µm)	Lineare ~PO ₄ ³⁻ Gradienten verdrängen durch Ca ²⁺ gebundene Proteine	BioRad
Sephadex G 150	Vorwiegend zur G-Actin Aufreinigung verwendet	Dextran vernetzt mit Epichlorhydrin (KornØ:40- 120µm)	Trennung von Proteinen bis 200 kDa	Pharmacia

2.2. Methoden

2.2.1 Proteinpräparationen

Alle wesentlichen Präparationsschritte wurden grundsätzlich durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und ggf. durch einen Immunblot kontrolliert.

2.2.1.1 Aufreinigung von G-Actin aus Skelettmuskel von Kaninchen

Konservierbares Muskelacetonpulver wurde aus der Skelettmuskulatur von Kaninchen nach der Methode von Spudich und Watt (1971) hergestellt. Für die Präparation wurden

ca. 600 g Muskel in Stücke geschnitten und im Fleischwolf weiter zerkleinert. Das Homogenat wurde in 3 Vol. Myosinextraktionspuffer aufgenommen und unter Kühlung 15 min gerührt. Anschließend wurde bei 5000g (GS-3, Sorvall) zentrifugiert, die Pellets in 2Vol. Extraktionspuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 8 Vol. H₂O_{dem.} resuspendiert und nach kurzem Rühren durch Gaze gefiltert. Der erhaltene Rückstand wurde in 8 Vol. 0,5 % NaHCO₃ aufgenommen, 15 min gerührt und erneut durch Gaze gefiltert. Der Vorgang wurde wiederholt und das Material durch kurze Zentrifugation bei 5000 g weiter kondensiert. Nach Gazefiltration mit 8 Vol. H₂O wurden die Rückstände in 5 Vol. Aceton aufgenommen und filtriert. Der Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Das erhaltene Material wurde auf Filterpapier unter dem Abzug (RT) ausgebreitet und getrocknet. Das Acetonpulver wurde dann zu 4g aliquotiert und bei -35 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Für die Präparation monomeren Actins wurden 4g Acetonpulver in 50 Vol. 5x G-Puffer im Kühlraum unter Rühren für 45 min extrahiert. Anschließend wurde 1h bei 100.000 g in einer Ultrazentrifuge (Rotor TFT 45.94, Beckmann) zentrifugiert. Durch Zugabe von 0,1 M KCl und 2 mM Mg₂Cl₂ wurde der Actin-haltige Überstand im Glaszylinder für 1 h polymerisiert. Danach wurde die KCl Konzentration auf 0,6 M erhöht um actinbindende Proteine wie Tropomyosin und Troponin zu dissoziieren. Es wurde dann für 3h und 20°C bei 100.000g zentrifugiert. Die einzelnen F-Actin Sedimente wurden im Kühlraum mit wenigen ml 5x G-Puffer überschichtet und zum Anlösen der Pellets für 1 h stehen gelassen. Dann wurden die Pellets in 20 ml 5x G-Puffer in einem Dounce-Homogenisator resuspendiert und zur vollständigen Depolymerisation gegen 3x 1L 2x G-Puffer unter Kühlung 3 Tage dialysiert.

Das Dialysat wurde abzentrifugiert, um es auf eine Sephadex G-150-Säule aufgetragen, die mit 2x G-Puffer zuvor äquilibriert wurde. Hierbei wurden Actin-bindende Proteine wie α -Actinin und Actin-Oligomere durch Gelfiltration entfernt (MacLean-Fletcher und Pollard, 1980). G-Actin enthaltende Fraktionen wurden gepoolt und durch Ultrafiltration in einer Amicon-Rührzelle (YM-10 Membran, Schleicher und Schüll) bei 1,3 bar auf ca 2 mg/ml ankonzentriert. Die Reinheit der aufkonzentrierten Actinprobe wurde durch SDS-Gelelektrophorese überprüft, das monomere Actin wurde bei 4°C gelagert und für Experimente innerhalb von 2 Wochen verwendet.

Myosinextraktionspuffer: 0,3M KCl, 15 mM EDTA, 150mM Phosphatpuffer, 3 mM ATP, 1 mM DTT, 1mM NaN₃ pH 6,5

5x G-Puffer: 0,2 mM CaCl₂, 2 mM NaN₃, 5 mM Tris-Cl, 1mM ATP, 2mM DTT, pH 8,2

2.2.1.2 Pyren-Actin

Proteine können an reaktive Sulfhydrylgruppen mit dem Fluoreszenzfarbstoff N-(1-Pyrenyl) iodoacetamid markiert werden (Weltman et al., 1973). Für fluorometrische Messungen wurde Pyrenactin freundlicherweise in der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Nach dem Verfahren von Kouyama und Mihashi (1981) wurde α -Actin aus der Kaninchenskelettmuskulatur über eine reaktive Thiolgruppe an Cystein³⁷⁴ mit dem fluoreszierenden Reagenz N-(1-Pyrenyl)-iodoacetamid gekoppelt. Anschließend wurde das markierte Actin lyophilisiert und bei -80°C gelagert. Zur Verwendung wurden Aliquots in 2x G-Puffer resuspendiert und bei $\sim 120.000\text{g}$ klarzentrifugiert.

2.2.1.3 Aufreinigung von Actomyosin (Lehmann & Scent-Gyorgyi, 1975)

Zur Bestimmung der calciumabhängigen ActomyosinATPase Aktivität wurde Actomyosin aus dem abdominalen *Flexormuskel* und parallel aus dem *Crusher closer* Muskel präpariert.

Je 30g Muskelgewebe wurde einem frisch getöteten Hummer entnommen, in kleine Stücke geschnitten und in einem handelsüblichen Küchenmixer für 30 sec. in 3 Vol. Waschpuffer homogenisiert. Durch mehrfache Zentrifugation und erneutes Resuspendieren wurden die Myofibrillen gewaschen. Das Actomyosin wurde in Gegenwart hoher Ionenstärke durch eine Extraktionslösung \bar{u}/N unter Agitation bei 4° extrahiert. Das unlösliche Material wurde durch kurze Zentrifugation (10min, 30.000g) entfernt. Das Actomyosinpräzipitat wurde dann erneut gewaschen und \bar{u}/N gegen 40 mM NaCl, 20mM Imidazol und 0,1 mM DTT (pH 7.0) dialysiert.

Waschpuffer: 40mM NaCl, 5mM Phosphatpuffer, 1mM MgCl_2 , 0,1mM DTT, pH 7,0

Extraktionspuffer: 0,6M NaCl, 5mM Phosphatpuffer, 1mM ATP, 0,1mM DTT pH 7,0

2.2.1.4 Aufreinigung von Gelsolin (Bock *et al.*, 1994, modifiziert)

Aus der quergestreiften Skelettmuskulatur des Hummers wurde Gelsolin nach einer modifizierten Methode von Bock et al. (1994) isoliert. Diese Methode lehnt an die native Extraktion von Gelsolinen aus dem Glattmuskel (Hinssen et al. 1984) an und wurde bezüglich der Trennung der Isoformen weiterentwickelt.

Frisch bezogene Hummer wurden für 1 h auf Eis sediert und per Durchtrennung des Unterschlundganglions getötet. Nach Entlassen der Hämolymphe wurde der Schwanzmuskel herauspräpariert, gewogen und in 5 Vol. kaltem Extraktionspuffer in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 5 mM Benzamidin, 1 μ M Leupeptin und 0,1 μ M Pepstatin A) in einem Küchenmixer homogenisiert und dann für 45 min unter Agitation bei 4°C weiter extrahiert. Das Homogenat wurde dann bei 35.000g für 1 h zentrifugiert. Das Supernatant wurde einer Ammoniumsulfatfällung bis 25 % unterzogen und bei 100.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bis 45% mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde auf Eis gelagert und der Überstand einem weiteren Fällungsschritt bis 85% Ammoniumsulfat unterzogen und abzentrifugiert. Die beiden erhaltenen Pellets wurden separat in DEAE-Startpuffer (150 mM KCl, 20mM Imidazol, 1 mM Mg_2Cl_2 , 1 mM EGTA, 1mM PMSF, 0,5 mM DTT, pH 7,6) resuspendiert und für 30 h mit 3 maligem Wechsel des DEAE-Puffers dialysiert. Für den letzten Dialysewechsel wurde dem DEAE Startpuffer 0,5 mM ATP zugefügt. Das Dialysat wurde für 1 h abzentrifugiert und auf eine DEAE-Fractogel-Anionenaustauschersäule (~150 ml Matrix, 3,2 $\text{cm}^2 \times 20$ cm) appliziert. Die Elution der Proteine erfolgte über einen linearen KCl-Gradienten in einem Zeitraum von 4h. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch eine SDS-Page analysiert, gesammelt und in einer Rührzelle auf 30 ml ankonzentriert. Zusätzlich wurden von Fraktionen viskosimetrische Aktivitätsbestimmungen vorgenommen.

Für die weitere Aufreinigung wurden die Proben auf eine ACA-44 Gelfiltrationssäule (~700 ml Matrix, 3,2 $\text{cm}^2 / 85\text{cm}$) aufgetragen und mit 30ml/h getrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Aktivität geprüft und einer SDS-PAGE unterzogen. Diese ersten beiden Aufreinigungsschritte wurden mit den beiden aus der Ammoniumsulfatfraktionierung erhaltenen Fällungsstufen separat durchgeführt. Die Fraktion bis 45% Ammoniumsulfat enthielt danach ausschließlich eine Gelsolinvariante (HG_2) und keine wesentlichen Verunreinigungen mehr. Die Fällungsstufe bis 85% Ammoniumsulfat zeigte vor allem Verunreinigung durch Hämocyanine. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und für 2,5 h bei 120.000g abzentrifugiert, um weitgehend Anteile von Hämocyanin zu pelletieren.

Die Feinaufreinigung und ebenfalls die Trennung zweier Gelsolinvarianten aus der Fällungsstufe 45-85% Ammoniumsulfat wurde an einer starken Anionenaustauschersäule MonoQ[®] HR 5/5 mittels HPLC (Pharmacia) durchgeführt. Dazu wurde ein gestaffelter KCl-Gradient (150-450 mM KCl, 0-50% in 10 ml, 50-75% in 35ml und 75-100% in

10ml) gefahren, die Proteine mit mit 1ml/min eluiert. Die Gelsolin-haltigen Proben wurden in einer Gelelektrophorese identifiziert, reine Fraktionen getrennt gesammelt und ankonzentriert.

Zur Lagerung bestimmte Gelsoline wurde mit 80% Ammoniumsulfat versetzt, abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung gelagert.

Gelsolin Extraktionspuffer: 20 mM KCl, 5mM EGTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 1mM Mg_2Cl_2 , 10 mM Imidazol, pH 6,7

DEAE-Startpuffer: 150 mM KCl, 20mM Imidazol, 1 mM Mg_2Cl_2 , 1 mM EGTA, 1mM PMSF, 0,5 mM DTT, pH 7,6

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Mikro-Biuret Proteinbestimmung (Goa, 1953, modifiziert)

Diese Methode stellt ein kolorimetrisches Nachweissystem für Substanzen mit zwei oder mehr Peptidbindungen dar. Gelöstes Biuret (Carbonylharnstoff) und Kupfersulfat erzeugen in alkalischer Lösung spezifische Farbreaktionen, die als rot-violette Komplexe sichtbar werden. Die Intensität des Komplexes kann photometrisch bei 550 nm detektiert werden und korreliert direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen.

Die Nachweisgrenze von Proteinkonzentrationen liegt bei 0,2 mg /ml, der Vorteil der Biuret Methode liegt aber in der hohen Spezifität und Reproduzierbarkeit. Die Anwesenheit von schwach reduzierenden oder stark oxidierenden Substanzen kann die Spezifität der Reaktion allerdings beeinflussen.

Die Extinktionsmessung wurde im Spectralphotometer (LKB Biochrom Ultrospec Plus) bei 550 nm gegen einen Referenzwert durchgeführt. Hierzu wurden 300 μ l Probe und 300 μ l 6% NaOH mit 30 μ l Biuret Reagenz versetzt, in einer Meßküvette vollständig gemischt und nach 30 min gemessen. Die Messwerte wurden mit dem Konversionsfaktor (7,4) multipliziert und die Proteinkonzentration in mg/ml ermittelt. Bei geringen Probenmengen wurde der Ansatz durch 50% Verdünnung des Probenvolumens mit H_2O gemessen.

Biuret Reagenz: 173g Na-Citrat, 100g Na_2CO_3 (in 500 ml H_2O), 17,3g $CuSO_4$ (in 100ml H_2O), ad 1 l

2.2.2.2 Bicinchoninsäure (BCA) Proteinbestimmung (Smith et al., 1985)

Diese Methode eignet sich zur Messung sehr geringer Proteinkonzentrationen (bis 0,1 µg Protein/ml). Daher wurde die Methode vor allem zur Messung von reinen Gelsolin Isoformen genutzt. Die sehr sensitive Methode ist allerdings gegenüber Chelatbildnern wie EDTA und Reduktionsmitteln wie DTT und Mercaptoethanol störanfällig. Die BCA-Methode stellt eine Kombination aus Biuret-Methode und Bicinchoninsäure als Nachweissystem dar, bei der Cu^{2+} zu einwertigen Kupferionen in alkalischer Lösung reduziert werden. Diese Ionen bilden dann mit BCA einen spezifischen Farbkomplex, der mittels Spectralphotometer bei 562 nm bestimmt wird.

Mit einem BSA-Standard (1mg/ml) wurden verschiedene BSA (Rinderserumalbumin)-Eichkonzentrationen hergestellt. Die Probe mit einem Endvolumen von 50 µl wurde zuerst mit 1ml frisch angesetzter BCA Lösung und 4% Kupfersulfat im Verhältnis 50:1 gut gemischt und für 30 min im Thermoschüttler bei 40°C erwärmt. Nach der Inkubation wurde die Extinktion gegen einen Leerwert (50 µl H_2O) gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe resultierte aus der parallel erstellten Eichgerade der BSA-Proben.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli., 1970, modifiziert)

Die verwendete, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekularmassen unter denaturierten Bedingungen. Dabei wird die Eigenladung der Proteine durch das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecylsulfate*) vollständig überdeckt, so dass konstante negative Ladungen pro Masseneinheit entstehen und die Proteine im Elektrophoresegel zur Anode wandern. Durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidnetzes erfolgt die Trennung ausschließlich nach dem Molekulargewicht. Dabei ist die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine in den SDS-Polyacrylamidgelen dem dekadischen Logarithmus ihrer Masse proportional.

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen wurden in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der darzustellenden Peptide verschiedene Geltypen hergestellt. Zur Trennung von Proteingemischen mit einem apparenten Molekulargewicht zwischen ~ 10 bis 300 kDa wurden 15 12,5%ige –Acrylamidgele mit einem B:A Verhältnis von 1:180 in einer Gießkammer synchron vorgegossen. Die Polymerisation wurde stets durch Ammoniumpersulfat induziert, TEMED (N, N, N', N'' Tetramethylethyldiamin) diente

dabei als Katalysator. Vor Beginn der Elektrophorese wurde dem Trenngel ein 5%iges Sammelgel zur Auftragung und Focussierung der Proben aufpolymerisiert.

Zur Denaturierung der Proteine für die SDS-PAGE wurden die Proben im Verhältnis 1:5 mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Diese Temperatur kann bei hochmolekularen Invertebratenproteinen wie Paramyosin zu Fragmentationen führen, gewährleistet aber eine vollständige Löslichkeit. In Ganzmuskelpollen kann es ebenfalls zu Gelierung durch DANN kommen, was durch Zugabe von Benzonase oder erneutes Kochen vor dem Probenauftrag aufgehoben wurde.

Die SDS-PAGE wurde in Plattengelen (75 x 110x 1 mm) bei einer Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Um eine möglichst präzise Auftrennung der Proteingemische zu gewährleisten, liefen die Proben zunächst bei 20 mA ein. Nachdem die entstehende Bromphenolblaubande das Sammelgel passiert hatte, wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Die Elektrophorese wurde nach ~2h beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande aus der Gelunterkante vollständig ausgelaufen war. Im Anschluss wurden die Gele in Coomassie-Blue-Färbelösung erhitzt und auf einem Schüttler bis zur gewünschten Intensität gefärbt. Eine diskrete Blaufärbung der Proteine wurde nach Behandlung mit Entfärberlösung sichtbar.

Weitaus sensitiver ist die Kollidalfärbung nach Molloy et al. (1999), bei der Proteinmengen bis 25 ng durch Inkubation ü/N sichtbar gemacht werden können. Zur Minimierung des Hintergrunds wurden die Gele dann in Wasser gewaschen.

Die Gele wurden dann am PC eingescannt und zur weiteren Aufbewahrung zwischen zwei Cellophanfolien luftgetrocknet.

SDS-Probenpuffer (5x): 0,3 M Tris-Cl pH 6,8, 10% SDS, 40% (v/v) β -Mercaptoethanol, 20mM EDTA, 20% (w/v) Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau

Elektrophorese-Laufpuffer: 190 mM Glycin, 25 mM Tris, pH 8,3

Färbelösung: 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure)

Kolloidale Färbelösung: 0,1% Coomassie blue-G 250, 17% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 34% Methanol, 3% (v/v) O-Phosphorsäure

Entfärberlösung: 10% Essigsäure 10% Isopropanol

Durch histochemische Färbung der Polyacrylamidgele mit der *Periodic Acid Schiff Reaktion* (PAS-Färbung) werden kohlenhydrathaltige Komponenten an glycolisierten Proteine nachgewiesen. Perjodsäuren des PAS-Reagenz oxidieren dabei freie Hydroxylgruppen zu Aldehyden, die dann mit Fuchsin aus dem Schiff-Reagenz rot-violette Komplexe bilden, die histologisch erscheinen. Im allgemein wird die PAS-Färbung für die Identifikation der in Polyacrylamidgelen getrennten Glycoproteine unter Anwesenheit von SDS verwendet.

Die Gele wurden ü/N in 40% Methanol, 10% Essigsäure (v/v) fixiert und am nächsten Tag 3x mit H₂O gewaschen. Dann folgte eine Inkubation der Gele für 3h in 0,7% Perjodsäure (w/v) und 3 Mal für 1h in 0,2 % Natriumbisulfid (w/v). Die Gele wurden dann in Fuchsinlösung gefärbt, bis die Banden sichtbar wurden.

2.2.2.4 Proteinblotting

Das „blotten“ von Protein mit anschließender Immundetektion wurde zum spezifischen Nachweis von Hummergelsolin und Actin eingesetzt. In Acrylamidgelen getrennte Proteingemische werden dazu durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (0,4µm Porengröße, Satorius) adsorbiert, wo sie kovalent gebunden werden.

Für den Transfer nach Khyse-Anderson (1984) wurde ein Sandwich auf die untere Anodenplatte des *semi-dry* Blotters wie folgt aufgeschichtet: zwei Filterpapiere in Lösung A getränkt, ein Filterpapier in Lösung B getränkt, auf die wurde die Nitrocellulosemembran plziert. Auf die Transfermembran wurde das Polyacrylamid-Gel gelegt und mit drei Filterpapieren (in Lösung C getränkt) abgedeckt. Die Anordnung wurde mit der oberen Graphitplatte abgedeckt, die als Kathode fungierte. Der Blotter wurde zur Kühlung mit einem Becherglas mit Eis beschwert. Der Transfer fand bei 150 mA (pro Gel) für 2h statt. Zur Prüfung des Transfers wurde die Membran mit Ponceau-S Lösung kurz gefärbt und durch Zugabe weniger Tropfen 2 M Tris wieder entfärbt.

Transferpuffer A: 300 mMTris, 20% Methanol pH 10,4

Transferpuffer B: 30 mMTris, 20% Methanol pH 10,4

Transferpuffer C: 25 mMTris, 20% Methanol, 40mM Aminohexanonsäure pH 9,2

Ponceau S Lösung: 0,3% Ponceau-S, 3% Trichloressigsäure, 3% Sulfosalicylsäure

2.2.2.5 Densitometrische Vermessungen

Für die Charakterisierung und quantitative Auswertung von Proteinkonzentrationen in Ganzmuskeln wurde die Densitometrie verwendet. Dazu wurde Proben von Ganzmuskeln mit aufgetreinigtem Protein elektrophoretisch synchron getrennt und ein Immunblot angefertigt. Der Blot wurde gescannt und die immundetektierten Banden mit Quantiscan (Biosoft, Cambridge) vermessen. Die Größe der Fläche wird durch Integralberechnung mit der Bandenstärke zu vergleichbaren Daten korreliert. Durch den Abgleich der ermittelten Daten aus Proteingemischen und dem referierenden, aufgereinigtem Protein ließ sich dann der relative Anteil von Proteinen ermitteln.

2.2.2.6 Viskosimitrie

Mit Hilfe der Ostwald Viskosimetrie lassen sich Veränderungen der Viskosität analysieren, die beispielsweise durch die Polymerisation von G~ zu F-Actin entstehen. Darüber hinaus können Einflüsse von Actinmodulatoren ermittelt werden, was im Rahmen dieser Arbeit für die Hummergelsolin untersucht wurde. Beispielsweise wird bei der Fragmentation der Filamente die hochviskose F-Actin-Lösung vom Gel in den Sol Zustand transformiert. Es wird dann die Zeit ermittelt, die eine Lösung zum Passieren zweier Markierungspunkte an einem Schenkel des U-förmigen Viskosimeters benötigt. Viskosimetrisch ist der Fragmentationseffekt dann durch die starke Erniedrigung der Durchflusszeit im Ostwald Viskosimeter erkennbar. Diese Methode wurde ebenfalls eingesetzt, um durch Fragmentationsmessungen Gelsolin-haltige Fraktionen während der Präparation zu identifizieren. Die spezifische Viskosität (η) kann nach folgender Formel ermittelt werden:

$$\eta = (T_p/T_k) - 1$$

T_p = Durchflusszeit der Probe

T_k = Durchflusszeit der H₂O Kontrolle

Für die relative Aktivität (A) gilt dann:

$$A = (\eta_p / \eta_R - 1) * 100$$

η_p = Spezifische Viskosität der Probe

η_R = Spezifische Viskosität des Ansatz ohne Modulator

Für die Durchführung wurden Viskosimeter (Cannon®) mit einem Analysevolumen von 1ml und einer Durchflusszeit von 27 sec. (für H₂O) verwendet. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

Zur Ermittlung der Fragmentationsaktivität von Gelsolin wurde 1mg G-Actin durch Zugabe von 70 mM KCL und 2 mM Mg₂Cl₂ in Anwesenheit von Actinpolymerisationspuffer (APB) auspolymerisiert und für min 1h bei RT stehen gelassen. Je nach Versuchsbedingungen wurden die Calciumkonzentrationen in den Ansätzen variiert. Nach vollständiger Polymerisation wurde die Probe (Gelsolin, 20µg) hinzugefügt, der Ansatz gemischt und nach 10 min. luftblasenfrei in das Viskosimeter überführt. Die Lösung wurde mit einem Schlauch über die obere Markierung gesaugt und die Zeit der Passage des Meniskus zur unteren Markierung gemessen. Als Kontrolle wurde polymerisiertes Actin verwendet.

Es wurden ebenfalls Messungen der Fragmentationsaktivitäten von Hummergelsolin bei distinkten Calciumkonzentrationen durchgeführt. Da die Dissoziationsraten von Calciummolekülen in Lösungen vergleichsweise hoch sind wurde ein Calcium-EGTA-Puffersystem etabliert. Das Puffersystem ermöglichte die Determinierung der freien Ca²⁺ Ionen, die mit Gelsolinen interagierten.

Analyse der calciumabhängigen Fragmentationseigenschaften:

Um die minimale Ca²⁺ Konzentration für die Aktivierung der Fragmentationseigenschaften von Gelsolin zu ermitteln wurde mit dem Programm Eqcal (Biosoft) ein Puffersystem hergestellt. Dabei stellen sich unter Berücksichtigung von ATP und Mg²⁺ bei der Mischung von EGTA und CaCl₂ distinkte Konzentrationen an freien Ca²⁺ Ionen ein.

CaCl ₂ (mM) + 1mM EGTA	Konzentration freier Ca ²⁺ Ionen
0,1	3,7 x 10 ⁻⁸ M
0,2	8,5 x 10 ⁻⁸ M
0,3	1,4 x 10 ⁻⁷ M
0,4	2,25 x 10 ⁻⁷ M
0,5	3,4 x 10 ⁻⁷ M

0,7	$7,8 \times 10^{-7} \text{ M}$
0,8	$1,3 \times 10^{-6} \text{ M}$
0,9	$2,7 \times 10^{-6} \text{ M}$
1,0	$9,8 \times 10^{-6} \text{ M}$
1,1	$3,4 \times 10^{-5} \text{ M}$

Für die calciumabhängigen Fragmentationsmessungen wurde Hummergelsolin in 100 μl des jeweiligen Puffersystems für 5 min inkubiert und einem F-Actinansatz hinzugefügt. Das verwendete G-Actin als auch Gelsolin wurde zuvor $\times 10$ gegen 2x G-Puffer ohne Calciumzusatz dialysiert. Die Polymerisation der G-Actin-haltigen Ansätze wurde in Gegenwart von 20 μM CaCl_2 vorgenommen. 15 min nach Zugabe des Gelsolins wurden die Ansätze viskosimetrisch untersucht.

Actinpolymerisationspuffer 1mM ATP, 10 mM Imidazol, pH 7,4

2.2.2.7 Fluorimetrie

Mit der fluorometrischen Analyse wurden nucleationsfördernde Eigenschaften von Gelsolin Isoformen auf die Actinpolymerisation, sowie deren Fragmentationraten von rekonstituierten Actinfilamenten ermittelt. Die Messungen wurden am Spektralphotometer (Shimadzu RF 5001) durchgeführt und resultierten durch die Änderung der Anregungs- und Emissionsspektren von Pyren konjugiertem g-Actin (2.2.1.2) zu Pyren markiertem F-Actin. Das Signal des C-terminal g-Actin gekoppelten, fluoreszierenden Reagenz N-(1-Pyrenyl)-iodoacetamid wird durch die Konformationsänderungen bei der Actinpolymerisation um den Faktor 22 verstärkt (Kouyama & Mihashi, 1981). Dieser Faktor ergibt sich bei einer Anregungswellenlänge von 365nm und einer Emissionswellenlänge von 407nm. Kontinuierliche Messungen geben dann Aufschluss über die Kinetik der Actinpolymerisation bei variablen Bedingungen, als auch bei Anwesenheit von Actinmodulatoren. Konfigurationen der Messparameter wurden am PC durch die RF-5001 Steuerungssoftware (Labtime Version 2.0, Shimadzu) durchgeführt, erhaltene Ascii-Datensätze per MS-Office ausgewertet.

1) Nucleationsmessungen

Die Anlagerung von G-Actinmoleküle zur Bildung von Nucleationskeimen für die Filamentbildung ist der geschwindigkeitsbestimmende Prozess während der Actinpolymerisation. Gelsolin induziert an Actinmonomeren eine Konformationsänderung und begünstigt so die Nucleibildung, was zu beschleunigten Polymerisationsraten führt.

Um den Einfluss von Hummergelsolin auf die Actinpolymerisation zu untersuchen und die beiden Isoformen zu vergleichen wurden Assays mit verschiedenen molaren Verhältnissen von Actin und den Gelsolin-Isoformen angesetzt, es wurde ebenfalls bei unterschiedlichen Calciumbedingungen gemessen.

Reaktionsansatz für Nucleationsmessungen:

0,36 mg/ml Actin (8,6 μ M) in 2x G-Puffer

0,04 mg/ml Pyrenactin (0,95 μ M)

0,2 mM CaCl₂

1 mM ATP, 10mM Imidazol pH 7,4

70 mM KCL

Gelsolin-Isoformen (w/w mit Actin: 100:1, 250:1, 500:1, 1000:1)

Die Reaktionsansätze wurden zu je 2ml in Makro-Küvetten angesetzt. Jeder Ansatz wurde dann ohne KCL im Photometer auf 25°C temperiert und die Polymerisation durch Zugabe von KCL induziert. Die Messung verlief über 15 min, alle 5 sec. wurde ein Messpunkt registriert. Die Spaltbreite wurde auf 3nm Excitations- und 5nm Emissionsspalt definiert. Als Kontrolle wurde Actin ohne Modulatoren polymerisiert. Praeinkubation mit Gelsolinen über längere Zeiträume (1h) zeigten keine signifikanten Unterschiede auf den Polymerisationsverlauf.

2) Fragmentationsmessungen

Die Fragmentationsprozesse von Gelsolin lassen sich mit Hilfe der Fluorimetrie darstellen. Dazu wurde Pyren-markiertes F-Actin in Gegenwart von Gelsolin ü/N polymerisiert. Gelsolin verbleibt nach der Nucleationsbegünstigung an diesen Filamenten in Form einer Kappe, die am +-Ende assoziiert ist. Diese „gecappten“ Filamente depolymerisieren bei Verdünnung unterhalb der Kritischen Konzentration langsamer als ungecappte Filamente. Vorgecappte Filamente wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Gelsolinisofomen versetzt und unter die Kritische Konzentration des

Actins verdünnt. Die durch Fragmentation entstehende Anzahl kurzer Filamente, zeigt sich in einer beschleunigten Depolymerisation und damit resultierender, erniedrigter Fluoreszenzintensität. Die Depolymerisation führt zur Dissoziation von G-Actin aus den Actinfilamenten, bis final wieder annähernde Monomerbedingungen erreicht sind. Aus dem anfänglichen Abfall der Fluoreszenzintensität läßt sich dann durch Regression die Anzahl der Schnitte ermitteln. Aus dem Quotienten der Änderung der Fluoreszenzintensität von Probe und Kontrolle wird die Anzahl von Filamenten ermittelt und damit indirekt die Anzahl der Schnitte pro Filament bestimmt.

Reaktionsansatz für Fragmentationsmessungen:

0,36 mg/ml Actin (8,6 μ M) in 2x G-Puffer

0,04 mg/ml Pyrenactin (0,95 μ M)

1 mM ATP, 10mM Imidazol pH 7,4

100 mM KCL, 2mM Mg_2Cl_2

5,3 μ g Gelsolin-Isoform 1 (+ gleicher Ansatz mit I₂)

Der Ansatz wurde \bar{u} /N polymerisiert, je 20 μ g F-Actin entnommen und mit verschiedenen Gelsolinkonzentrationen (1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1: 500) für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 40 Vol. 2x G-Puffer verdünnt und die Depolymerisation der fragmentierten Actinfilamente gemessen. Die Depolymerisation ohne Gelsolinzusätze wurde als Kontrolle verwendet.

Die calciumabhängige Fragmentation von zwei Gelsolinvarianten wurde mit dem Calcium-EGTA-Puffersystem untersucht, um unterschiedliche Schwellenwerte durch Calciumaktivierung der einzelnen Formen zu ermitteln (2.2.2.6). Um etwaige Auswirkungen des Puffersystems auf F-Actin gebundene Calciumionen zu überprüfen, wurden Ansätze mit niedrigen und hohen Calciumkonzentrationen depolymerisiert. Dabei konnten kein signifikanter Einfluss des EGTA-Puffersystems auf die Depolymerisationskinetik gecappter Actinfilamente festgestellt werden. Da die Schwellenwerte für die Aktivierung der Isoformen parallel durch *assays* mit gleichen Bedingungen ermittelt wurden, konnten vergleichende Aussagen über Fragmentationsraten der Isoformen getroffen werden.

Analog zu den Nucleationsexperimenten wurden die Spaltbreiten (Exitations- und Emissionsspalt) auf 5 nm und 10 nm eingestellt, gemessen wurde über einen Zeitraum von 10 min mit Aufzeichnung eines Messpunktes pro Sekunde.

2.2.2.8 Ermittlung der ATPase-Aktivität von Actomyosin

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Actomyosin aus verschiedenen Muskelgeweben des Hummers wurde das aus der ATP-Hydrolyse freigesetzte Phosphat nach Fiske und Subbarrow über die Bildung von Molybdatkomplexen unter reduzierenden Bedingungen gemessen. Es sollte ermittelt werden, ob und bei welchen Schwellenwerten eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Actomyosin-ATPase aus verschiedenen Muskeltypen vorliegt.

Reaktionsansatz :

1 mg/ml Actomyosin

90 mM KCl

2mM MgCl_2

20mM Imidazol

30mM Calcium-EGTA-Puffersystem (siehe 2.2.2.6)

1mM ATP

Es wurde zunächst ein Cocktail aus dem Actomyosin, KCl, MgCl_2 , und Imidazol angesetzt. Die variablen Calciumkonzentrationen wurden vorgelegt, der Cocktail wurde auf die Messreihe mit Ansätzen von je 1ml Gesamtvolumen aliquotiert. Die Proben wurden dann auf 25°C thermostatisiert, die enzymatische Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet. Nach 5min wurde die Reaktion durch Zugabe von 5% TCA gestoppt. Mit einer Eppendorffzentrifuge wurden die Proben abzentrifugiert, um die entstandenen Proteinpräzipitate zu sedimentieren.

Von den Überständen wurde die Phosphatkonzentration bestimmt. Dazu wurden 0,5 ml Molybdatlösung und 0,5 ml Reduktionslösung mit 1ml Probe gemischt und die Extinktion bei 720nm photometrisch gemessen. Zur Berechnung der enzymatischen Aktivität wurden die ermittelten Konzentrationen in absolute Mengen (μM) umgerechnet.

Molybdatlösung: 100 mM Na_2MoO_4 , 2,6 N H_2SO_4

Reduktionslösung: 29 mM p-Aminophenolsulfat, 320mM NaHSO_3

2.2.2.9 Limitierte proteolytische Spaltung

Die limitierte proteolytische Spaltung stellt den Ausgangspunkt für die strukturelle und funktionelle Analyse von Proteinuntereinheiten dar. Spezifische Spaltstellen im

Hummergelsolin ermöglichen die Trennung einzelner Domänen, diese Spaltprodukte können dann präperativ durch nachfolgende Aufreinigungsverfahren isoliert und weiter charakterisiert werden. Zielsetzung war die Ermittlung proteolytischer Bedingungen zur Trennung der beiden Isoformen in die jeweilig C- und N-Terminale Hälfte.

Es wurden jeweils 250 µg Isoform (1 & 2) in Anwesenheit von 0,2 mM Calcium und EGTA dialysiert und analytisch mit α -Chymotrypsin gespalten. Die Konzentrationen von α -Chymotrypsin wurden variiert. Nach genauen Zeitintervallen (30sec - 15 min) wurde die Spaltung durch Zugabe eines Inhibitormix (1 mM PMSF, 1:100 (w/w) TPCK) gestoppt, die Proben in Probenpuffer gekocht und elektrophoretisch analysiert. Durch die Resultate der Spaltungsanalysen wurden analoge Spaltungen mit höheren Konzentrationen durchgeführt, die erhalten Peptide durch säulenchromatographische Verfahren aufgereinigt.

2.2.2.10 Chemische Quervernetzung

Proteininteraktionen können mit Hilfe quervernetzender Reagenzien nachgewiesen werden. EDC (1-Ethyl-3 [3-(Dimethylamino) propyl] carboimid) ist ein sogenannter *zero length cross linker*, der zwischen wechselwirkenden Proteinen kovalente Bindungen etabliert. Die Carboxylgruppen werden dabei aktiviert und mit primären Aminen verknüpft. In der vorliegenden Arbeit wurde EDC eingesetzt um Quervernetzungen von Gelsolin mit G-Actinen vorzunehmen. Dabei wurde ein Reaktionsansatz mit Gelsolin und Actin in einem molaren Verhältnis von 2:1 vorgelegt und nach 15 min ein Viertel des Volumens mit 20 mM EDC zugesetzt. Anschließend wurde für 2 h inkubiert und in regelmäßigen Zeitintervallen Proben entnommen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunblot ausgewertet. Als Kontrollen wurden die eingesetzten Proteine einzeln mit EDC versetzt und in der Analyse mitgeführt.

Reaktionsansatz für Quervernetzung:

10 mM Imidazol pH 7.0

0,5 mM CaCl₂

10 µM Gelsolin in 2x G-Puffer

5 µM G-Actin in 2x G-Puffer

2.2.2.11 Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF MS

Für die massenspektrometrischen Analysen wurden die eingesetzten Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proben wurden aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten und in 2x mit 500µl 0,1 % TFA, 60% Acetonitril vorgewaschen. Eppendorfgeläße überführt. Die Probenstücke wurden in den Gefäßen für 5min mit 50%igem Acetonitril entfärbt. Durch weitere Addition von 50% Acetonitril in 50mM Ammoniumcarbonatlösung wurden die Proben erneut für 30min bei RT gewaschen und in einer Speedvac getrocknet. Es wurden dann 0,1 µg sequenziergereinigtes Trypsin in 10mM Ammoniumcarbonat auf 15 mm³ Gel adsorbiert und die Proben bei 37 °C für 24h proteolytisch verdaut. Die Proben wurden bis zur Identifikation am MALDI bei -35 °C eingefroren.

Für die Analyse wurde je 1µl Probe mit 1µl kristalliner Matrix (in TCA-Puffer gesättigte α-Cyanohydroxizimtsäure) gemischt, auf einem *target* (Probenträger) eingetrocknet und am MALDI MS (Ultraflex, Bruker-Daltronics) gemessen. Als Referenz und Eichung des Gerätes wurde Rinderserumalbumin (BSA) mitgeführt. Die Messung erfolgt prinzipiell nach einem physikalischen Verfahren, welches freie Ionen entsprechend ihrem Verhältnis von Masse und Ladung (m/z) im Hochvakuum auftrennt und bestimmt. Die Bestimmung der Molekularmasse erfolgte durch ein Massenspektrometer. Im Hochvakuum werden die kristalline Matrix und kokristalisierte Proteine einem UV-Laserpuls ausgesetzt und so in die Gasphase überführt. Die Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt und fliegen durch einen Schlitz in eine feldfreie Vakuum Flugröhre, den Flugzeitanalysator (TOF). Die Ionen erreichen, durch unterschiedliche Massen/Ladungsverhältnisse bedingt, den Detektor nach unterschiedlichen Flugzeiten, die gemessen wurden. Das erhaltene Massenspektrum wurde dann mit dem Spektrum aus einem theoretischen Verdau der bekannten Hummergelsolin-Aminosäuresequenz (bez.unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durch das Program Biotoools (Bruker) abgeglichen und so übereinstimmende Peptide identifiziert werden konnten. Zur sukzessiven Abdeckung von Sequenzhomologien wurden Daten mehrere Messungen miteinander kombiniert.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung polyklonaler Gelsolin Antikörper

Zu Beginn der Arbeit lag in der Arbeitsgruppe ein polyklonaler Antikörper vor, der durch Immunisierung von Kaninchen gegen eine Variante (HG₁) erzeugt worden war. Dieser Antikörper kreuzreagierte in Immunblotanalysen von Hummermuskeln mit zwei distinkten Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 113 kDa (HG₁) und 116 kDa (HG₂). Um Unterschiede zwischen möglichen Gelsolinvarianten aufzudecken, wurde ein weiterer Antikörper gegen die leichtere, 113 kDa- Form hergestellt. Die Immunisierung von Kaninchen mit dem Antigen HG₂ wurde durch die Firma Pineda (Berlin) vorgenommen. Dazu wurde die Isoform aus Scherenmuskelgewebe eines Hummers isoliert (2.2.1.3). Um mögliche Verunreinigung mit der schwereren Form zu vermeiden und ein hohes Verhältnis zwischen Nitrocellulose und Proteinmenge zu erhalten, wurden die Proben SDS-Page in großen 12,5%-SDS-Gelen nochmals getrennt, auf Nitrocellulose transferiert und sorgfältig ausgeschnitten. Die antigenhaltige Nitrocellulose wurde mit flüssigem Stickstoff fein pulverisiert (Hinssen et al. 1987) und im physiologischen Puffer aufgenommen. Das Pulver mit ~0,5 mg reinem Antigen wurde für die subkutanen Injektionen in wenig CMF-PBS aufgenommen. Nach 60, 90, 120 und 150 Tagen wurde den Kaninchen erneut Antigen zum „boosten“ der Immunisierung appliziert.

2.2.3.2 Immunblotanalyse

Eine Immundetektion von Actin und Gelsolin-Isoformen während der Aufreinigungsverfahren und in verschiedenen Experimenten erfolgte durch spezifische primär und Sekundärantikörper. Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembranen (2.2.2.4) wurden sie unter langsamer Agitation für 1h mit einer Gelatine-Lösung abgesättigt, um unspezifische Bindungen an den immobilisierten Proteinen zu unterbinden. Im Anschluss wurde die Membran 3x in verdünnter Gelatine gewaschen und mit dem Primärantikörper in Gelatine für mindestens 1h inkubiert. Nach erneutem Waschen folgte die halbstündige Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der stets an alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war. Dann wurde erneut zwei Mal mit Gelatine-Lösung und einmal mit AP-Puffer gewaschen. Der AP-Puffer konditionierte den Blot für die anschließende Entwicklung mit Substratlösungen für die Phosphatase. Der kolorimetrische Nachweis erfolgte durch frisch angesetztes NBT und BCIP (je 0,1%) in

Form eines violetten Niederschlags auf der Membran. Die Entwicklung der Blots wurde durch Zugabe von 500 µl 1% Essigsäure beendet. Für die Dokumentation wurden die fertigen Blots am PC eingescannt.

TTBS-Lösung: 2mM Tris-Cl pH7.5, 50 mM NaCl, 0,05% (w/v) Tween 20

Sättigungslösung: 3% Gelatine (*cold-water-fish-gelantine*) in TTBS

Wasch~ Inkubationslösung: 0,5% Gelatine in TTBS

AP-Puffer: 50mM Tris, 50mM MgCl₂ pH 9,5

NBT-Lösung: 30 mg Nitroblautetrazolium in 1 ml 70% (v/v) Dimethylformamid (DMF)

BCIP-Lösung: 15 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat in 1 ml DMF

2.2.3.3 Bindungsspezifität und Titer der Seren

Die Antiseren gegen Gelsolin wurden nach Erhalt (60, 90, 120, 150 Tage nach Immunisierungsbeginn) charakterisiert (Towbin *et al.*, 1979). Nach Immunanalysen an Ganzmuskeln des Antigendonors und aufgereinigten Gelsolinproben wurden die Bindungsspezifität und die Titer der Seren evaluiert. Zusätzlich wurden mögliche Kreuzreaktionen der Seren durch Immunblotanalysen von Ganzmuskelproben und aufgereinigtem Protein ermittelt.

2.2.3.4 Affinitätsreinigung der polyklonalen Gelsolin Antikörper

1) Positive Affinitätsreinigung

Zur Aufreinigung der Antiseren wurde aufgereinigtes Protein in hoher Konzentration elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die erhaltenen Gelsolinbanden wurden dann ausgeschnitten und mit dreimaliger Wiederholung in PBS gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation des verdünnten Immuserums (1: 20 in PBS) für 2 Stunden an dem eigenen Antigen.

Die Elution der spezifisch adsorbierten Antikörper von der antigenhaltigen Nitrocellulose erfolgte durch kurzfristige Inkubation im sauren Mileu (pH 3,0). Einer raschen Stabilisierung des pH-Wertes durch Glycinzugabe folgte die erneute Inkubation. Der Vorgang wurde 5-10 fach mit einer Serumprobe an einem Antigenstreifen wiederholt, die Serumlösungen mit nichtadsorbierten Antikörpern verworfen.

Die Eluate wurden nach dem Erhalt sofort 1:5 in PBS verdünnt. Nach Abschluss der positiven Aufreinigung wurden alle Eluate *gepoolt* und über Nacht in 20x Volumen gegen PBS dialysiert. In einer Amiconrührzelle wurden die Antikörper auf ein Zehntel ihres

Ausgangsvolumens ankonzentriert, mit 2mM Natrumazid und 1mg/ml BSA versehen und nach Aliquotierung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2) Negative Aufreinigung

Die negative Aufreinigung von Antiseren erfolgt, um unspezifische Nebenreaktionen, die vorwiegend im unteren Molekularbereich festgestellt wurden, zu eliminieren. Dafür wurden Ganzmuskelproben elektrophoretisch getrennt und ebenfalls auf Nitrocellulose transferiert. Eine Immundetektion informierte über die Höhe und Lage des gewünschten Antigens, dieser Bereich wurde mit ebenfalls nichtreaktiven Bereichen ausgeschnitten. Nach Verdünnung des Immuserums erfolgte die Inkubation auf den gewaschenen Blotstreifen für 2 Stunden. Die Seren wurden abgenommen und die Blottstreifen in saurem Mileu für zehn Minuten inkubiert. Die erhaltenen, unspezifischen Antikörper wurden verworfen, der Blotstreifen drei Mal in PBS gewaschen und erneut mit den abgereicherten Seren inkubiert. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Die selektiv aufgereinigten Immuseren wurden auf Bindungsspezifität und Titer im Immunblot kontrolliert und mit dem originalen Immuseren verglichen. Für den weiteren Gebrauch wurden die aufgereinigten Immuseren in einer Amiconrührzelle ankonzentriert, so dass sie für mikroskopische Präparate 1: 50 und im Westernblot 1:100 verwendet werden konnten.

3) Kreuzaufreinigung

Aus den Immunblotanalysen mit hohen Verdünnungsstufen zeigte sich eine geringere Bindungsaffinität zu HG_1 Antigenen, als zur leichteren Variante. Um diese vollständig aus dem Immuserum zu eliminieren wurde Versuche unternommen, das erhaltene Serum gegen HG_1 aufzureinigen. Konsequenterweise sollten nach wiederholter Aufreinigung mit dem inkubierten Serum Antikörper verbleiben, welche spezifisch gegen das Antigen HG_2 gerichtet sind. Die Immunblottaufreinigungen wurde mehrfach wiederholt, führten aber nicht zur Gewinnung spezifischer IgG-Fractionen. Ebenfalls durch Kopplung größerer Mengen von nativer Variante 1 an eine CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia) und nachfolgender Aufreinigung konnten keine isoformspezifischen Antikörper gewonnen werden. Die Aufreinigungsresultate implizierten folglich hohe Sequenz- und Strukturhomologien zwischen den beiden *Isoformen*.

2.2.4 Lichtmikroskopische Methoden

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde an zwei Einrichtungen durchgeführt:

1) Allgemeine Auswertungen von Präparaten wurden mit einem Olympus BH2 Fluoreszenzmikroskop (OM System/ Fluoreszenzfilter) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer gekühlten Hamamatsu CCD Kamera mittels zugehörigem Argus 20 Bildprozessor und einer Hamamatsu HPD-CP Steuerungssoftware (Version 2.1.3) angefertigt.

2) An (1) geprüfte und für weitere Analysen ausgewiesene Präparate wurden am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica TCS SP2) durchgeführt. Optische Schnittserien wurden angefertigt und mit Carl Zeiss AIM Software, sowie gängiger Bildbearbeitung Software (Photoshop, Illustrator (Adobe), Photomatrix) bearbeitet.

2.2.4.1 Herstellung von Kryoschnitten

Frisch entnommenes Muskelgewebe wurde kurz in eiskalter Ringer Lösung gewaschen und auf eine Größe von ca. $0,7 \text{ cm}^3$ getrimmt. Die Proben wurden auf eine plane, runde Korkscheibe transferiert, die zuvor mit einem Filterpapier beschickt worden war. Die Präparate wurden mit Abdeckmedium (Tissue-Tek, Sakura) vollständig versiegelt und in flüssigem Propan eingefroren. Danach wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingelagert.

Aus den Geweblöcken wurde am Gefriermikrotom (Frigocut 2800, Reichert und Jung) bei $\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ maximal $3 \mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt. Für longitudinal orientierte Schnitte ist diese Schnittdicke erheblich, da sonst bei der Betrachtung am Lichtmikroskop myofibrilläre Banden möglicherweise interferieren und Fluoreszenzsignale nicht eindeutig zugewiesen werden können. Die auf Objektträgern transferierten Kryoschnitte wurden für 15min in 4% PFA (Paraformaldehyd) in PBS fixiert, das Fixativ durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Ringer Lösung: 472 mM NaCl, 10 mM KCl, 16 mM CaCl_2 , 7 mM MgCl_2 , 10mM Tris-HCl, 10mM Maleinsäure, 12,5 mM Glucose, pH 7,4

PBS 140 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 0,01 % (w/v) NaN_3 , pH 7.4

2.2.4.2 Präparation von Myofibrillen

Einem frisch getötetem Hummer wurde die Brechschere entnommen basal eröffnet, die Hämolymphe entfernt und ein Gummistopfen so eingefügt, dass der Muskelus adductor dactylopoditis expandiert wurde. Die Schere wurde für 3 Tage in Glycerinlösung bei -35°C eingefroren. Muskelfaserbündel des Schließmuskels wurden dann entnommen und in Myofibrillenpuffer zur Entfernung des Glycerins unter Agitation mehrfach gewaschen. Mit einem Ultraturax (Ika) wurden die Muskelstückchen bei mittlerer Umdrehungszahl für 30 sec homogenisiert, und bei 3500 RPM für 10 min zentrifugiert. Das Sediment der Zentrifugation wurde erneut mit 10 Volumen Myofibrillenpuffer resuspendiert, der Vorgang wiederholt. Durch lichtmikroskopische Kontrollen wurde der Reinigungsprozess überwacht und eine für Färbeversuche adäquate Verdünnung eingestellt. Frisch isolierte Myofibrillen wurden zum Absetzen auf Chromschwefelsäure-gereinigte Deckgläschen für 15-30 min belassen mit 4% PFA in PBS für 30 min fixiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Der Aufreinigungsvorgang wurde analog mit expandiertem und glyceriniertem Muskelgewebe aus weiteren Tagmata von Hummern durchgeführt.

Glycerinlösung 100mM KCl, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, 1mM DTT 10 mM Imidazol pH 7.0, 50% Glycerin

Myofibrillenpuffer 100 mM KCL, 2mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 10mM Imidazol pH 7.0

2.2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz Mikroskopie

Um Lokalisationsstudien an lichtmikroskopischen Präparaten durchzuführen, wurde die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Das Prinzip beruht auf einer zweistufigen Antigen-Antikörperreaktion, bei dem ein Primärantikörper Epitope des Antigens im Präparat erkennt und selbst durch einen nachfolgenden, fluorochromgekoppelten Zweitantikörper gebunden wird. Die Emission angeregter, konjugierten Fluorochrome ergibt folglich indirekt Auskunft zur Lokalisation markierter Strukturen.

Nach dem Waschen der für Immunfluoreszenz vorgesehenen Proben wurden die Präparate für 15min mit Blockierlösung (3% *cold water fish gelatine*, CWSG) inkubiert. Im Anschluß folgte eine einstündige Inkubation mit einem Erstantikörper in 0,3% CWSG-PBS. Immunsereen und verschiedenartig affinitäts-aufgereinigte Hummergelsolin Antikörper (HG_{1, 2}) wurden als Primärantikörper verwendet. Nach zweifachem Waschen

in 0,3% CWSG-PBS folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:100 in 0,3% CWSG-PBS) für 30 min, nachdem die Präparate ebenfalls mit PBS gewaschen wurden.

Die Fluoreszenzen dieser Präparate wurden als signifikant erachtet, wenn mitgeführte Präparate, die nur mit dem Zweitantikörper inkubiert wurden, keine Fluoreszenz zeigten. Das Ausbleiben von Fluoreszenzen dieser Präparate verifiziert somit die Spezifität der Antigen-Antikörper Reaktionen aus den Immunfärbungen.

Parallel wurden ebenfalls Präparate mit Rhodamin Phalloidin (Sigma) markiert. Phalloidin ist ein Alkaloid aus dem Knollenblätterpilz *Amanita phalloides*, das hochaffin an filamentöses Actin bindet. Das an Fluorochrome gekoppelte Phallotoxin wurde in einer Verdünnung von 1:100 in PBS auf die lichtmikroskopischen Präparate appliziert und Überschüsse durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Nach Abschluss der Immunfärbungen wurden die Präparate in einem Einbettungsmedium (Moviol 488, Hoechst) mit Bleichschutz (n-Propylgallat, Sigma) eingedeckt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Blockierlösung, CWSG: 3% (v/v) *cold water fish skin gelatine* in PBS

AK-Inkubationslösung: 0,3% (v/v) CWSG in PBS

Fixativ: 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS

Einbettungsmedium: 1 Teil N-Propylgallat und drei Teile Moviol

Bleichschutz N-Propylgallat: 2,5g N-Propylgallat in 50 ml PBS bei RT lösen, pH 7,0, mit 50 ml Glycerin versetzen, ü/N rühren, bei 4°C dunkel lagern

Moviol-Einbettung: 20g Moviol in 80ml PBS bei RT lösen, 40ml Glycerin zugeben und Ü/N rühren, abzentrifugieren, bei 4°C lagern

2.2.5 Elektronenmikroskopie

Die colloidale Gold Markierungstechnik wurde erstmalig von Faulk und Taylor (1971) eingeführt, indem sie anti-Salmonella Kaninchen γ -Globuline im ersten Schritt an Gold Partikel adsorbierten und dann das Salmonella Antigen lokalisierten. Die indirekte *Labelling*-Technik mit Gold-Proben wurde dann von Romano et al. (1974) beschrieben, der ebenfalls Gold an Protein A für die Ermittlung primärer Immunoglobuline gebunden hat. Analog dem Prinzip aus der indirekten Immunfluoreszenz basiert die Immunogold Technik zur Lokalisation von Makromolekülen auch auf der Antigen-Antikörper Reaktion. An den verwendeten Sekundärantikörpern wurden Goldpartikel (anstatt eines Fluorochroms) mit variabel herstellbaren Durchmessern konjugiert. Am Elektronen-

mikroskop können die meist wenige Nanometer großen Partikel aufgrund ihrer Form und Elektronendichte eindeutig ausgemacht und zugeordnet werden. Wenn das Auflösungsvermögen lichtmikroskopische Analysen limitiert, können elektronenmikroskopische Studien mit kombinierten Immunlokalisationen detaillierte Aussagen unter subzellulärem Niveau ermöglichen.

Alle elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden am Phillips CM 100 bei 80kV durchgeführt.

2.2.5.1 Herstellung und Bedampfung des Trägermaterials

Zur Beschichtung der Probenträger (Grids) für die Elektronenmikroskopie wurden verschiedene Gridtypen eingesetzt. *Singel-Slot* Grids aus Kupfer wurden für die Bearbeitung von osmierten Eponproben, 100 Mesh Nickelnetzchen wurden für die Immunelektronenmikroskopie verwendet. In einer weitgehend staubfreien Umgebung wurden diese mit einem Kunststoffilm aus Formvar beschichtet. Zunächst wurden Glasobjektträger gründlich gereinigt und mit 3% Extran konditioniert. Staubfrei und trocken wurden diese dann in eine speziell umgebaute Nutsche mit 0,3% Formvar-Chloroform getaucht. Nach wenigen Sekunden wurde das Formvar über einen Pieleus-Ball gleichmäßig und zügig abgelassen. Das Vinylformaldehyd polymerisiert an der Luft rasch aus und bedeckt den Objektträger mit einem dünnen Film. Dieser wurde dann auf dem Objektträger entlang der Ränder mit einer Rasierklinge eingeschnitten und senkrecht in eine mit zweifach destilliertem Wasser gefüllten Glasschale getaucht. Von beiden Seiten des Objektträgers wurden die hydrophoben Filme auf der Wasseroberfläche abflottiert und die Grids auf den homogenen Formvarfilm dicht nebeneinander positioniert. Mit Parafilm wurden die belegten Formvarfilme von der Wasseroberfläche zum Trocknen in einer Petrischale abgenommen. Auf die Filme der Netzchen wurde in einer Balzer Bedampfungsanlage eine Kohleschicht vom Anodenstab durch eine angeregte Wolfram-Kathode in einem Vakuum von 4×10^{-6} mbar, 2400 V bei 90 mA aufgebracht. Je nach gewünschter Dicke der Schicht wurde die Bedampfung zwischen 3 und 5 Sekunden unter Beobachtung eines Kontrollfilterpapiers durchgeführt, woraus sich eine addierte Kohleschicht von 5-10 nm abschätzen ließ. Die Kohlebedampfung der Filme gewährleistet mechanische und thermische Stabilisierung und unterbindet chemische Wechselwirkungen mit *Negativ Stain* Lösungen.

Unmittelbar vor Verwendung der befilmten und carbonbedampften Grids wurde eine Beglimmung in einer evakuierten Vakuumkammer (10^{-1} Torr) bei einer Ionisierungsspannung von 500 V für 10 sec vorgenommen. Dabei wird der Trägerfilm hydrophilisiert und degrassiert, welches sich positiv auf die Aufnahme der Ultradünnschnitte in der Ultramikrotomie auswirkt und eine bessere Adsorption von applizierten Lösungen ermöglicht.

2.2.5.2 Probenpräparation für Elektronenmikroskopie

Um Analysen der Partikelzahlen auf den unterschiedlichen Banden von Sarkomeren der Hummerskelettmuskelzellen durchführen zu können, wurde eine Expandierung der Muskelpräparate vorgenommen. Nach der Sedierung des Tieres für eine Stunde auf Eis wurde das Unterschlundganglion durchtrennt und die Hämolymphe entlassen. Die dimorphen Scheren wurden entnommen, mit einem Bohrer wurde das sklerotisierte Chitinexoskelett der Scheren mehrfach punktiert. Durch Peristaltikpumpen und Schlauchverbindungen wurde über die Öffnungen die Hämolymphe herausgespült und die Scheren mit Ringerlösung für 1h auf Eis perfundiert. Um das Schließen der Scheren zu vermeiden und den Erhalt expandierter Sarkomere zu gewährleisten wurde dem Tier praemortem ein Gummistopfen zwischen die (Tarsus~) Klauen der Scheren zwischengefügt. Die Perfusion wurde dann mit Ringerlösung, die mit 4% PFA versetzt wurde, für 4h fortgesetzt. Die Scheren wurde nach der Fixierung von basal halbkreisförmig eröffnet und Muskelproben des Muskulus. adductor dactylopoditis (Scherenschließmuskel) mit einem Skalpell herausgetrennt.

Das Abdomen wurde ebenfalls entnommen und das Telson entfernt. Von proximal nach distal wurde je auf der dorsalen und ventralen Seite die Chitinkutikula medial eröffnet und das Abdomen so in zwei Längshälften separiert. Die Teilung ermöglichte eine Expandierung und nachfolgende Probenentnahme ohne Verletzung der Gefäße oder des anvisierten, abdominalen Muskelgewebes. Die beiden Hälften wurden auf Holzstäbchen gespannt, so dass in der abdominalen Muskulatur ein maximaler Kontraktionsgrad erreicht wurde, der dem Tier auch *in vivo* ermöglicht war. Die Hälften wurden dann vollständig für 1h in Ringerlösung bei 4°C expandiert, und analog wie Muskelproben aus den Scheren in 4% PFA-Ringerlösung fixiert. Die Fixative wurden nach 2h jeweils erneuert. Für allgemeine Übersichtspräparate wurde ein modifiziertes Karnovsky Fixativ verwendet, entnommene Proben wurden dann mit 1% Osmiumtetroxid postfixiert. Anschließend

wurden die entnommenen Muskelpräparate für die Elektronenmikroskopie per aufsteigenden Ethanolreihe nach Romeis (1989) entwässert.

Für die Einbettung der Proben wurden die Metacrylat Harze Lowikryl K4M, Unicryl und LR-White verwendet, die sich hinsichtlich guter Schneideeigenschaften bewährten. Sie sind sehr spröde und hebt Objekte für die Anlagerung von Antikörpern heraus, was durch hydrophile Eigenschaften begünstigt wird. Da sich hinsichtlich der Umweltgiftigkeit und des Einbettungsaufwandes große Unterschiede ergaben, die nicht durch beobachtete Ergebnisse nachfolgender Markierungsexperimente gerechtfertigt werden konnten, sind letztlich alle untersuchten Muskelproben routinemäßig in LRWhite eingebettet worden. Die Proben wurden in beem[®] Kapseln bei 4 °C durch UV-Strahlung in 48h auspolymerisiert.

In der Ultramikrotomie wurden die Blöckchen so getrimmt, dass longitudinale und transversale Orientierungen der Muskelproben erfasst wurden. Ausrichtungen der Faserorientierung wurden durch rasche Anfertigung und lichtmikroskopische Betrachtung von Richardson-blau gefärbten Semidünnschnitten kontrolliert. Es wurden dann Ultradünnschnittbänder mit silbergraue interferierenden Schnitten (~ 60nm Dicke) an einem Ultracut (Leitz) hergestellte und mit konditionierten Grids aufgenommen.

Ringerlösung: 472 mM NaCl, 10 mM KCl, 16 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, 10mM Maleinsäure, 12,5 mM Glucose, pH 7,4

Karnofsky Fixativ 3,5 % Glutaraldehyd, 2% PFA, 0,2 M Natriumcacodylat, pH 7,4

Richardson-blue Färbelösung: 1Teil 1% AzurII in H₂O & 1Teil 1% Methylenblau mit 1% Natriumtetraborat in H₂O

2.2.5.3 Immunmarkierungen von Ultradünnschnitten

Alle experimentellen Ansätze an Ultradünnschnitten erfolgten nach kurzer Trocknung immer auf Parafilm-beschichteten Glasplatten durch das sehr vorsichtige Aufbringen und Wechseln der Grids auf aufgetragenen Lösungstropfen (~40 µl). Die Ansätze wurden dann mit Petrischalen abgedeckt, um die Evaporationen zu minimieren. In jedem Fall wurden zunächst aus der Fixierung resultierende Aldehyde durch eine kurze Inkubation mit 50mM Glycin in PBS inaktiviert. Die Behandlung der Schnitte mit BSA-C und CWFG (Behnke *et al.*, 1986) erwies sich zur Minimierung unspezifischer Bindungen als sinnvoll. Die Schnitte wurden auf Tropfen von Blockierungslösung aufgebracht und für

30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit der Inkubationslösung wurden die Ultradünnschnitte mit dem Erstantikörper inkubiert. Es wurden verschiedene HG-Seren verwendet, die je nach Höhe des Antiserum Titers oder nach Affinitätsreinheit verdünnt wurden. Es wurden Serien mit unterschiedlichen Verdünnungen für jede Lokalisationsstudie durchgeführt, den spezifischen Eigenschaften der Primärantikörper wurden dann die Antikörperkonzentration und Inkubationszeiten angepasst. Die Grids wurden nach der Auswertung von Immunmarkierungen auf HG-Immuserumtropfen in einer 1:200 Verdünnungen (Inkubationspuffer) für 2h und auf Tropfen mit affinitätsgereinigten Antikörpern in einer 1:50 Verdünnung für mindestens 4h (oder bei 4°C, ü/N) bei RT inkubiert. Dann wurde erneut 3x 5min mit dem Inkubationspuffer gewaschen. Nachfolgend wurden Tropfen mit einem *goat anti rabbit* Sekundärantikörper (1:100) appliziert, an den 10nm Goldkörner konjugiert wurden. Es wurden ebenfalls Antikörper mit anderen Goldpartikelgrößen getestet, 1nm Gold wurde durch ein kommerziell erhältliches gold-enhancement set (Molekular Probes) auf ~20nm verstärkt. Es wurde 3x mit Inkubationspuffer unter Agitation und 2x mit H₂O_{bidest.} gewaschen. Nach dem Waschen wurde abschließend mit 3% Glutaraldehyd in PBS für 10 min postfixiert.

Blockierungslösung: 0,1% CWFG, 3% BSA (Aurion), 3% Rabbit-Serum

Inkubationslösung: 0,1% BSA-c, 20mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,4

2.2.5.4 Kontrastierung (modifiziert nach Reynolds, 1963)

Die Kontrastierung der Schnitte wurde manuell, als auch am EM Ultrastain (Leica) mit Uranylacetat und Bleicitrat durchgeführt. Alle Lösungen bzw. verwendetes Milliporwasser wurden durch Aufkochen entgast, um den Ausfall von Bleicarbonaten zu inhibieren. Der Kontrastierautomat wurde so programmiert, dass die Ultradünnschnitte für 20 min mit 0,5 %igem Uranylacetat bei 25°C und für 30 min bei 30°C mit Bleicitrat (kommerziell erworbene Lösung, Leica) kontrastiert wurden.

Für die Handkontrastierung wurden die Grids in eine Leica-Gridplatte geklemmt und für 10 min auf eine mit gasfreiem Milliporwasser gefüllten Petrischalendeckel (Ø3 cm) gelegt. Nach der Befeuchtung wurde die Vernetzung der Nucleinsäuren mit 8% Uranylacetat für 15 min bei RT vorgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit H₂O wurde die belegte Gridplatte für 10 Minuten auf frisch angesetzte Bleicitratlösung transferiert, dazugefügte NaOH Plättchen gewährleisteten eine CO₂ arme Atmosphäre. Es wurde abschließend 3x mit PBS und 2x in bidestilliertem Wasser gewaschen. Isolierte

Myofibrillen wurden auf Grids adsorbiert und mit Ammoniummolybdat gefärbt. Anschließend wurde mehrfach mit PBS und mit Milliporwasser gewaschen.

Nach der Trocknung der Grids über Nacht fand die Auswertung an einem Phillips CM 100 Transmissionselektronenmikroskop bei 80 kV statt.

Uranylacetatlösung: 4g Uranylacetat in 50ml H₂O_{bidest.} lösen, filtrieren

Bleicitratlösung: 30ml H₂O_{bidest.} mit 1,33g Bleicitrat und 1,76g Natriumcitrat (x2 H₂O) lösen, 8ml 1M NaOH zugeben und auf 50 ml auffüllen, in Spritzen bei 4°C lagern, bei weißem Niederschlag neu ansetzen

2.2.5.5 Elektronenmikroskopische Auswertungen

Für die Auswertung der Partikelzahlen wurden digitale Aufnahmen mit einer Keen View[®] Kamera und der zugehörigen Steuerungssoftware ANALYSIS[®] am Elektronenmikroskop angefertigt. Mittels ANALYSIS wurden ROI-Bereiche (*regions of interest*) innerhalb der Aufnahmen selektiert, beispielsweise wurde eine H-Zone umrandet und so als auszuwertender Bereich definiert. Im nächsten Schritt folgte die Festlegung der Schwellenwerte für die Partikelanzählung, die durch Binarisierung der Aufnahmen erfolgte. So konnten die Goldpartikel vom Untergrund abgehoben und markiert werden. Nach der Festlegung weiterer Parameter (Partikelfarbe, Durchmesser) wurde abschließend eine programmgestützte Auszählung durchgeführt. Die Partikeldetektion wurde visuell überprüft, in Bereichen starker Kontrastierung wurde ebenfalls von Hand gezählt. Die Daten wurden in Form von Partikelabundanz, also Partikelzahl pro Flächeneinheit (μm^2), ausgewiesen. Um die Verteilung der Goldpartikel in den Muskelzellen einheitlich zu quantifizieren wurde ROIs mit $1 \mu\text{m}^2$ Fläche definiert, sowie auch Partikelzahlen auf $1 \mu\text{m}^2$ Fläche interpoliert. Einige Präparate wurden zusätzlich *gerastert* und so die ermittelten Partikelzahlen den einzelnen Kompartimenten zugeordnet.

3 Ergebnisse

3.1 Biochemische Analyse von Gelsolin in verschiedenen Muskelgeweben von Crustaceen

Auf der Basis von strukturellen Kriterien und dem spezifischen Aufbau von Myofibrillen wurden die Muskeln von Crustaceen in der Vergangenheit in verschiedenen Studien klassifiziert. Die funktionellen Unterschiede der Fasertypen stehen dabei im direkten Zusammenhang mit dem Aufbau durch myofibrilläre Proteine, jeder Fasertyp zeigt eine charakteristische Zusammensetzung von strukturellen und regulatorischen Proteinen. Die Crustaceenmuskeln wurden grundsätzlich in schnelle und langsame Fasern eingeteilt. Die schnellen Fasern besitzen 2 strukturelle Paramyosin-Isoformen ($P_{1,2}$), dagegen weisen langsame Fasern nur eine Isoform (P_2) auf. Die langsamen Fasern werden weiter in S1~ (*slow-twitch*) und S2-Fasern (*slow-tonic*) differenziert. S2-Fasern besitzen eine zusätzliche Troponin- $T_{(1)}$ -Variante mit höherem Molekulargewicht gegenüber den üblichen Troponin- $T_{(2,3)}$ -Isoformen. Unterschiedliche, regulatorische Troponin-I-Varianten wurden ebenfalls identifiziert und der Fasertypisierung zugeordnet (Medler *et al.*, 2003). Die abdominalen Musculi obliqui anteriori wurden als schnelle kontrahierende, der Musculus ventrales superficiales abdominis als intermediär~ und der Musculus adductor dactylopodis aus der Brechschere als langsam-tonisch kontrahierende Fasern charakterisiert.

3.1.1 Identifizierung von Gelsolin in verschiedenen Muskelgeweben

Gelsolin wurde bereits aus der abdominalen Muskulatur von Crustaceen isoliert und biochemisch charakterisiert. In Immunblots wurden dabei zwei Gelsolinbanden angefärbt, die möglicherweise zwei verschiedene Isoformen repräsentieren. Um Aufschluss über die Existenz von Gelsolin und die Verteilung möglicher Isoformen zu erhalten, wurden quantitative Immunblots (2.2.2.4) von verschiedenen Muskelfasern des amerikanischen Hummers angefertigt.

Es wurden Proben aus frisch getötetem Hummern entnommen, homogenisiert und unmittelbar in 1% SDS gekocht. Nach einer Proteinbestimmung wurden die Ganzmuskelproben gleichmäßig in einer 12,5 %igen SDS-PAGE zu je 20 μ g

aufgetragen und getrennt (Abb.3.1.1 A). An den Coomassie-blau gefärbten Gelen wurden deutliche Unterschiede von schnellen und langsamen Fasern anhand der Molekulargewichte einzelner Proteine ermittelt. Es zeigten sich, besonders für den Molekularmassenbereich < 45 kDa distinkte Bandenkompositionen und Intensitäten.

Durch Immunblots von verschiedenen Muskelproben wurden grundsätzlich zwei Gelsolinbanden identifiziert, die sich anhand des apparenten Molekulargewichts unterscheiden (Abb.3.1.1 B). Mit abdominalen Muskelproben reagierte der anti Hummergelsolin Antikörper im Molekularmassenbereich von ~113 und 116 kDa. Die Immunreaktion wurde in den Musculi obliqui anteriori (*Flexor*-Muskel) vorwiegend auf der schwereren Bande von 116 kDa identifiziert. Dieses Muskelgewebe macht im Abdomen des Hummers den vergleichsweise größten Anteil aus. In den mengenmäßig geringer repräsentierten, abdominalen *Extensor*- und *Deep Extensor* Muskeln traten Immunreaktionen an den beiden Banden in annähernd gleicher Intensität auf.

Mit Muskelproben aus den Scheren (*Crusher*- und *Cutter Closer* Muskel) reagierte der Gelsolin Antikörper fast ausschließlich mit der unteren Bande. Auch in dem Musculus adductor meropoditis (Pleopoden) wurde vorwiegend eine Immunreaktion in diesem Molekularmassenbereich festgestellt. Die phylogenetisch homologen Scheren und Pleopoden besitzen langsam kontrahierende Muskelfasern.

Konkludent zeigte sich aus den Immunreaktionen eine weit höhere Konzentrationen einer leichteren Gelsolinvariante in Extremitäten und die einer schwereren Variante in den Muskelgeweben des Abdomens. Daraus resultierte die mögliche Existenz von zwei Isoformen mit unterschiedlichen Anteilen in verschiedenen Humtermuskeln. Eine leichtere Isoform könnte somit vorzugsweise den langsamen Fasertypen, eine schwerer Isoform den schnell kontrahierenden Muskelsystemen zugeordnet werden. Von dieser Annahme ausgehend wurde zunächst durch histochemische und immunologische Verfahren geprüft, ob die doppelten Gelsolinbanden auf post-translational modifiziertem Gelsolin basierte.

3.1.2 Nachweis von postranslationalen Modifikationen

Es wurden ebenfalls verschiedene Muskelproben elektrophoretisch analysiert, die zuvor für zwei Stunden bei RT inkubiert wurden. Es sollte dabei geklärt werden, ob es sich bei einer der Banden um ein Modifikationsprodukt durch Phosphorylierung handelte. Die Phosphatgruppen wären folglich in dieser Zeit abgebaut worden und der

Immunblot hätte sich signifikant von dem zügig verarbeiteten Material unterscheiden. Die Blots zeigten keinen Unterschied im Bezug auf die Intensität und Verteilung der Gelsolin-Isoformen. Einzelne Blotstreifen wurden dennoch zusätzlich mit verschiedenen Erstantikörpern (anti P-Thyrosin, anti P-Serin, anti P-Threonin, Sigma P3967, P3617, P3717) auf eine Phosphorylierung hin geprüft, erbrachten jedoch an Banden des Hummergelsolins keinen Befund (Abb.3.1.1 D). Damit wurde die Existenz einer der beiden identifizierten Banden als Folge einer Modifikation von Gelsolin durch Phosphate *in vivo* weitgehend ausgeschlossen.

Durch eine weiter SDS-PAGE und nachfolgender histochemischer Färbung wurde Hummergelsolin auf die posttranslationale Addition von Kohlenhydraten überprüft (2.2.2.3). Dazu wurde die PAS-Färbung (*periodic acid schiff reaction*) verwendet, bei der insbesondere kohlenhydrathaltige Komponenten z.B. Glykoproteine, Muzine und Glycogen mit Hilfe von Perjodsäurer und Schiff-Reagens sichtbar gemacht und nachgewiesen werden können. Chemisch werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert, die dann mit dem im Schiff-Reagenz vorhandenen schwefelsauren Fuchsin rot violette Komplexe bilden und so histologisch erscheinen. Eine SDS-PAGE wurde von verschiedenen Muskeln angefertigt und in Fuchsinlösung gefärbt, bis die Banden sichtbar wurden. Eine Assoziation von Kohlenhydraten an eine der beiden Gelsolinvarianten konnte dabei nicht ermittelt werden (nicht gezeigt).

3.1.3 Densitometrische Analyse von Hummergelsolin

Um die Konzentrationen von Hummergelsolin in den einzelnen Muskelgeweben zu analysieren, wurde ein Immunblot mit Hummergelsolinproben bekannter Konzentrationen angefertigt (Abb.3.1.1 C). Mittels densitometrischer Vermessung (2.2.2.5) wurde aus den korrelierenden Daten ermittelt, dass in 1 kg Scherenmuskelgewebe (Feuchtgewicht) ca. 390 mg, in der abdominalen Muskulatur ca. 330 mg Hummergelsolin enthalten sind. Bei der Analyse muss berücksichtigt werden, dass ein einhundertprozentiger Transfer der verschiedenen Probe aus der SDS-PAGE auf den Immunblot nicht immer gewährleistet werden kann. Dennoch stimmt die Dimension der erhaltenen Daten mit geschätzten Werten von 500 mg/1kg Feuchtgewebe (Bock *et al.*, 1994) ganz gut überein.

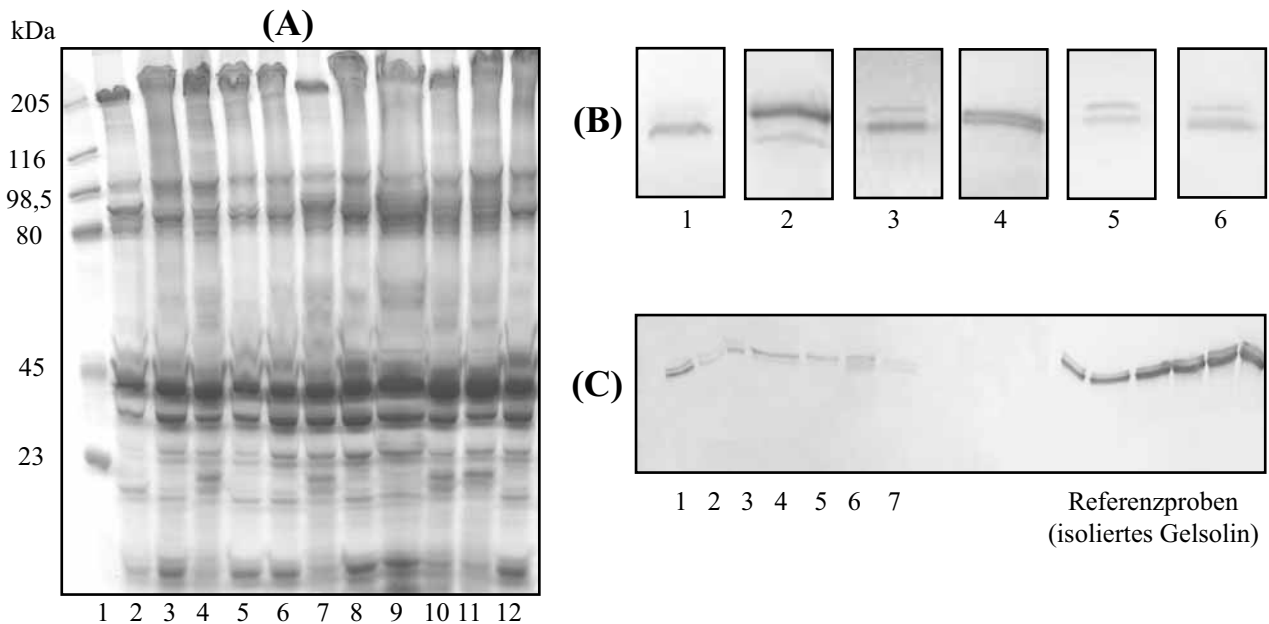


Abb. 3.1.1: (A) Gelelektrophoretische Analyse myofibrillärer Proteine von schnellen und langsamen Muskeln aus *Homarus americanus*: Die Auftrennung der Ganzmuskelproben zeigt die molekulare Diversität distinkter Skelettmuskelphänotypen. Im korrespondierenden Immunblot der unterschiedlichen Muskeln wurden zwei Gelsolinbanden mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen identifiziert. Es wurden zusätzlich Proben analysiert, die zuvor für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert worden waren, um so potentielle Modifikation durch Phosphorylierung zu ermitteln.

Lanes: 1:HMW-Standard 2:Musculus adductor dactylopoditis I (*Crusher-Closer*) 3:M. obliquus anterior (*Abdominal Flexor*) 4:M. adductor meropoditis (*Pleopod Extensor*) 5:M. ventrales aductor abdominalis (*Abdominal Extensor*) 6:M. ventrales superficiales abdominis (*Abdominal Deep Extensor*) 7: M. adductor dactylopodis II (*Cutter Closer*); post 1h RT 8:M. ventrales aductor abdominalis 9:M. obliquus anterior 10:M. adductor meropoditis 11:M. adductor dactylopodis II 12: M. adductor dactylopodus I.

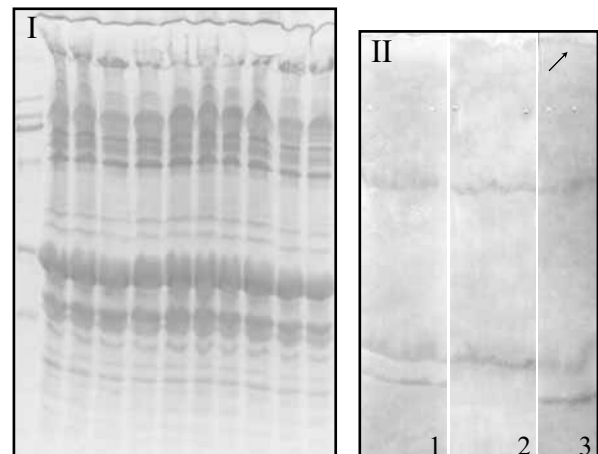
(B) Immunblottanalyse von Ganzmuskelproben: Die Konzentrationsverhältnisse von Gelsolin aus den einzelnen Muskelproben sind unterschiedlich, der anti-Hummersgelsolin-Antikörper (HG1) reagierte mit dem Musculus adductor dactylopoditis I (1) fast ausschließlich mit einer Bande bei 113 kDa, im M. obliquus anterior (2) wurden zwei Banden erkannt, mit vergleichsweise intensiver Immunreaktion im Bereich von 116 kDa. Auch im Laufbein (M. adductor meropoditis, (3)) wurde vorwiegend von zwei Banden die untere Bande gefärbt. Die Immunreaktionen des M. obliquus anterior (4) und M. ventrales superficiales abdominis (5) zeigen annähernd gleiche Immunreaktionen. Beim M. adductor dactylopodis II (6) wurde ebenfalls die untere Bande durch den Antikörper stärker identifiziert.

Im Vergleich zeigten die Extremitäten in jeder Analyse einen hohen Anteil der unteren Bande (113kDa), die Muskulatur des Abdomens einen hohen Anteil der oberen Bande (116kDa). Durch die einstündige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur konnte keine Veränderung in der Immunreaktionen festgestellt werden (nicht gezeigt).

(C) Densitometrische Vermessung Im Immunblott wurde neben den Muskelproben als Referenz Hummersgelsolin aufgetragen und densitometrisch vermessen. Aufgetragen wurden je 10 μ g Muskelprobe und 1, 2, 4, 6, 8, 10 μ g Gelsolinprobe. Lanes 1: M. adductor dactylopodus I 2: Antenal Remotor 3: M. adductor meropoditis (Pleopoden) 4: M. obliquus anterior 5: M. ventrales aductor abdominalis 6: M. ventrales superficiales abdominis 7: M. adductor dactylopodis II

(D) Phosphorylierung der Gelsoline Ganzmuskelproben des M. ventrales superficiales abdominis wurden durch eine SDS-PAGE getrennt, ein Blot angefertigt und in Ponceau S gefärbt (I).

Um eine mögliche Phosphorylierung zu ermitteln wurde der Molekulargewichtsbereich von 116 kDa zur späteren Identifikation markiert und einzelne Blotstreifen mit Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren Serin (1), Threonin (2) und Thyrosin (3) inkubiert. In indizierten Bereichen konnte auf dem entwickelten Blot keine Bande festgestellt werden (II). Die Immunreaktionen in anderen Bereichen deuten auf die Phosphorylierung von Muskelproteine wie z.B. Myosin (205kDa, Pfeil).



3.1.4 Herstellung und Analyse polyklonaler Antikörper gegen HG₂

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lag der Arbeitsgruppe ein Antikörper gegen Hummergelsolin (HG) vor. Antigendonator für eine Immunisierung von Kaninchen war die Variante aus dem Abdomen von Hummern. Da zu dem Zeitpunkt die Existenz von zwei möglichen Gelsolinvarianten unbekannt war, wurde Gelsolin für immunologische Nachweise und Färbungen aus abdominalen Muskeln isoliert und den zu immunisierenden Kaninchen appliziert. Diese Antigenproben bestanden nicht nur aus der Variante mit dem elektrophoretisch höheren Molekulargewicht von 116 kDa, die in Abdomenmuskeln anteilig stärker exprimiert wird, sondern möglicherweise auch aus anteilig geringeren Mengen der leichteren Form (113 kDa). Durch Immunisierung gewonnene Antiseren gegen die schwerere Variante (kurz HG₁) wurden affinitätsgereinigt und zur Identifikation beider Varianten (3.1.1) verwendet.

Um Unterschiede zwischen den beiden Varianten ermitteln zu können, wurde eine erneute Immunisierung von Kaninchen durchgeführt, die ausschließlich aus dem Antigen der leichteren Variante (kurz HG₂) bestanden (2.2.3.1). Dazu wurde HG₂ aus dem Scherenschließmuskel vollständig isoliert und aufgereinigt (3.2). Die Immunisierung wurde durch die Firma Pineda (Berlin) vorgenommen. Nach Erhalt der HG₂-Seren wurden Immunanalysen zur Bestimmung der Antikörpertiter aus den einzelnen Blutungstagen (60, 90, 120, 165 Tage nach Immunisierungsbeginn) vorgenommen. Das Serum mit dem höchsten Antikörpertiter (120 Tage) wurde dann nachfolgend positiv und negativ affinitätsgereinigt.

An Ganzmuskeln aus dem Scherenschließmuskel (*M. adductor dactylopoditis*) und abdominalen Muskelproben (*M. ventrales superficiales abdominis*) wurde eine vergleichende Immunanalyse vorgenommen, indem die jeweiligen Blots in unterschiedlichen Verdünnungen der beiden Seren parallel inkubiert wurden (Abb.: 3.1.2(1)). Dieser abdominale Muskel zeigte in den immunologischen Nachweisen beide Gelsoline (3.1.1) in annähernd gleichen Konzentrationen und eignete sich daher besonders für eine isoformspezifische Analyse des neu erhaltenen Serums. An geblotteten Scherenmuskeln wurden die Titer der verschiedenen Seren und die Antigenspezifität durch parallele Verdünnungen verglichen. Erwartungsgemäß wurden durch anti-HG₁ Seren beide Gelsolinvarianten in Immunblots identifiziert. Die neu erhaltene HG₂ Seren zeigten auch bei hohen Verdünnungsstufen eindeutige Immunreaktionen mit einer Gelsolinbande im Scherenschließmuskel.

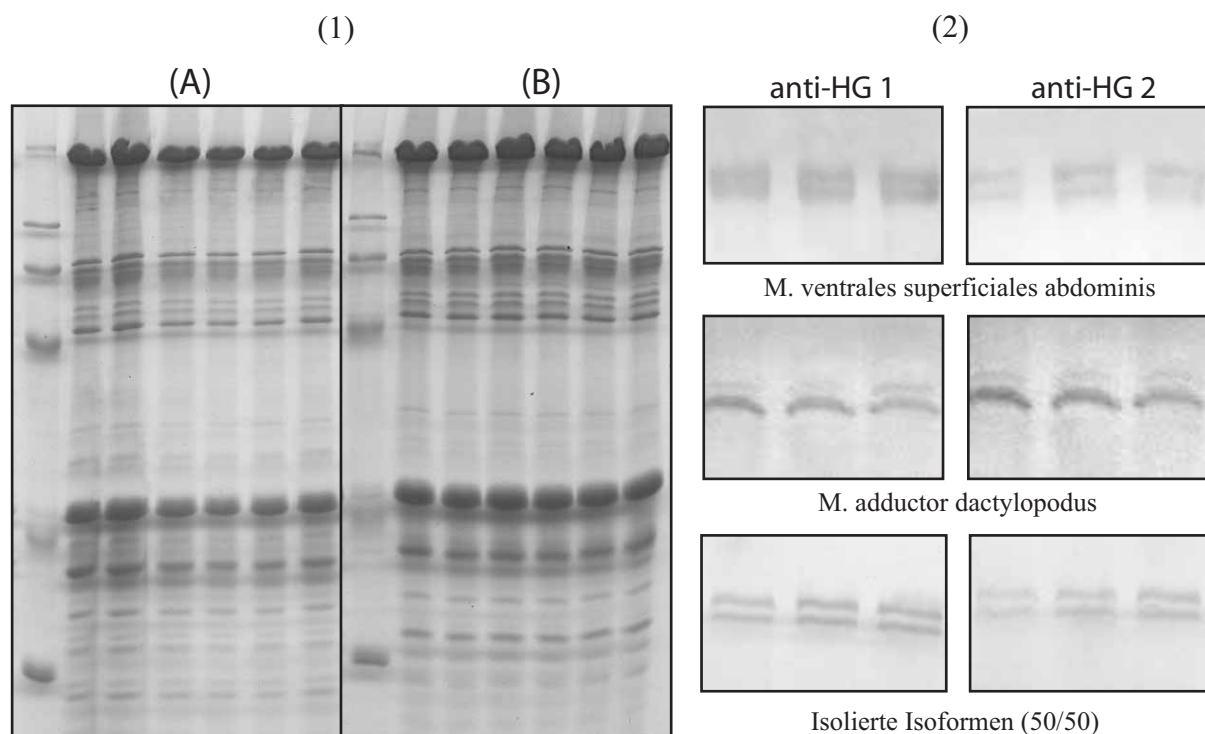


Abb. 3.1.2: (1) Analyse der beiden HG-Antisera: Eine SDS-PAGE mit jeweils gleichmäßig aufgetragenen Ganzmuskelpollen (15 μ g/Probe) des *M. ventrales superficiales abdominis* (A) und dem *M. adductor dactylopodis* (B) wurde auf eine Transfermembran geblottet. Die Blotstreifen wurden mit den beiden Antisera (HG 1 & 2) in jeweils gleichen Verdünnungen (1:1000 in 0,5% Gelatine TTBS) parallel inkubiert (2). Auch nach verschiedenen Affinitätsreinigungen erkannte der spezifisch gegen Antigen der leichteren HG-Variante hergestellte Antikörper im Immunblott auch Epitope der schweren Gelsolinvariante.

In abdominalen Muskelproben wurden durch unterschiedlich affinitätsgereinigte HG₂-Seren ebenfalls beiden Gelsolin-Varianten nachgewiesen (Abb.: 3.1.2 (2)). An isolierten Gelsolinen, die in der durchgeführten SDS-PAGE zu gleichen Anteilen pro Probe aufgetragen wurden, konnte die Immunreaktion an HG₁ durch das neu hergestellte HG₂ Serum bei Verdünnungen bis 1:50.000 nachgewiesen werden. Die Seren unterschieden sich grundsätzlich nur bei sehr hohen Verdünnungen. Hier kam es in den Immunanalysen von anti-HG₂ Seren zu schwächeren Reaktionen mit den Antigenen aus abdominalen Muskeln, besonders mit Banden von HG₁. Das neue Immunsereum zeigte aber keine eindeutige Isoform-Spezifität.

Die ermittelten, unabhängigen Identifikationen der denaturierten Gelsoline durch zwei affinitätsgereinigte Antikörper, die jeweils spezifisch gegen eine Variante hergestellt wurden, deuten auf ein hohes Maß an Sequenzhomologie. Die unterschiedlichen Immunreaktionen bei hohen Verdünnungen implizierten die Existenz zweier Isoformen mit sehr geringen Sequenzabweichungen in den verschiedenen Muskelsystemen.

3.1.5 Massenspektrometrische Analyse der Gelsolin Isoformen

Um einen massenspektrometrischen Vergleich zwischen den beiden Gelsolinvarianten aus der Humtermuskulatur durchzuföhren, wurden Proben für eine MALDI-TOF Analyse vorbereitet und in Kooperation mit der AG Proteom- und Metabolomforschung von Herrn Prof. Niehaus am MALDI gemessen (2.2.2.11). Da die Sequenzdaten von HG₁ bekannt sind (Lück *et al.*, 1994), war die Zielsetzung der Analyse eine weitmögliche Identifizierung von Sequenzhomologien zwischen den Isoformen. Durch mehrfache Messungen konnte die Sequenzabdeckung zwischen beiden Isoformen erhöht und folglich Unterschiede eingrenzen werden.

Für die Durchführung wurde eine SDS-PAGE mit isolierten Isoformen angefertigt (3.2.1) und die entsprechenden Banden aus den Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten. Nach mehrfachem Waschen in 50% Acetonitril und Trocknung der Gelstückchen wurden die Proben mit Trypsin für 24h bei 37°C gespalten und auf ein MALDI-*target* (Probenräger) appliziert. Es wurden mehrere Messungen an einer Probe durchgeföhrt. Je nach Reinheit der Probe konnten so bis 50% *Sequenzcoverage* und bis 93% *Intensitycoverage* (Anteil identifizierter Peaks im Spektrum des gemessenen Proteins) durch Sequenzabgleiche mit BioTools (Version 2.2, Bruker) erreicht werden (Toleranz: 1 Dalton). Die identifizierten Sequenzbereiche aus spektrometrischen Messungen von HG₂ anhand der Sequenz von HG₁ sind in rot dargestellt.

mvpafegagavegltiwrienfevvpypkekygqfyqgdsyivlytrdvnngnlswdl
 hfwlgsetsqdeagtaaiktvelddqlggvvpqhreveghetslflsrfkkgvrylk
 ggvasgfhhvdapyparlfhvkgrnririrqvevgvgsmnkgdcfiledcsqvya
 ymgpssrkmdrlkaiqaanpraddhagkakvividetasgseagesspglgggspdd
 vadedtgvd safe (r) sevnvvtlhhifedgdgviqtnmige (k) pllqsmldsgd
 cflldtgvgvyvwigsgsskkekvs **smelaagymekkgpytytnvqrvvekaepavf**
kayfktwrepqegglgrvftqrqmsavsatetdfdvsslhaekrrllqknagpafal
cpimvlarrnlgplrltklepvddesthgfffggdsyvlkyiyevngepqqineryi
 lyfwqgcassqdekassaihtvrlldnelcgkavqrvvqgyepahflrifkgrmvif
 lggkasgfknvhdhdydvdgtrlfvrvtcdfdtraiqqtevagslnsddvfvlet
 pgktylwigkgaseeekamgek **vvelvspgrdmvtvaeeedddfwgglggkgyqt**
ardldrplyprlfhctispagclrvmnsdfaqedlneddvmlsdsgdevyvwvgq
 gsddqekekaftmaenyiktdptertldatvilrinqgeepaafstisfpawnpdmwq
 kglvsyddmkaqvpetaave

Abb.3.1.3: Massenspektrometrische Identifikation von Sequenzhomologien von HG₂ anhand der HG₁-Sequenz. Schwarz: nicht identifiziert (& unterlegt: siehe Text), Rot: homologe Sequenzbereiche

Bei den Messungen wurden häufig zwei größere Peaks registriert, die der Sequenz nicht zugeordnet werden konnten. Trypsin spaltet theoretisch an Lysinen (k) und

Argininen (r), diese Schnittstellen können aber verdeckt sein. Daraus resultieren dann ggf. sehr große Peptide, die sich möglicherweise einerseits nicht aus den Gelproben herauswaschen lassen oder andererseits während des Fluges im Massenspektrometer zerbrechen können. Letzteres ermöglicht dann keine Identifikation der Peptide anhand der Sequenzdaten, da nur vollständige Peptide anhand des theoretischen Verdaus ermittelt werden. Beispielsweise wurde anhand des theoretischen Verdaus ermittelt, dass proteolytische Spaltungen durch Trypsin zwischen Lysin²⁰² und Lysin³⁰⁸ an Arginin²⁴⁴ und Lysin²⁷¹ durchgeführt werden können (Abb.: 3.1.3, unterlegter Bereich) und so Peptide mit Molekulargewichten entstehen, die prinzipiell meßbar sein sollten. Diese Peptide konnten der Sequenz auch nicht durch Messungen am ESI-MS eindeutig zugewiesen werden. Diese Sequenzabschnitte stellen folglich Bereiche dar, in denen sich die Isoformen unterscheiden können. Sehr kleine Peptide mit wenigen Aminosäuren (4-8) sind von der Matrix nicht abgrenzbar und können methodisch nur durch großen Aufwand ermittelt werden.

Durch die Zuordnung *detektierter* Peptidfragmente aus den Messungen der zweiten Isoform an die HG₁-Sequenz ließen sich dennoch über 60% (458 von 758 AS, siehe auch 6. Anhang) Sequenzhomologie ermitteln, die gemessenen Peptide sind damit für beiden Isoformen identisch.

3.2 Präparation von nativem Hummergelsolinen

3.2.1 Isolierung der Gelsolin Isoformen

Um die präparative Reinigung der Gelsolin Isoformen aus der Crustaceenmuskulatur durchzuführen, wurde die von Bock *et al.* (1995) beschriebene Präparation im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt (2.2.2.3). Eine mehrstufige Kombination aus fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und verschiedenen säulenchromatographischen Verfahren ermöglichte die Trennung und Aufreinigung der beiden Isoformen in nativer Form. Mit ihnen wurden dann vergleichende Bindungsstudien durchgeführt und actinbindende und actinpolymerisierende Eigenschaften charakterisiert.

Das unterschiedliche Laufverhalten in der SDS-PAGE ließ vermuten, dass sich die Isoformen möglicherweise bei unterschiedlicher (NH₄)₂SO₄ -Konzentration präzipitieren lassen. Eine analytische (NH₄)₂SO₄-Fällung wurde durchgeführt, um initiale und finale Sättigungskonzentrationen für die einzelnen Isoformen in der Extraktionslösung zu bestimmen. Die Sättigung der Extraktionslösung wurde jeweils um 5% (NH₄)₂SO₄ erweitert, die Präzipitate durch Ultrazentrifugation sedimentiert

und im Immunblot auf die Fällung einzelner Isoformen analysiert. HG₂ läßt sich ab einer Sättigungskonzentration von 35% (bis 65%) (NH₄)₂SO₄ ausfällen, ab 50% (bis 80%) präzipitiert dann zusätzlich auch HG₁ (Abb.3.3.2). Aus diesem signifikantem Unterschied wurde deutlich, dass sich die beiden Gelsoline nicht nur durch die apparenten Molekulargewichte unterscheiden, es wurden auch erste Hinweise auf unterschiedliche Bindungseigenschaften vermittelt. Das Aufreinigungsschema wurde dann hinsichtlich optimaler Ausbeute der einzelnen Isoformen analysiert.

Als Ausgangsmaterial wurde der Muskel aus dem Abdomen oder den Scheren präpariert. Diese Gewebe enthalten unterschiedliche Anteile der beiden Isoformen (3.1.1), so wurden beispielsweise bei Bedarf von größeren Mengen an HG₂ die Isolierung aus den Scherenmuskeln als Ausgangsmaterial vorgenommen.

Zunächst wurde das Muskelgewebe durch einen Homogenisator mit rotierenden Messern mechanisch aufgeschlossen. Durch Zugabe eines Extraktionspuffers mit niedriger Ionenstärke wurde Hummergelsolin in Gegenwart von EGTA in Lösung gebracht, das Myofibrillenhomogenat dann abzentrifugiert. Das Supernatant wurde einer primären Fällungsstufe von 25% (NH₄)₂SO₄-Sättigung unterzogen, das sedimentierte Präzipitat nach Ultrazentrifugation verworfen. Dieser Schritt ermöglicht ohne Verlust der Hummergelsoline eine Minimierung der Verunreinigung schon zu Beginn der Aufreinigung. In einer anschließenden Fällung wurde die Sättigung im Extraktionspuffer auf 50 % erweitert. Das entstandene Präzipitat enthielt neben den Verunreinigungen ausschließlich HG₂. In der finalen Stufe (50–80%) wurde neben HG₂ auch einen hohen Anteil der ersten Isoform präzipitiert. Die beiden Fällungsstufen wurden dann separat weiter aufgereinigt (Abb.: 3.2.2).

Beim anschließenden, chromatographischen Aufreinigungsschritt wurde eine TMAE Fractogel Anionenaustauschersäule mit einem Gradienten von 150–450 mM KCl verwendet. Das hier verwendete Säulenmaterial mit Tentakel und ein flacher Gradient wirkten sich vergleichsweise günstiger auf die Aufreinigung im Bezug auf Verunreinigungen aus. Beide Hummergelsoline eluierten zwischen 340 und 380 mM KCl von der Säule, die bezüglich der molaren Masse leichtere HG₂ Isoform eluierte zuerst. Die Fällungsstufe 25–50% (NH₄)₂SO₄ enthielt nach diesem Aufreinigungsschritt neben HG₂ keine größeren Verunreinigungen mehr. Die Fraktion 50–80% enthielt neben den gesuchten Isoformen auch Verunreinigungen, besonders durch Hämocyanine.

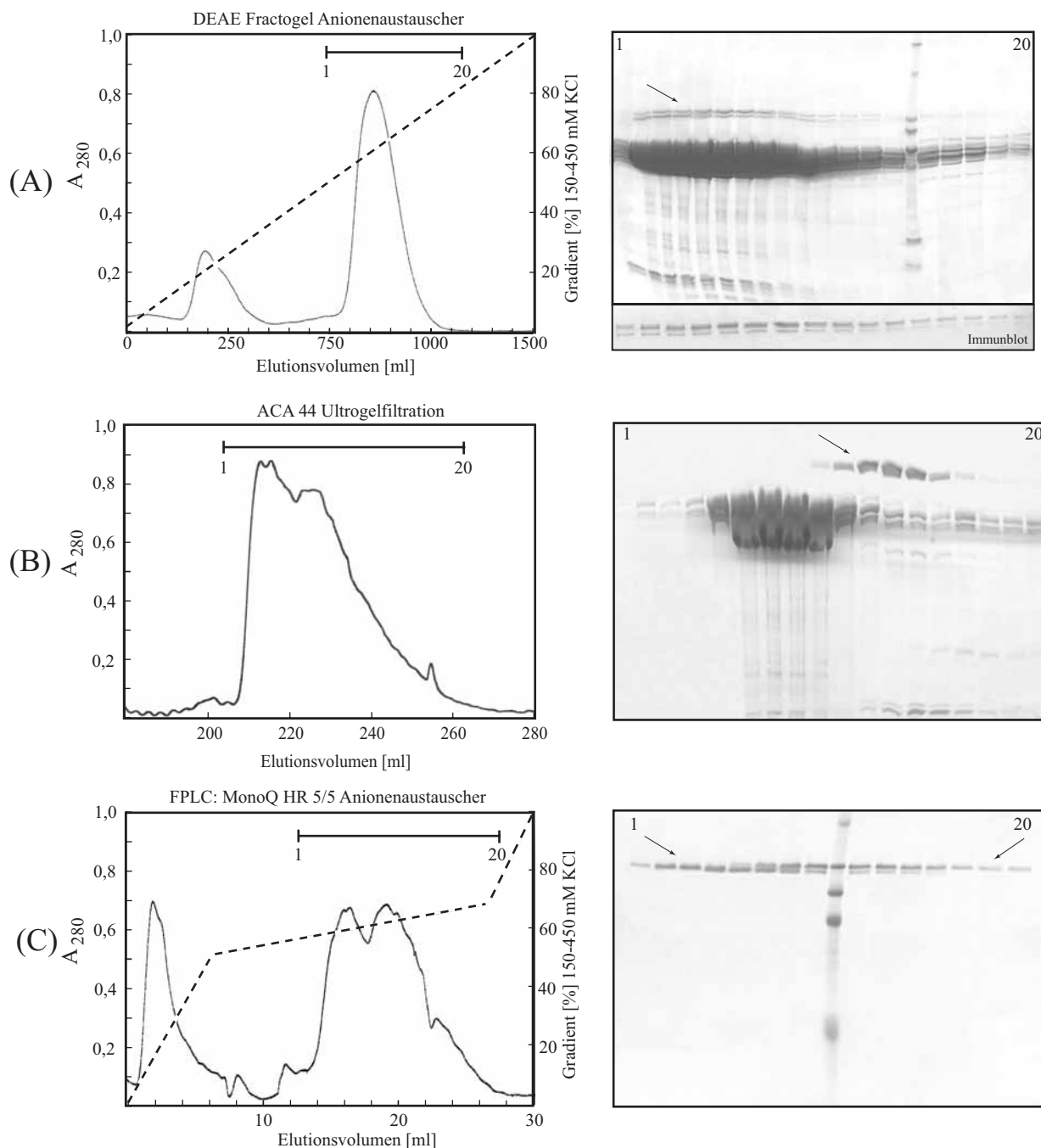


Abb. 3.2.2 Aufreinigung der Gelsolin Varianten aus der Schwanzmuskulatur von *H. americanus*: Dargestellt sind die Aufreinigungsschritte für die Fällungsstufe 50-80% Ammoniumsulfat. In 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen wurden Proben aus den gesammelten Fraktionen (indizierte Balken) aufgetrennt.

(A) Die dialysierte Proteinlösung wurde mit 200 ml/h auf eine DEAE-Fractogel Säule aufgetragen und mit einem linearen 1,5 L Gradienten (gestrichelte Linie) von 150-450 mM KCl eluiert. In der SDS-PAGE wurde eine Verunreinigung durch mitextrahiertes Hämocyanin sichtbar, in diesen Fraktionen wurden auch die Gelsolinvarianten eluiert und mittels Immunblott identifiziert. **(B)** Die vereinigten Fraktionen wurden auf einer ACA44 Ultragelfiltrationssäule (2,5 x 100 cm) mit 30 ml/h aufgetragen. Der Hauptanteil an Verunreinigung konnte entfernt werden. **(C)** An einer FPLC mit einer MonoQ-HR 5/5 Anionenaustauschersäule wurde einen gestaffelter KCl-Gradienten (150-450 mM KCl, 35 ml) angelegt. Der Abschnitt 50 bis 75% des Gradienten wurde zur Trennungsoptimierung sehr flach angelegt. Die in diesem Bereich eluierten Fraktionen (60-70 % des Gradienten) zeigten in der elektrophoretischen Analyse sowohl Fraktionen vollständige aufgereinigter Isoformen (Pfeile), als auch intermediäre Fraktionen mit gemischten Anteilen. Die Gelsolin Isoform 2 eluiert zuerst und im fließenden Übergang vergrößert sich der Anteil der ersten Isoform, welche dann in weiteren Fraktionen ebenfalls rein vorlag. Die jeweils isoformspezifischen Fraktionen wurden gesammelt, gemischte Fraktionen wurden vereinigt und nach einer Dialyse gegen DEAE-Startpuffer in einem zweiten Lauf erneut getrennt.

Der Präparationsverlauf dieser Fällungsstufe ist als gelelektrophoretische Analyse mit dem chromatographischen Aufreinigungsschritt in Abbildung 3.2.1 (A) dargestellt. Die Aufreinigung wurde ebenfalls durch Immunblots und viskosimetrische Messungen verfolgt.

Durch die nachfolgende Gelchromatographie konnte unter anderem auch der größte Teil an Hämocyanin entfernt werden. (Abb.: 3.2.1 B). Der finale Schritt und damit die Trennung der Isoformen wurde an der FPLC mit einer starken MonoQTM HR 5/5 - Anionenaustauschersäule vorgenommen. Dazu wurde ein gestaffelter Gradient (150 – 450mM KCl) programmiert, 0-40%, 50-75% und 75-100% mit unterschiedlichen Volumenintervallen. Die Isoform 2 eluierte zuerst bei ~360 mM KCl, die Isoform 1 bei ~375 mM KCl. Dementsprechend wurde dieser Abschnitt im Gradient sehr flach angelegt (Abb.:3.2.1 C). Alle Fraktionen mit reinen Isoformen wurden vereint, Mischfraktionen erneut gegen Startpuffer dialysiert und der Lauf wiederholt. Dieses Verfahren ermöglichte eine Isolierung von 70-80 % reinen Isoformen aus der Ausbeute nach der Gelfiltration.

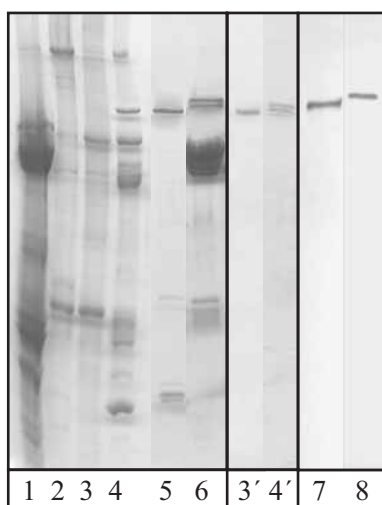


Abb. 3.2.2: Analyse der fraktionierten Ammoniumsulfat fällung In einer 12,5 %igen SDS-PAGE wurde Proben von (1) Muskelhomogenat, (2) Fällung bis 25% AS, (3) Fällung 25-50% AS, (4) Fällung bis 50-85% (5) Aufreinigung von (3) nach folgender Anionenaustauscherchromatographie (Fractogel EMD) (6) Aufreinigung von (4) nach folgender Anionenaustauscherchromatographie (Fractogel EMD) aufgetrennt. Ein Immunblot von (3) zeigte, dass nur HG2 in der Fällung bis 25-50% präzipitiert (3'), in der Fällungsstufe 50-85% befanden sich beide HG-Varianten, aber größere Anteile von HG1 (4'). In Proben bis 25% AS konnte durch Immunblots kein Gelsolin nachgewiesen werden. Nach Abschluss der Aufreinigung wurde in der SDS-PAGE neben den Endprodukten (7=HG2, 8=HG1) keine weitere Verunreinigung ermittelt.

Die Fällung der Gelsolinvariante HG1 bei einer 15% höheren Ammoniumsulfatsättigung legte neben den bisher ermittelten, ungleichen Molekulargewichten der Gelsoline nochmals einen strukturellen Unterschied zwischen den beiden Formen nahe. Unterschiedliche Elutionseigenschaften bei distinkten KCl Konzentrationen bedingten die finale Trennbarkeit und wiesen damit ebenfalls auf vorhandene, strukturelle Unterschiede. Aufgereinigten Isoformen war nach Dialyse gegen 20 mM Imidazol, 0,2 mM EGTA, 0,2 mM DTE, pH 7,6 für wenigstens zehn Tage stabil. Die Präparation der Hummergelsoline aus dem Schwanzmuskel erstreckte sich über den Zeitraum von 8 Tagen mit einer Ausbeute von durchschnittlich 3 mg reiner Isoform aus 250 g Muskelgewebe.

3.2.2 Limitierte proteolytische Spaltung isolierter Gelsolin Isoformen

Es wurden limitierte proteolytische Spaltungen des Hummergelsolins mit unterschiedlichen Proteasen durchgeführt (2.2.2.8.). Die Zielsetzung war dabei eine Protease zu identifizieren, die Hummergelsolin zwischen G3 und G4 spaltet und damit in zwei etwa gleich große Fragmente, den C- und den N-Terminus, zerlegt. Gelsolin ist ein modular aufgebautes Protein, dessen Domänen über proteolytisch sensitive Regionen miteinander verbunden sind. Es konnte ermittelt werden, dass neben Trypsin besonders alpha-Chymotrypsin eine geeignete Protease darstellt, um Hummergelsolin so zu spalten, dass die einzelnen Termini auch weiter aufgereinigt werden können. Crustaceengelsolin wurden bereits von Lück *et al.* (1995) gespalten, die Ergebnisse wurden und mit bekannten Daten aus Mammaliengelsolinen verglichen. Aus der vorliegenden Arbeit ging jedoch nicht hervor, welche der beiden Isoformen des Hummergelsolins dabei zum Einsatz gekommen war.

Für den Spaltungsansatz wurden 0,25 mg/ml aufgereinigte Hummergelsolin Isoform in Gegenwart von 0,5 mM Ca^{2+} bei 25°C im Wasserbad mit alpha Chymotrypsin (1:200 w/w) inkubiert und über einen definierten Zeitraum (30 sec bis 10 min) Proben entnommen. Die Aktivität der Serinprotease wurde sofort mit einer Kombination aus 0,5 mM PMSF und TLCK (1:100 w/w) gestoppt und die Proben mit SDS-Probenpuffer gekocht. Die Spaltergebnisse wurden anschließend mit einer 12,5 %igen SDS-PAGE analysiert (Abb.3.2.3 A, B).

Aus den beiden SDS-Gelen konnten unterschiedliche Spaltprodukte der beiden Isoformen ermittelt werden. Der Spaltungsansatz für HG₁ (A) zeigt deutlich zwei distinkte Peptide im Molekularmassenbereich von 50-60 kDa. Schon nach einer Minute entstanden gleichzeitig drei weitere Peptide. Das größere Fragment wurde früher weiter gespalten als das Kleinere, parallel mit dem vollständigen Abbau des Größeren resultierte ein weiteres Spaltprodukt. Den Peptiden aus der fortgeschrittenen Spaltung wurde aufgrund ihrer geringen Größe (< 23 kDa) kein eindeutiges Molekulargewicht zugeordnet. Der Spaltungsansatz für HG₂ (B) zeigte in der SDS-PAGE nur eine einzelne Bande im Bereich von 50 kDa, die auch über die gesamte Reaktionsspanne erhalten blieb. Da die Bandenstärke der eingesetzten Menge von HG₂ der des finalen Spaltproduktes entsprach, ließ sich folgern, dass zwei Peptide mit annähernd gleichen apparenten Molekulargewichten entstanden waren, die sich in der Elektrophorese überlagerten.

Der Reaktionsansatz wurde erneut parallel mit je 0,5 mg Gelsolinisoformen durchgeführt, die über Nacht in einer Dialyse durch 0,2 mM EGTA rekonstituiert worden waren. Für Gelsolin aus Vertebraten ist bekannt, dass der Calciumentzug durch den Chelatbildner EGTA dabei die Proteinkonformationen in eine geschlossenere, kompaktere Form modifiziert.

Die SDS-PAGE der verlangsamten Proteolyse ermöglichte auch bei Hummergelsolin eine genauere Übersicht von den jeweils entstehenden Peptiden. Die gespaltenen Proben gleicher Zeitintervalle wurden elektrophoretisch nebeneinander aufgetrennt. Abbildung 3.2.3 (C) zeigt zwei Spaltprodukte aus der Proteolyse von HG₁, die Spaltung von Isoform 2 wurde im Gel erneut durch eine einzelne Bande verdeutlicht. Die Spaltprodukte beider Isoformen wurden über den gewählten Zeitraum nicht in weitere, kleinere Peptide proteolysiert. Nach ca. 8 min waren die eingesetzten Gelsoline vollständig in zwei Fragmente zerlegt. Durch die limitierte Proteolyse von HG₁ entstanden zwei Spaltpeptide. Die SDS-PAGE zeigte die jeweils kontinuierlichen Abnahmen der Isoformen proportional zur Zunahme der Spaltprodukte. Die Bande der Ausgangsmengen zeigte die gleiche Intensität wie die der Endprodukte. Daher wurde angenommen, dass aus der limitierten Proteolyse mit Chymotrypsin zwei große Peptide identischen Molekulargewichts aus der Isoform 2 hervor gingen, welche folglich in dem Gel als eine Bande erschienen.

Aus Mammaliagelsolinen konnten durch Spaltungsexperimente bereits die N- und C-terminale Hälften gewonnen werden (Chaponier *et al.*, 1986). Die Spaltungen mit Chymotrypsin erzeugten zwei, im Bezug auf ihr Molekulargewicht, annähernd gleiche Hälften. In der elektrophoretischen Analyse ließ sich die N-terminale Hälfte (G1-G3) in Form einer Bande bei 40 kDa, der C-Terminus bei 45kDa ausmachen. Diese Untersuchungen ließen im Bezug auf die vorliegenden Befunden die Vermutung nahe, dass es sich bei den durch limitierte Proteolyse von HG₁ entstanden Peptiden ebenfalls um den schwereren C-Terminus (~60 kDa) und den leichteren N-Terminus (~55 kDa) handeln könnte. Demnach lägen in der SDS-PAGE der Spaltung von HG₂ beide Termini übereinander. Mit apparenten Massen von ~ 56,5 kDa erschienen sie als eine Bande. Diese lag in der SDS-PAGE leicht über dem unteren Spaltungsprodukt von HG₁.

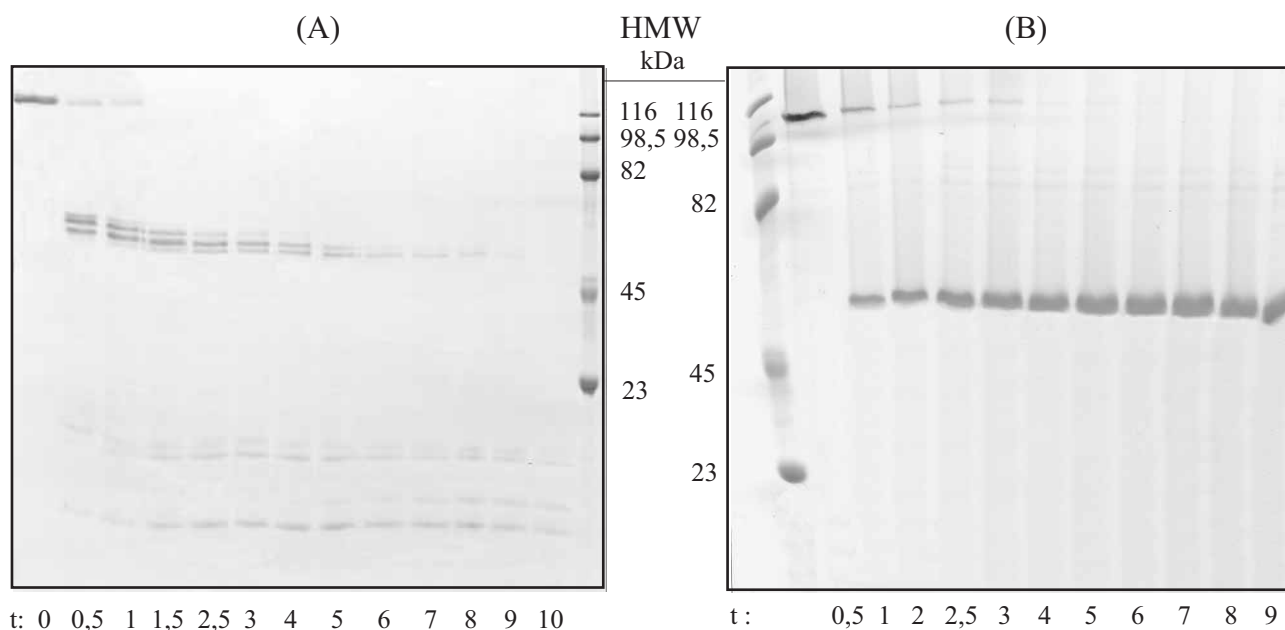
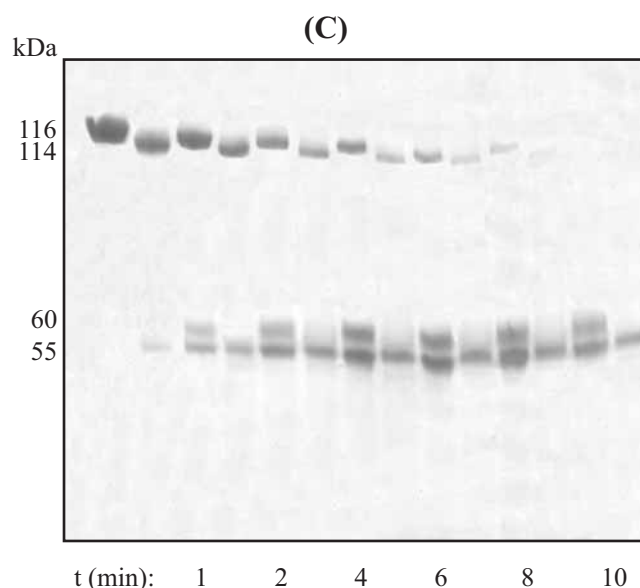


Abb. 3.2.3 Gelelektrophoretische Analyse einer limitierten proteolytische Spaltung der Gelsolin Isoformen mit alpha Chymotrypsin: In Gegenwart von 0,5 mM Calcium wurden die Isoformen (je 0,25 mg) parallel mit Chymotrypsin (1:200 w/w) bei 25°C gespalten. Die Zeitreihe (t: 30 sec.- 10min) wurde in einer 12,5%igen SDS-PAGE analysiert. **(A)** Die Isoform 1 wurde zunächst in zwei Peptide im Bereich von 60 kDa gespalten, aber auch schon nach 1 min. zeigten sich im unteren Bereich des Gels 3 Banden, nach 5 min entstand ein weiteres Peptid. Alle Peptide befanden sich im Bereich des Gels unter der 23 kDa Marke und ließen daher keine genaue Molekulargewichtsbestimmung zu. **(B)** Spaltung der Isoform 2: Hier zeigte sich über die Zeitspanne bis 10 min eine einzige Bande im Bereich von ~55 kDa.



(C) Die isolierte Gelsoline (je 0,5 mg) wurden in Gegenwart von 1mM EGTA mit Chymotrypsin (1:250 w/w) bei 25°C gespalten. Die Zeitreihe (30 sec.- 15min) wurde in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel so nebeneinander aufgetragen, dass die Spaltprodukte verglichen werden konnten. Es wurde deutlich, dass die Isoform 1 in zwei Peptide mit den apparenten Molekulargewichten von ~55kDa und ~60 kDa gespalten wurde, Isoform 2 hingegen nur eine Bande im Molekulargewichtsbereich ~56 kDa aufwies. Die Bandenstärken der eingesetzten Proteinmengen zeigten mit den resultierenden Spaltprodukten über die Zeitreihe annähernd gleiche Intensitäten. Folglich resultierten aus der Proteolyse von HG zwei Fragmente ähnlichen Molekulargewichts, die in der SDS-PAGE übereinanderliegend als eine Bande erschienen.

Um die Identität der erhaltenen Fragmente zu bestimmen, wurden nun mit Hilfe der Daten aus der analytische Proteolyse größere Mengen an Gelsolin gespalten und aufgereinigt.

3.2.3 Isolierung der Fragmente nach limitierte proteolytische Spaltung

Zur Aufreinigung der Fragmente wurde die Proteolyse eines Spaltungsansatzes von 1mg HG₂ inhibiert und die Probe auf eine MonoQ 5/5 HR Anionenaustauschersäule aufgetragen (Abbildung 3.1.5). Es wurde ein lineare Gradient (150-600mM KCl) zur Aufreinigung der Fragmente verwendet, die Säule mit 150mM KCL, 1mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 0,2mM DTT, 10mM Imidazol pH 7,4 äquilibriert. Während des Auftrags der gespaltenen Probenmaterialien zeigte sich bereits ein Peak, so das der Wash ebenfalls gesammelt wurde (Abb.: 3.1.5). Aus vorrangegagenen Spaltungsexperimenten von Vertebraten-Gelsolinen hatte sich gezeigt, dass der N-Terminus bei der Aufreinigung an MonoQ ohne zu binden direkt eluiert, der C-Terminus aber an die Anionenaustauschermatrix gekoppelt wird. Die korrespondierende SDS-PAGE der eluierten Fraktionen (Abb.: 3.2.4) zeigte, dass aus Hummergelsolin jeweils ein Fragment aus den Läufen direkt (Lane 10-12), ein weiteres Fragment bei ~180 mM KCl eluierte (Lane 1-8).

Die N-terminale Hälfte von Gelsolin aus Mammaliern, zeigt calciumunabhängige Fragmentationsaktivität. Die C-Terminale Hälfte fungiert wiederum als regulatorische Einheit, welche in Ca²⁺ abhängiger Weise die funktionellen Eigenschaften des N-Terminus moduliert (Pope *et al.*, 1997). Für die Identifikation der Peptide ist eine Fragmentationsanalyse durch Oswald-Viskosimetrie durchgeführt worden (2.2.2.6.). Dazu wurde ein Ansatz von 1 mg/ml Actin auspolymerisiert und mit 100 µl Probe gemischt. Nach zehn Minuten Inkubation bei RT wurde im Viskosimeter gemessen. Das Fragment aus dem *Wash* des Säulenlaufs zeigte eine schwache Reduktion der Viskosität. Damit konnte also ermittelt werden, dass aus der limitierten proteolytischen Spaltung von HG₂, zwei identische Peptide mit gleichem apparenten Molekulargewicht resultierten.

Ein strukturelle Unterschied zwischen den beiden Hummer Isoformen liegt möglicherweise im N-Terminus, was sich aus einer analogen Aufreinigung von HG₁ Spaltprodukten andeutete (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen Proben wurden zur späteren Identifikation durch MALDI-MS Analyse bei -80°C eingefroren.

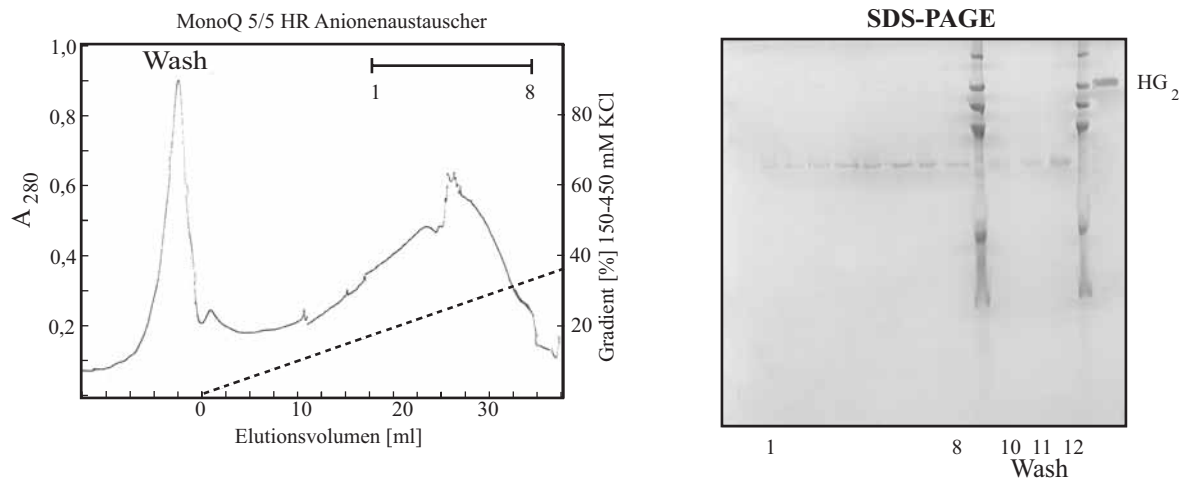


Abb. 3.2.4 Chromatographische Aufreinigung der Isoformfragmente und gelelektrophoretische Analyse nach einer limitierten proteolytische Spaltung mit alpha Chymotrypsin

In Gegenwart von 0,2 mM EGTA wurden 1mg Isoform2 mit Chymotrypsin (1:200 w/w) bei 25°C gespalten. Nach 8 min. wurde der Ansatz mit Zugabe von einem Inhibitormix (PMSF & TLCK) gestoppt und auf eine MonoQ-Anionenaustauschersäule aufgetragen. Der Wash (Lane 10-12) und die eluierten Fraktionen (Lane 1-8) wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE analysiert.

Es konnten so zwei bezüglich des Molekulargewichts, identische Spaltprodukte nachgewiesen werden, die aus der limitierten Proteolyse von HG₂ resultierten.

3.3 Gelsolin Isoformen und Actin

3.3.1 Komplexbildung mit monomerem Actin

Um mögliche Bindungen zwischen Isoform 1 bzw. 2 mit G-Actin nachzuweisen, wurde eine chemische Quervernetzung vorgenommen. In Gegenwart von Ca^{2+} ($> 10^{-6}$ M) bilden die Gelsoline aus Vertebraten einen charakteristischen 1:2 Komplex, welcher unter EGTA-Bedingungen in einen stabilen 1:1 Komplex dissoziiert (Hinssen, 1987). Für Gelsoline aus Crustaceen wurde eine Interaktion mit drei Monomeren beschrieben, die unter EGTA Bedingungen vollständig reversibel ist (Bock *et al.*, 1994). Die Assoziation von Crustaceengelsolin mit drei Monomeren ist bis dato allerdings unklar.

Um die Interaktion und Komplexbildung der beiden Isoformen zu vergleichen, wurde eine molare 1:1 Mischung aus G-Actin und den einzelnen Isoform unter G-Actin Bedingungen (10 mM Tris, 0,2 mM DTT, 0,5 mM Ca^{2+} , pH 7,4) mit dem quervernetzenden Agens EDC (5mM) versetzt (2.2.2.9). EDC aktiviert Carboxylgruppen und verknüpft sie kovalente mit primären Aminen, wenn sie in direkter Verbindung miteinander stehen. Über eine Zeitreihe (0-120 min.) wurden SDS-Proben entnommen und mittels SDS-PAGE/Immunblot analysiert. Das Gel aus Abbildung 3.3.1. zeigt das verwendete Ausgangsmaterial (Lane1: Actin, Lane3: Hummergelsolin, Lane 2: Probe t_0), nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proben konnten im Bereich > 116 kDa die entstandenen Quervernetzungsprodukte nur sehr schwach identifiziert werden. Die Effizienz der Quervernetzung ist gering, was bereits von Ansätzen mit Gelsolin aus Schweinemagen und CapZ bekannt ist (Daten nicht gezeigt). Es wurde ein Immunblot angefertigt und mit einem polyklonalen anti-Actin (Sigma, A 3687) und anti-Hummergelsolin Antikörpern inkubiert.

Der Immunblot (Abb.3.3.1 B) zeigte neben den Actinkontrollen (Lane 1, 10) und den Ausgangsprodukten mögliche Quervernetzungsprodukte von Actin und den Isoformen. Die einzelnen, eingesetzten Proteine interagierten nicht miteinander. Im Bereich von 60 kDa entstanden Banden, die mögliche Quervernetzungsprodukte von Abbaufragmenten darstellen könnten. Bei beiden Ansätzen wurden nach 90 min. ebenfalls Proteinbanden im Bereich 205 kDa sichtbar, die auf quervernetzt Monomere mit den Isoformen deuten.

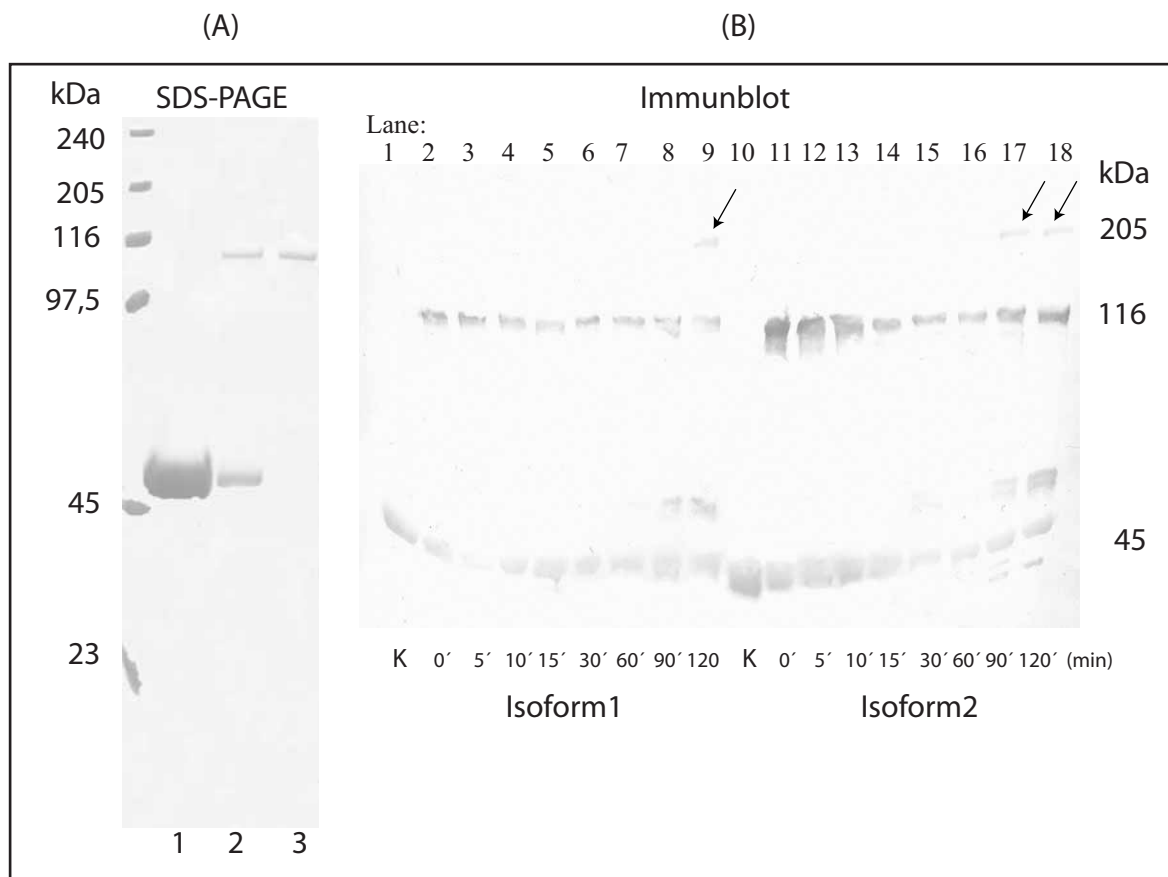


Abb. 3.3.1: Quervernetzung von monomerem Actin mit Isoformen 1 und 2

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung des Ausgangsmaterials (Actin: Lane1, Hummergelsolin: Lane3) und des Quervernetzungsansatzes (Actin und Gelsolin: Lane 2)

Actin und Isoform 1, sowie Actin und Isoform 2 wurden im Verhältniss von 1:1 mit 5 mM EDC versetzt und bei RT inkubiert. Über einen Zeitraum von 2h wurden Proben entnommen, mit SDS-Probenpuffer gekocht und in gleichen Mengen in einem 12,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Von dem Gel wurde ein Immunblot angefertigt (B). Für die Immunblotanalyse wurde der polyklonale anti-Hummergelsolin Antikörper (1:1000) und ein polyklonaler anti-Actin-Antikörper (1:2000) verwendet.

In den Lanes 9 (Ansatz Isoform1) sowie 17 & 18 (Ansatz Isoform2), d.h. nach 90 und 120 min. wurden Banden im Bereich von 205 kDa ermittelt (Pfeile), die auf mögliche Quervernetzungsprodukte von je einer Isoform mit zwei g-Actinmolekülen hinweisen.

Die Banden implizieren das HG_1 sowie HG_2 mit der gleichen Anzahl von Actinmonomeren interagieren. Da sich durch Addition des zweifachen Molekulargewichts von G-Actin mit der Masse von jeweils einer Isoform die ermittelten 205 kDa Banden begründen lassen, wird die Ausbildung von 1:2 Komplexen durch die einzelnen Isoformen mit G-Actin favorisiert.

3.3.2 Hummergelsoline modulieren die Aktinpolymerisation

Die Zugabe von Hummergelsolinen zu einem viskosimetrischen Actinpolymerisationsansatz führte zu einem Anstieg der Polymerisationsrate und einer Reduktion der finalen Viskosität. Diese Daten aus den viskosimetrischen Analysen wurden durch die sensitiveren, fluorometrischen Untersuchungen an dem Nucleationsprozess von Skelettmuskelactin bestätigt. In Nucleations- *assays* wurden die nativen Isoformen auf ihre nucleationsverstärkenden Eigenschaften auf die Polymerisation von Actin untersucht (2.2.2.7). Es sollte geklärt werden, ob sich die Isoformen hinsichtlich dieser Aktivität unterscheiden. Es wurden Standardansätze von 0,4 mg/ml (8,6 μM) Actin mit einem 10%igen (0,95 μM) Anteil an Pyrenactin und verschiedenen molaren Isoformanteilen gemessen. Die Polymerisation wurde durch 70 mM KCl induziert, was bei dem Ansatz von Actin ohne Zusatz der Modulatoren in einer flach verlaufenden Kurve resultierte (Kontrolle).

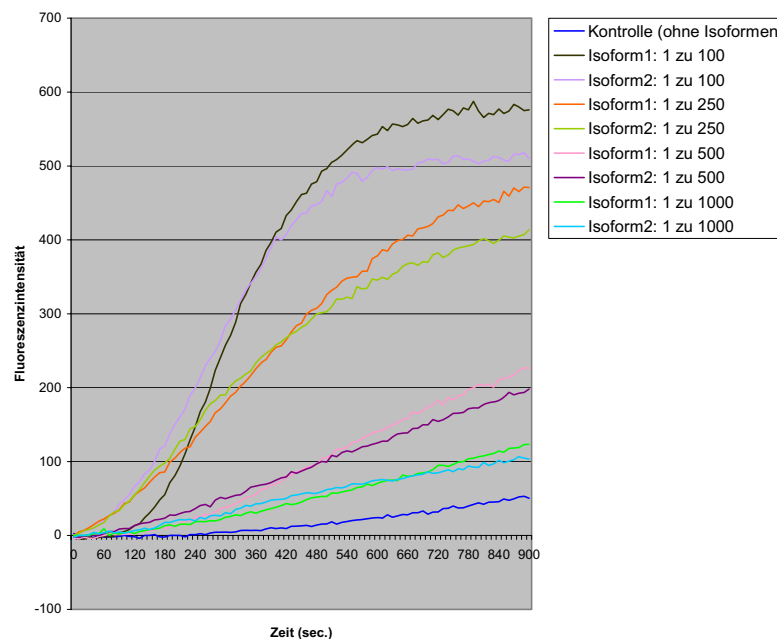


Abb.3.3.2: Nucleationsverstärkung der Actinpolymerisation durch Hummergelsolin Isoformen, fluorometrisch. Die Actinpolymerisation (0,4 mg/ml) wurde durch Zugabe von 70 mM KCl induziert (Kontrolle). Die Zugabe von Hummergelsolinen in verschiedenen molaren Verhältnissen beeinflusste die Nucleation der Actinpolymerisation durch beschleunigte Nucleibildung.

Zur Analyse der nucleationsfördernden Eigenschaften der Isoformen wurden Ansätze mit verschiedenen molaren Verhältnissen der Gelsoline zu Actin in Gegenwart von 0,2 mM Ca^{2+} gemessen. Die Abbildung 3.3.2 zeigt den konzentrationsabhängigen Anstieg

der Nucleationsraten und damit die folgende Zunahme der maximalen Elongationen. Dieser Anstieg der Initialphase, begründet in der Begünstigung der Nucleibildung, führt zur Verkürzung der so genannten *lag*-Phase. Schon bei molaren Verhältnissen von 1 zu 4000 ließ sich eine Verstärkung der Nucleationsaktivität feststellen. Durch die fluorometrischen Messungen konnte die konzentrationsabhängige Nucleationsverstärkung durch beide Hummergelsoline festgestellt werden. Es zeigten sich leicht höhere Maximalwerte bei 900 sec in Ansätzen mit Isoform 1. Die Isoformen unterschieden sich aber nicht signifikant im Bezug auf ihre nucleationsverstärkenden Eigenschaften, denn die anfänglichen Steigungen aus den *lag*-Phasen sind bei den Messungen bis zu molaren Verhältnissen von 1:250 vergleichsweise identisch. Aus dem Kurvenverlauf von HG₁ (Verhältnis 1:100) zeichnete sich eine leicht verzögerte Initiation der Nucleation im Vergleich zur HG₂ Kurve ab, die aber nach 180 sec. den gleichen Steigungsverlauf nimmt. Geringere Verhältnisse führten zu sehr rapiderem Anstieg der Polymerisationsraten.

Beide Isoformen assoziierten in Gegenwart von 0,2 mM Ca²⁺ folglich gleichermaßen mit den Actinmonomeren, wie es ebenfalls aus den Daten zur Komplexbildung verdeutlicht wurde.

3.3.3 Fragmentation von F-Actin durch Hummergelsoline

Die Aktivitäten der Hummergelsoline wurden während der Präparationen mit Hilfe eines viskosimetrischen Standardfragmentationsansatzes bestimmt (Hinssen *et al.*, 1984). Vor der Isolierung der beiden Gelsoline ist eine Zuordnung bzw. Reduktion der Aktivität während der Aufreinigung nur für die zweite Isoform messbar gewesen, da sich diese durch die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung schon zu Präparationsbeginn von der HG₁ trennen ließ. In Diplomarbeiten wurde häufig auf mangelnde Aktivitäten von Isoform 2 verwiesen, dies ließ sich mit der weiterentwickelten Präparationsmethode aufheben. Mit vorangeschrittenen Aufreinigungsstufen zeigten sich oftmals Zunahmen der Aktivität um mehr als 200fache. Gelsoline sind neben nukleationsfördernden~, auch calciumabhängige F-Actin schneidende Proteine; diese charakteristischen Eigenschaften wurden ebenfalls für Actinmodulatoren aus anderen spiralfurchenden Invertebraten beschrieben (D'Haese & Hinssen, 1987; Bock *et al.*, 1995; Remmert & Hinssen, 1996).

Die Fragmentationsaktivität kann durch die Fluorometrie über die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Verdünnung der Skelettmuskel-F-Actin Lösung unter die kritische Konzentration ermittelt werden. Es wurden Standardreaktionsansätze mit je 5,3 μg Gelsolin über Nacht auspolymerisiert. So wurden „gecappte“ F-Actin Populationen von gleicher Länge (~ 300 Monomere) hergestellt. Von diesem Ansatz wurden 20 μg F-Actin mit verschiedenen Konzentrationen an Gelsolin-Isoformen versetzt und nach 5 min mit 40fachem Volumen 2x G-Puffer verdünnt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Depolymerisation des Actins ohne Isoformenzusatz wurde als Referenz ermittelt. Der Quotient aus der Änderung der Fluoreszenzintensität von Probe und Kontrolle in der Anfangsphase der Depolymerisation ergab die Anzahl der entstandenen Schnitte der Actinfilamente.

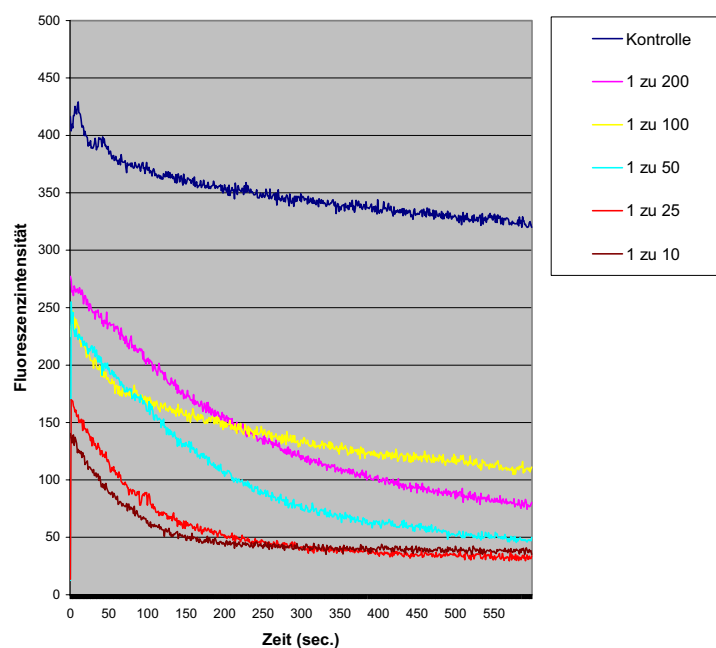


Abb.3.3.3: Fluorometrische Analyse der Fragmentation durch Isoform 1 Gecappte F-Actinansätze (je 20 μg) mit Filamenten gleicher Länge wurden mit verschiedenen molaren Konzentrationen an Isoform 1 inkubiert und unterhalb der kritischen Konzentration verdünnt. Die aus der Depolymerisation des Actins resultierende Fluoreszenzintensität kennzeichnete die Anzahl der entstandenen Filamente und damit indirekt die Schnitte pro Actinfilament (siehe dazu 3.3.5)

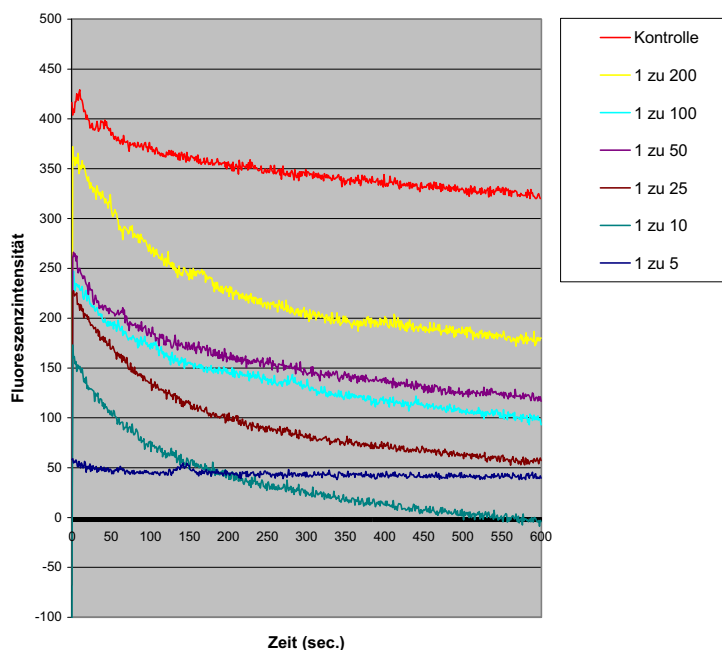


Abb.3.3.4: Fluorometrische Analyse der Fragmentation durch Isoform 2 Gecappte Actinfilamente gleicher Länge wurden analog mit verschiedenen molaren Konzentrationen an Isoform 2 inkubiert und unterhalb der kritischen Konzentration verdünnt. Die Anzahl der Schnitte pro Actinfilament durch Isoform 2 sind in Abbildung 3.3.5 ausgewiesen. Bei einem molaren Verhältnis von 1:5 ist der Abfall der Fluoreszenzintensität durch die Depolymerisation nur noch rudimentär.

Der Effekt der jeweiligen Hummergelsoline auf den Polymerstatus von Actin ist in Abbildung 3.3.3 und 3.3.4 dargestellt. In Gegenwart von $0,2 \text{ mM Ca}^{2+}$ führt die Zugabe der Isoformen zu einer graduellen Reorganisation des F-Actins in kürzere Filamente. Bei beiden Isoformen war die Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle deutlich verstärkt. Die Intensitäten sanken bei den Kontrollen nach 600sec. jeweils auf ca. 80% des Anfangswertes, bei den Isoformen (1:100) auf ~25%. Eine 50%ige Reduktion der *steady-state* Viskosität von Actin wurde bei einem Verhältnis von ~1:200 erreicht. Bei molekularen Verhältnissen < 25 wurden nur noch weniger als 10% der anfänglichen Intensität ermittelt. In Abbildung 3.3.4 ist zusätzlich ein molares Verhältnis von 1:5 dargestellt, bei dem sich kein Abfall der Fluoreszenzintensität mehr messen ließ, folglich lagen in kürzester Zeit im Ansatz annähernde G-Actin Bedingungen vor.

Molares Verhältnis zu Actin	$\Delta\%$ Fluoreszenz Intensität/sec Kontrolle	$\Delta\%$ Fluoreszenz-Intensität/sec Probe (HG ₁ & HG ₂)	Abnahme Fluoreszenz (P) / Abnahme Fluoreszenz (K) (HG ₁ & HG ₂)	Zahl der Schnitte pro Filament (HG ₁ & HG ₂)
1 zu 200	0,22	0,83/0,92	3,77/4,18	1,9/2,1
1 zu 100	0,22	1,1/1,16	5/5,27	2,5/2,7
1 zu 50	0,22	1,13/1,27	5,13/5,77	2,6/2,9
1 zu 25	0,22	1,55/1,8	7,05/8,18	3,5/4,1
1 zu 10	0,22	1,93/2,15	8,77/9,77	4,4/4,9

Abb.3.3.5: Vergleich der Fragmentationsaktivität der beiden Hummergelsoline durch die Fluorometrische Analyse Die Fluoreszenzabnahme durch Depolymerisation wurde aus der Anfangsphase ermittelt. Aus der Anzahl der Schnitte pro Actinfilament wurde deutlich, dass die Isoformen in gleichen Größenordnungen fragmentieren.

Zur Ermittlung der Schnitte pro Filament wurde der Quotient aus dem Abfall der Fluoreszenzintensität der Proben durch die Kontrolle herangezogen. Durch nicht-lineare Regression der Kurvenverläufe wurde die negative Steigung aus den ersten 60 sec. ermittelt. Die sich damit ergebenden indirekten Schnitzzahlen zeigen eine leicht höhere Fragmentationsaktivität von HG₂ (1,1 Fach). Die leicht höhere Fragmentationsaktivität könnte möglicherweise auf eine abweichende Proteinbestimmung der eingesetzten Isoformen zurück zu führen sein; denkbar war auch eine Verunreinigung der HG₁ Probe durch zusätzliches Protein, welches in der vorangegangenen Kontroll-SDS-PAGE nicht sichtbar geworden war.

Die Fragmentationswerte beider Actinmodulatoren lagen aber in gleichen Größenordnungen. In beiden Untersuchungen zeigten sich die gleichen Steigerungen der Fragmentationsraten pro Filament um den Faktor 2,3. Es wurde daher unter Einbezug der Daten aus der Komplexbildung (Abb. 3.3.1) und den Nucleationsmessungen (Abb.3.3.2) gefolgert, dass die beiden Isoformen in Gegenwart von 0,2 mM CaCl₂ die gleichen funktionellen Eigenschaften besitzen.

Gelsolin ist ein Actin-bindendes Protein, das calciumabhängig Actinfilamente schneidet und cappt. Für diese Funktionen von Mammaliagelsolinen wurden Calciumkonzentrationen überhalb von 50 nM beschrieben (Allen & Janmey, 1994), dennoch ist der exakte calciumregulierte Fragmentationsprozess bis dato noch ungeklärt (Mc Gough *et al.*, 2003). Die Aktivität von Hummergelsolinen ist ebenfalls

von der Anwesenheit mikromolarer Calciumkonzentrationen abhängig, die Schwellenwerte für die Aktivierung von Evertebratengelsolinen scheinen jedoch signifikant niedriger als für Mammaliagelsolinen zu sein (Hinssen, 1984). Um die Aktivierung der beiden Isoformen durch Ca^{2+} näher zu beleuchten, wurde Fragmentationsansätze mit distinkten Calciumkonzentrationen durch Kapillar Viskosimetrie analysiert (Abb.3.3.6).

Die Daten aus der Viskosimetrie zeigen deutlich unterschiedliche Ca^{2+} -Aktivierungsschwellen für die beiden Isoformen. HG_2 erzeugte durch Fragmentation von F-Actin bereits bei einer Calciumkonzentration von $\sim 4,2 * 10^{-8} \text{ M Ca}^{2+}$ eine Reduktion der Viskosität, wohingegen HG_1 erst bei $\sim 2,8 * 10^{-7} \text{ M Ca}^{2+}$ eine äquivalente Aktivität (25%) aufwies. Eine halbmaximale Aktivierung der Fragmentationsrate von Isoform 2 wurde bei $3,2 * 10^{-7} \text{ M Ca}^{2+}$ erreicht. Isoform 1 zeigte diese erst bei $1,5 * 10^{-6} \text{ M Ca}^{2+}$, bei der bereits 90% der Fragmentationsaktivität von HG_2 erreicht war.

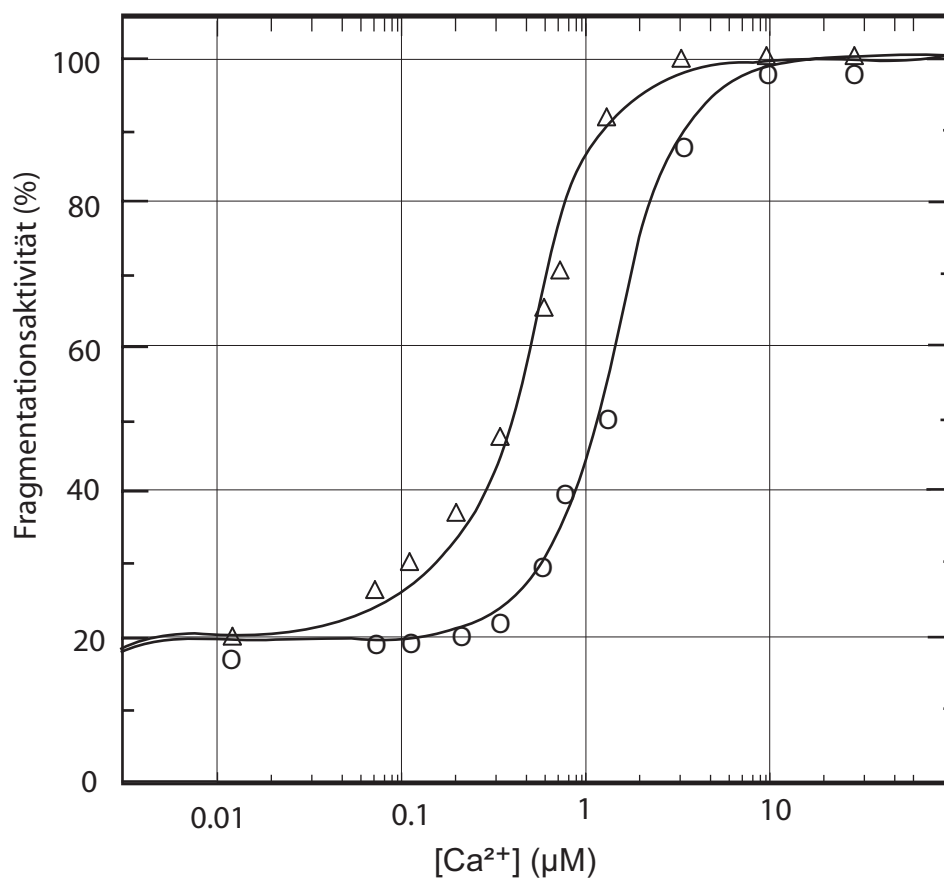


Abb. 3.3.6: Fragmentationsaktivität der beiden Gelsolin Isoformen in Anwesenheit variabler Calciumkonzentrationen Kaninchenskelettmuskelactin (1 mg/ml in 1mM ATP, 10mM Imidazol-HCL, pH 7,0) wurde über Nacht bei RT durch 100mM KCL und 2mM MgCl₂ polymerisiert. Die Gelsolin Isoformen wurden in verschiedenen Calcium-EGTA-Puffersystemen 5 min. inkubiert, so daß nach Zugabe ein Verhältnis 1:50 (w/w) mit Actin entstand. Nach 30 min wurde in einem Oswald Viskosimeter bei 25 °C die Absinkgeschwindigkeit gemessen, die spezifische Viskosität berechnet und gegen die Calciumkonzentration (µM) aufgetragen.

Es wurde deutlich, dass die Aktivierungsschwellen für die Fragmentation von filamentösem Actin durch die Isoform 2 um das 8,3 fache niedriger war als die Aktivierung von Isoform 1. Die Untersuchungen wurden wiederholt und durch die sensitivere Fluorometrie ergänzt.

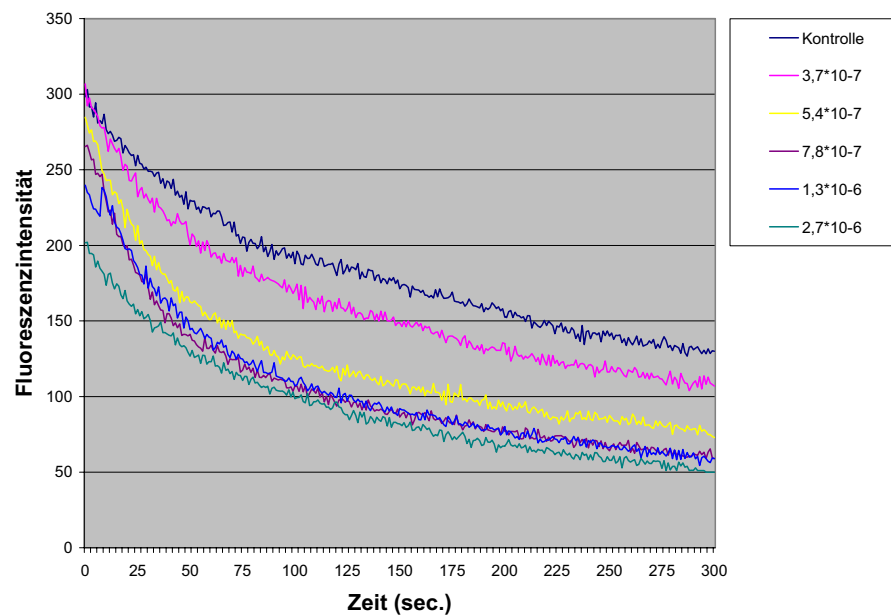


Abb.3.3.7: Fragmentationsaktivität der Isoform 1 bei distinkten Calciumkonzentrationen, fluorometrisch. Ab einer Ca^{2+} Konzentration von $3,7 \cdot 10^{-7}$ zeigte HG_1 erstmalig deutliche Fragmentationsaktivität. Niedrigere Ca^{2+} -Konzentrationen erzeugten Kurvenverläufe, die auf Restaktivität von Gelsolin beruhten (nicht gezeigt).

Die Fragmentationsaktivität durch die Fluorometrie wurde erneut über die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Verdünnung der F-Actin Lösung unter die kritische Konzentration ermittelt. Von Ansätzen gecappter Filamente wurden $20 \mu\text{g}$ F-Actin mit 1:50 Gelsolin-Isoformen versetzt. Die Isoformen wurden zunächst in einem Calcium-EGTA-Puffersystem inkubiert. Das EGTA-Puffersystem mit dem jeweiligen HG wurde dem Ansatz in einer 1:10 Verdünnung hinzugefügt, um die Fragmentation bei eingestellten Calciumkonzentrationen zu gewährleisten. Nach 5 min. wurde mit 40fachem Volumen 2x G-Puffer ohne Calciumzusätze verdünnt, um die Depolymerisation der fragmentierten Filamente zu ermitteln. Durch Messungen von Ansätzen mit den Isoformen zeigten sich verstärkte Abnahme der Fluoreszenzraten im Vergleich zur Kontrolle. Mit steigenden Calciumkonzentrationen erhöhten sich die Kurvenabfälle rapide, was auf erhöhte Fragmentationsaktivitäten der eingesetzten

Isoformen basierte. Eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Depolymerisation von HG₁-fragmentierten Filamenten konnte in Gegenwart von $3,7 * 10^{-7}$ M Ca²⁺ ermittelt werden. Es wurden ebenfalls Ansätze mit der Isoform bei geringeren Ca²⁺ Konzentrationen gemessen, diese unterschieden sich jedoch nicht voneinander. Schätzungsweise 10% der Gelsoline wiesen diese Restaktivität in Form calciumunabhängiger Fragmentationen auf. Bei Ca²⁺ Konzentrationen über $3,7 * 10^{-7}$ stiegen die Fragmentationsraten deutlich an.

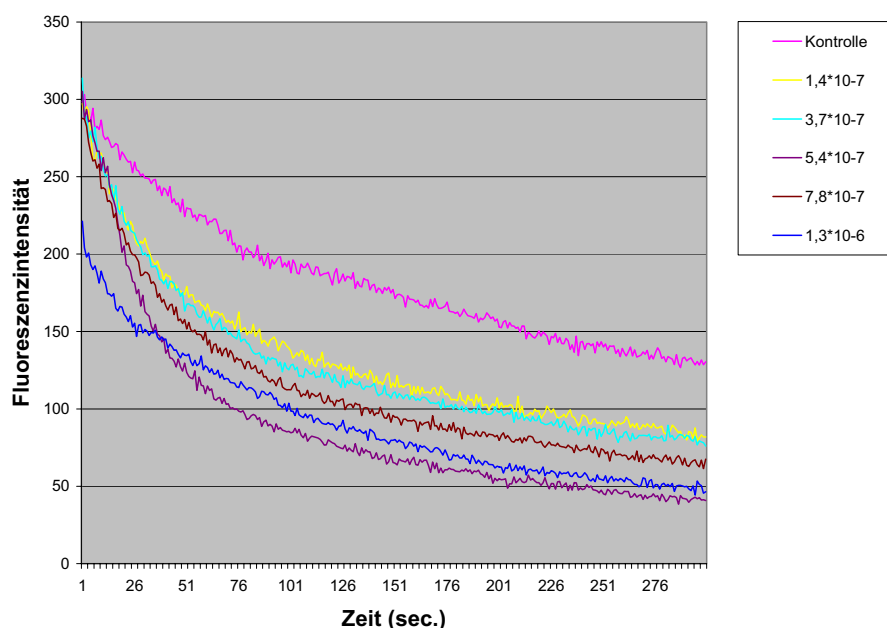


Abb.3.3.8: Fragmentationsaktivität der Isoform 2 bei distinkten Calciumkonzentrationen, fluorometrisch. Schon bei sehr geringen Ca²⁺ Konzentrationen unter $1,4 * 10^{-7}$ zeigte HG₂ Fragmentationsaktivität.

Durch HG₂ zeigten sich schon bei niedrigeren Ca²⁺ Konzentrationen Abweichungen von der Kontrolldepolymerisationsrate, als durch Isoform 1. Bereits bei $7,8 * 10^{-8}$ kam es zu einem deutlichen Abfall der Intensitäten nach Verdünnung des Ansatzes durch den calciumfreien G-Puffer unter die kritische Konzentration. Bei $1,4 * 10^{-7}$ M CaCl₂ konnten deutlich höhere Fragmentationsraten durch Isoform 2 ermittelt werden, als sie unter gleichen Bedingungen mit Isoform 1 vorlagen. In Abbildung 3.3.9 sind die durch nichtlineare Regression erhaltenen Steigungen und die daraus resultierenden indirekten Schnitzzahlen pro Actinfilament dargestellt.

Calcium-Konzentration	$\Delta\%$ Fluoreszenz-Intensität/sec Kontrolle*	$\Delta\%$ Fluoreszenz-Intensität/sec Probe (I ₁ &I ₂)*	Abnahme Fluoreszenz (P)/Abnahme Fluoreszenz (K)	Zahl der Schnitte pro Filament
$7,8 \cdot 10^{-8}$	0,7	0,74/1,34	1,05/1,91	0,5/1
$1,4 \cdot 10^{-7}$	0,7	0,74/2,44	1,05/3,49	0,5/1,8
$3,7 \cdot 10^{-7}$	0,7	0,96/2,51	1,37/3,59	0,7/1,8
$5,4 \cdot 10^{-7}$	0,7	1,39/2,77	1,98/3,96	1/2
$7,8 \cdot 10^{-7}$	0,7	1,46/2,61	2,1/3,73	1,1/1,9
$1,3 \cdot 10^{-6}$	0,7	1,96/3,0	2,3/4,29	1,4/2,2
$2,7 \cdot 10^{-6}$	0,7	2,24/3,16	3,2/4,51	1,6/2,3

Abb.3.3.9: Fluorometrische Analyse der Fragmentationsaktivität bei unterschiedliche Ca^{2+} Konzentrationen Aus der indirekten Ermittlung der Schnittanzahl pro Actinfilament wurde deutlich, dass sich die Isoformen im Bezug auf die Calciumaktivierung unterschieden.

Durch die viskosimetrischen Messungen wurden unterschiedliche Calciumkonzentrationen für die Aktivierung der Fragmentation der Isoformen im Bereich zwischen 0,1 und 1 μM Ca^{2+} ermittelt (Abb.3.3.6). Die fluorometrischen Messungen mit analogen Konzentrationen sind in Abb.3.3.9 dargestellt.

Die Anzahl der Schnitte pro Filament durch Isoform 1 verdoppelt sich für den Bereich der gemessenen Ca^{2+} Konzentrationen, die für Isoform 2 wird um den Faktor 2,3 erhöht. Es zeigte sich ein vergleichsweise rascherer Anstieg der Schnittquote durch die Isoform 2. Bereits bei $7,8 \cdot 10^{-8}$ M Ca^{2+} konnte Fragmentationsaktivität durch HG_2 festgestellt werden, die sich bei einer Konzentration von $1,4 \cdot 10^{-7}$ M Ca^{2+} annähernd verdoppelte. Aus dem Ansatz mit gleichen Bedingungen resultierte erstmalig eine calciumabhängige Fragmentation durch HG_1 , die Fragmentationsrate liegt aber um das 2,5 fache niedriger, als bei Isoform 2. Bei $5,4 \cdot 10^{-7}$ M Ca^{2+} lag eine doppelt so hohe Fragmentationsrate an Actinfilamenten durch Isoform 2 vor, als durch HG_1 ermittelt wurde. In allen Messungen im Bereich von 10^{-7} M Ca^{2+} zeigten sich höhere Fragmentationsraten durch Isoform 2, die damit auf eine höhere Aktivität bei gleichen Calciumbedingungen schließen ließ.

Möglicherweise basierte der Unterschied auf mangelnde Calciumsensitivität von Isoform 1. Daher wurden die Versuche mit neu präparierten Proteinen wiederholt. Die unterschiedlichen Schwellenwerte für die Fragmentation wurden durch die Reproduktion bestätigt, eine initiale Fragmentation durch Isoform 1 wurde erst ab Calciumkonzentrationen von $3,7 * 10^{-7}$ gemessen. Die Aktivierung der Fragmentation durch Isoform 2 benötigte *in vitro* 6,2x weniger freie Calciumionen. In weiteren Messungen mit höheren Calciumkonzentrationen wurde im Bereich von $\sim 3 * 10^{-5}$ M Ca^{2+} eine 100%ige Fragmentationsaktivität für die HG-Isoformen 1 ermittelt. HG₂ zeigte bereits bei $7 * 10^{-7}$ M Ca^{2+} maximale Fragmentationsaktivität.

Aus verschiedenen Messungen zeigte sich deutlich, dass unter gleichen Calciumbedingungen eine höhere Fragmentationsrate durch HG₂ erzielt, bzw. für eine äquivalente Aktivierung beider Isoformen höhere Calciumkonzentrationen für HG₁ benötigt wurden.

Die beiden Isoformen zeigten Gelsolin-typische Eigenschaften. Sie können in calciumabhängiger Weise mit G-Actin 1:2 Komplexe ausbilden und die Nucleation von G~ zu F-Actin beschleunigen. In Gegenwart von mikromolaren $[Ca^{2+}]$ fragmentieren die Modulatoren F-Actin und verbleiben dann als Kappe am Filament.

Aufgrund des ermittelten, funktionellen Unterschiedes zwischen den Isoformen erschien es denkbar, dass sich die beiden Muskelfasertypen, in denen jeweils eine Isoform vorzugsweise exprimiert wird, im Bezug auf ihre jeweilige calciumabhängige Kontraktion ebenfalls unterscheiden könnten. Daher wurde aus dem *Crusher closer*-Muskel und aus dem abdominalen *Flexormuskel* jeweils Actomyosin präpariert und die calciumabhängigen Aktivitäten der Actomyosin-ATPasen gemessen.

3.3.4 Calciumabhängigkeit der Actomyosin-ATPasen

Zwei unterschiedliche Kontrollsysteme regulieren die Aktivität von vielen Invertebratenmuskeln. In den schnellen, abdominalen Humtermuskeln, wie auch im Vertebratenmuskel, erfolgt die Regulation nur über den Troponin/Tropomyosin-Komplex der dünnen Filamente, in langsamen Humtermuskeln agiert die leichte Kette des Myosins ebenfalls als regulatorische Einheit (Lehman & Szent-Gyorgyi, 1975). Actomyosin wurde präpariert, um die Calciumkonzentration zu ermitteln, die mutmaßlich in den Muskeln zur Kontraktion führt. Die Werte sollten dann mit den calciumabhängigen Aktivitäten der beiden Gelsolin-Isoformen verglichen werden.

Die enzymatische Aktivität wurde nach der Methode von Fiske & Subarow ermittelt werden. Das Prinzip beruht auf der Bildung eines aus der ATP-Hydrolyse resultierenden anorganischen Phosphates, das mit Molybdat unter reduzierenden Bedingungen einen blauen Komplex bildet. Das freigesetzte Phosphat wurde dann photometrisch gemessen werden, eine Referenz ermöglichte dann die Ermittlung der absoluten Phosphatmenge, die freigesetzt wurde. Es wurden Standardreaktionsansätze (0,1mg/ml Actomyosin, 2mM MgCl₂, 20mM Imidazol, 40mM KCl, 1mM ATP, pH 7.0) in Gegenwart variabler Calciumkonzentrationen gemessen.

Eine calciumabhängige ATPase-Aktivität wurde bei einer Ionenstärke von 40mM KCl nur im Falle des Actomyosins aus dem Scherenmuskel ermittelt, der abdominale Muskel zeigte calciumunabhängige Fragmentationsaktivität. Daher wurden die Aktivitäten in Gegenwart unterschiedlicher Ionenbedingungen (40, 60, 90, 120, 150mM KCl) gemessen. Ab einer Ionenstärke von 70mM KCl zeigte auch Actomyosin aus dem *Flexor*-Muskel eine calciumabhängige Aktivität. In Gegenwart von 90 und 120 mM KCl konnte für die beiden Actomyosine eine maximale Calciumsensitivität festgestellt werden. Die Aktivitäten der beiden Actomyosine sind in Abbildung 3.3.10 dargestellt. Zum Vergleich der Calciumabhängigkeiten wurden die Aktivitäten der HG-Isoformen aus Abb.3.3.6 übertragen. Da HG₁ hauptsächlich im abdominalen Muskelgewebe und HG₂ anteilig stärker im *Crusher closer* exprimiert wird, wurden die ermittelten Daten der Isoformen auch einzeln in die jeweiligen Graphen integriert.

Die Aktivierungsschwelle für die ActomyosinATPase des abdominalen Muskels lag bei $\sim 3 \cdot 10^{-7}$ M Ca²⁺ und damit ~ 5 fach höher, als die des Scherenmuskels ($\sim 8 \cdot 10^{-8}$ M Ca²⁺). Eine halbmaximale Aktivierung der Flexor-ActomyosinATPase benötigte $7 \cdot 10^{-7}$ M Ca²⁺, die des Scherenmuskels $3 \cdot 10^{-7}$ M Ca²⁺. Bei einer Calciumkonzentration von $\sim 8 \cdot 10^{-6}$ M Ca²⁺ lag bei beiden Actomyosinen eine 100%ige Aktivität vor. Die isolierten Actomyosine benötigten beide für eine halbmaximale Aktivitäten 2-3 fach weniger Calciumionen, als die vergleichbare Aktivität der jeweiligen Isoform ermittelt wurde. Vergleichsweise übereinstimmend zeigte sich, dass sich die Calciumkonzentration für die halbmaximale Aktivität der beiden Actomyosine um das 5-6 fache unterscheidet, dieser Faktor wurde auch für eine vergleichbare Aktivität der beiden Isoformen festgestellt. Die proportionale Übereinstimmung zeigt eine höhere Calciumsensitivität von HG₂ und der Actomyosin-ATPase in dem langsam kontrahierenden *Crusher closer*-Muskel (S₂-Muskelfasertyp).

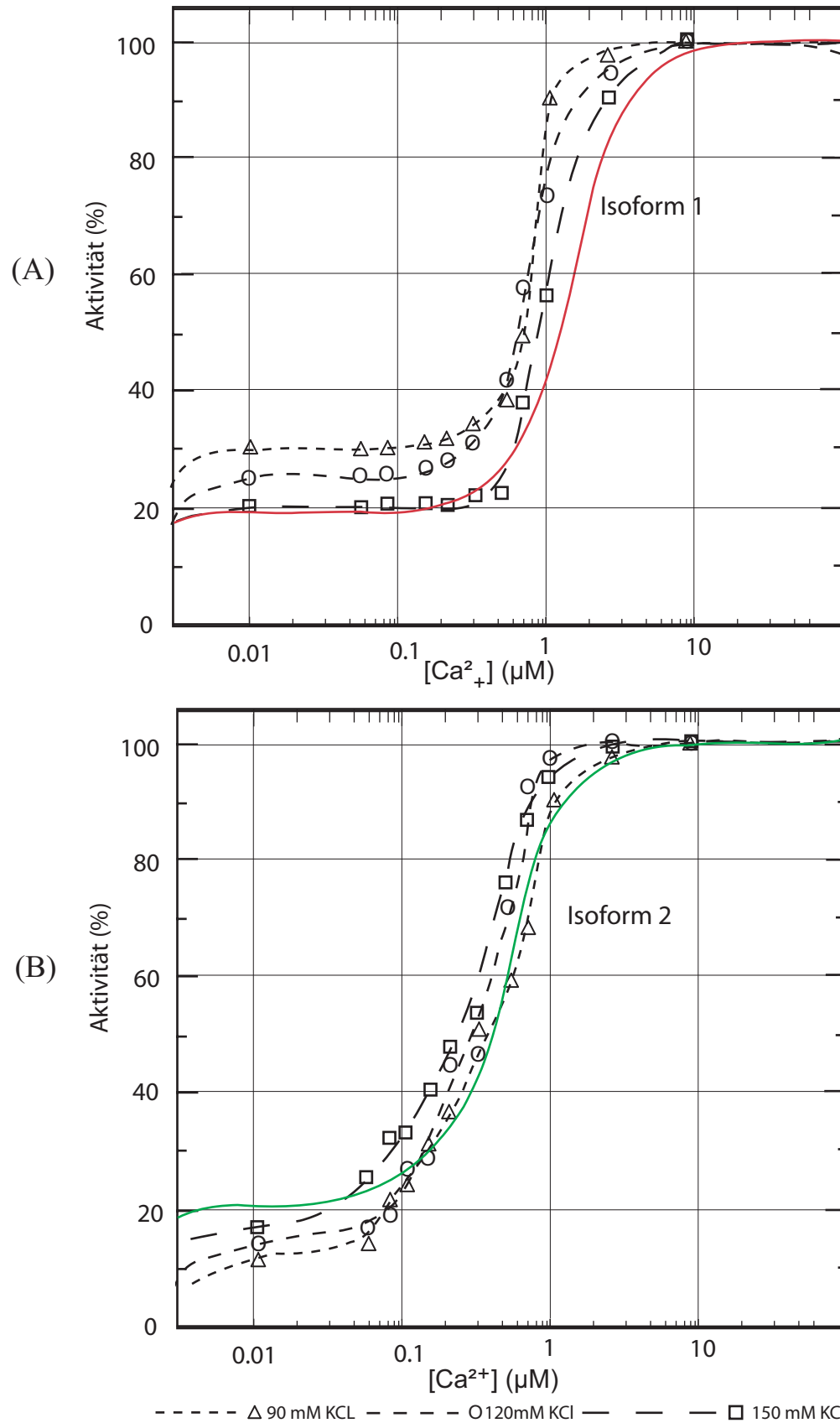


Abb. 3.3.10: Calciumabhängigkeit der Isoform-Actin Interaktion im Vergleich zu der Aktivität von Actomyosin des abdominalen Flexormuskels (A) und des Scherenschließmuskels der Brechscherre (B)

Die Aktivität von Actomyosin wurde in Gegenwart variabler Calciumkonzentrationen durch ein Calcium-EGTA-Puffersystem ermittelt, die Messungen wurden jeweils in Gegenwart von drei unterschiedlichen Ionenstärken ausgeführt. Zum Vergleich wurden den beiden Muskeln, in denen die Isoformen vorzugsweise exprimiert werden, die Aktivitäten der Isoformen (aus Abb.3.3.6) zugeordnet.

3.3.5 Cosedimentation der Gelsolin-Isoformen mit F-Actin

Um die Ca^{2+} konzentrationsabhängige, unterschiedliche Bindung der beiden Gelsoline an Aktinfilamente *in vivo* zu untersuchen, wurde eine Cosedimentationsanalyse vorgenommen. Ganzmuskelpollen wurden dazu in Gegenwart distinkter Calciumkonzentrationen homogenisiert. Durch anschließende Ultrazentrifugation wurde dann mit Actinfilamenten komplexiertes Gelsolin sedimentiert.

200 mg Flexormuskel wurden in 2 ml Calcium-EGTA-Puffer homogenisiert und für 2h bei 100.000g zentrifugiert. Es entstand eine im Bezug auf die Calciumbedingungen aufsteigende Probenreihe, von den Überständen und den Pellets wurden Proteinbestimmungen durchgeführt und je 20 μg in einem 12,5%igem Polyacrylamidgel nebeneinander aufgetrennt (Abb.3.3.11).

Das Coomassie-gefärbte Gel zeigte deutlich die Trennung von Überstand (Lane 1-10) und Pellet (11-20). Um die Verteilung der Gelsolin-Isoformen zu ermitteln wurde ein Immunblot angefertigt. Es zeigte sich für die beiden Isoformen unterschiedliche Verteilungen, die Isoform 1 wurde durch anti HG-Antikörper in Pelletproben ab $5,4 * 10^{-7} \text{ M Ca}^{2+}$, Isoform 2 wurde bereits in Proben nachgewiesen, die in Gegenwart von $1,4 * 10^{-7} \text{ M Ca}^{2+}$ homogenisiert worden waren. Unterhalb dieser Konzentrationen konnten die beiden Gelsoline in Proben des Überstandes ermittelt werden: Bis $3,7 * 10^{-7} \text{ M}$ wurde HG_1 durch den Antikörper markiert, Isoform 2 hingegen nur in der Supernatant-Probe $7,8 * 10^{-8} \text{ M Ca}^{2+}$.

Die Bedingungen setzen voraus, dass F-Actin sich vorwiegend im Pellet befand, während G-Actin und Oligomere durch die Ultrazentrifugation nicht sedimentiert wurden. Der Befund implizierte folglich nicht nur die unterschiedliche Bindung der Isoformen in Abhängigkeit von Ca^{2+} an filamentöses Actin, sondern auch niedrigen cytosolische Aktivierungsschwellen für die Hummergelsoline *in vivo*. Die Bindung von Mammaliagelsolin an F-Aktin wird u.a. auch durch saure Phospholipide moduliert. Für Crustaceenmuskeln ist eine solche Regulation durch Phosphoinositide unbekannt, eine Sequestrierung der Gelsoline von filamentösem Actin könnte jedoch auch hier möglich gewesen sein. Moleküle mit diesen Eigenschaften könnten durch die Homogenisierung der Muskeln an der Actin-Gelsolin Interaktion partizipieren. Daher kann ein Effekt auf die Cosedimentation nicht ausgeschlossen werden.

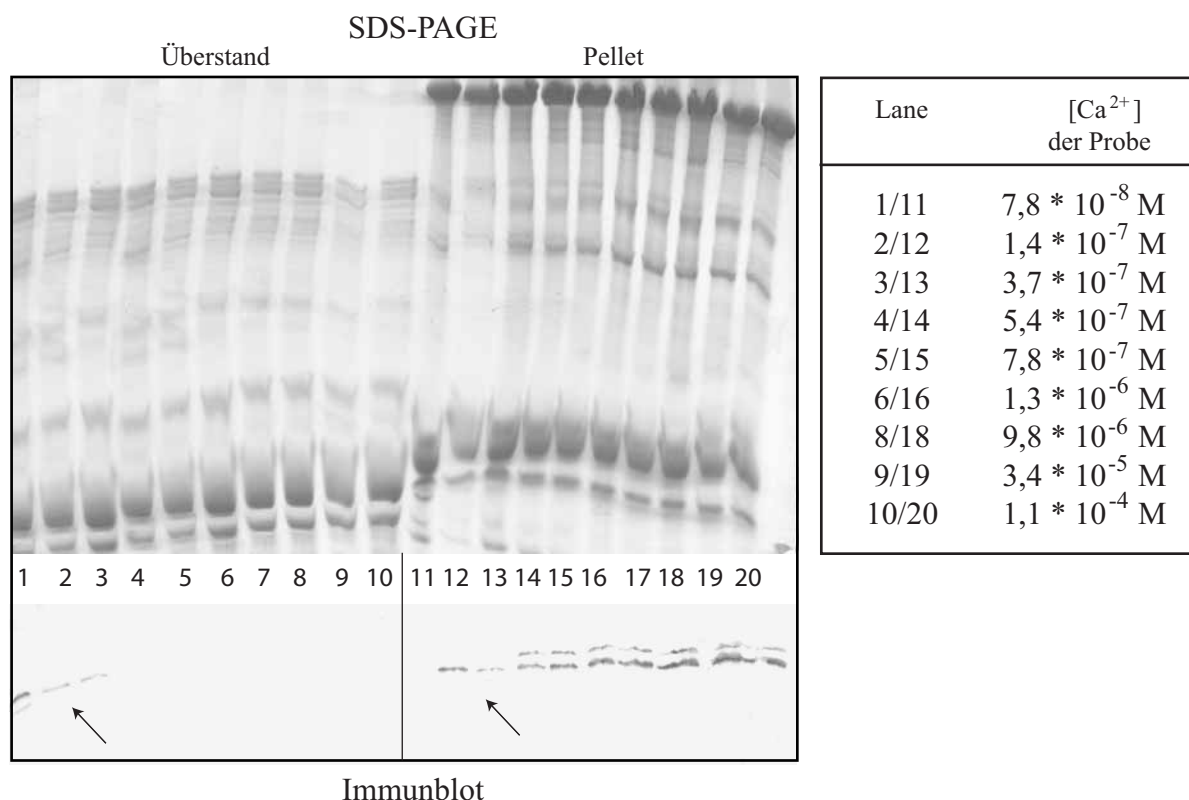


Abb. 3.3.11: Komplexierung der Gelsoline mit F-Actin im abdominalen Flexormuskels bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen

Ganzmuskelprouben wurden bei definierten Calciumkonzentrationen homogenisiert und durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Proben aus dem Überstand (1-10) und dem Pellet wurden gleichmäßig (20µg) in einem 12,5%igem SDS-Gel aufgetrennt, gefärbt und im Immunblot auf die Präsenz der einzelnen Isoformen untersucht. Die Varianten sedimentierten bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen.

Die vorliegenden, molekularen Bindungsstudien zeigten die Interaktion der beiden Hummergelsoline mit globulärem und filamentösem Actin *in vitro*. Während sich für die Interaktion mit G-Actin kein Unterschied bezüglich der Isoformen ermitteln ließ, konnten unterschiedliche Calciumkonzentrationen für die Bindung und Aktivität der Isoformen ermittelt werden.

Die Befunde aus den Cosedimentationsexperimenten deuten auf eine *in vivo* Assoziation von Hummergelsolinen unter normalen physiologischen Bedingungen an Actinfilamente. Studien zur Verteilung der Actinmodulatoren in intakten Muskelsystemen mittels Licht- und elektronenmikroskopischer Verfahren sollten nicht nur diesen Befund untermauern, sondern auch die Verteilung der Gelsoline in weiteren Muskelsystemen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen visualisieren.

3.4 Immunlokalisation von Gelsolin in verschiedenen Muskeln von *Homarus americanus*

Immunhistologische Studien zur Lokalisation von Gelsolin in Zellen haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Gelsolin wurde auf der einen Seite in lateraler Assoziation mit actinhaltigen Strukturen nachgewiesen (Rouayarence *et al.*, 1984; Gonsior & Hinssen, 1994), andererseits wurde es intrazellulär diffus vorliegend lokalisiert (Carron *et al.*, 1984; Cooper, *et al.*, 1988). Durch indirekte immunohistochemische Techniken konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Gelsolin außer in Nichtmuskelzellen, auch in Glatt-, Herz- und Skelettmuskeln von Mammaliern in vergleichsweise großen Mengen vorhanden ist (Yin *et al.*, 1981).

Für die vorliegenden Lokalisationsexperimente wurden vorwiegend zwei Muskelfasertypen gewählt, die in ihren morphologischen Eigenschaften und biochemischen Profilen als sehr unterschiedlich klassifiziert wurden (3.1). Der langsamkontrahierende Scherenmuskel und der schnelle, abdominalen Flexormuskel zeigten in der Immunanalyse (Abb.3.1.1) die Präsenz beider Isoformen in unterschiedlichen Verhältnissen. Um in unterschiedlichen Muskeltypen die Isoformen zu lokalisieren, wurde der polyklonale HG₂-Antikörper hergestellt. Trotz intensiver Bemühungen diesen Antikörper isoformspezifisch durch verschiedene Verfahren aufzureinigen, konnte kein Antiserum hergestellt werden, welches nachweislich (Immunblot) ausschließlich mit nur einer Isoform reagierte (Abb.3.1.2). Folglich beziehen sich nachfolgende Markierungen auf die Antigene beider Isoformen.

3.4.1 Immunhistologische Lokalisation von Gelsolin

Einem frisch getötetem Hummer wurde Muskelproben des abdominalen *Extensors* entnommen, in physiologischer Ringerlösung mechanisch expandiert und auf planen Korkscheiben mit TissueTec[®] überzogen. Die Proben wurden dann sofort in flüssigem Propan eingefroren. Es wurden Kryoschnitte von 3µm Durchmesser angefertigt und nach kurzer Fixierung mit 4% PFA mit Gelsolin Antikörpern unter Agitation markiert. Als Sekundäntikörper wurden TRITC-gekoppelte Antikörper verwendet.

Die Markierung von longitudinal orientierten Schnitten sind in Abbildung 3.4.1 dargestellt. Am konfokalen Laserscannmikroskop ließ sich eine deutliche periodische Markierung beobachten. Die vergrößerte Fluoreszenzaufnahme (3.4.1C) aus der Übersicht (3.4.1A) ermöglicht mittels korrespondierender Phasenkontrastaufnahmen,

eine Zuordnung der intensiven Markierungen zu den I-Banden der Sarkomere. In vielen Bereichen ist eine schwächere Markierung des AI-Bereichs zu beobachten. In einigen zentral-sarkomerischen Bereichen ist keine Färbung mehr erkennbar, dieser Bereich wird möglicherweise durch die H-Zone repräsentiert, in der keine Actinfilamente lokalisiert sind (3.4.1C, D, Pfeile). Auch innerhalb benachbarter I-Banden konnten dünnfädige, unmarkierte Bereiche beobachtet werden, die im Phasenkontrast als Z-Scheiben identifiziert wurden. Die inhomogenen Färbungen des Actins aus der AI-Bande könnten auf die Präsenz von dicken und dünnen Filamenten zurückgeführt werden, die an der Schnittoberfläche möglicherweise eine sterische Inhibition der Antikörperbindungen erzeugten.

Confokale Immunfluoreszenzaufnahmen von Gelsolin-gefärbten, transversalen Kryoschnitten der abdominalen *Extensormuskulatur* zeigen die Markierungen der gesamten Muskelzellen (Abb.3.4.1 E, F). Die Färbung erscheint inhomogen, was auf die unterschiedliche Exposition actinhaltiger Banden in Abwechslung mit Bereichen ohne Actin zurückzuführen sein könnte. Das Auflösungsvermögen der lichtmikroskopischen Analyse reichte hier nicht aus, um Aussagen über die im Sarkomerquerschnitt getroffenen Bereiche zu treffen.

Die lichtmikroskopischen Immunfluoreszenzaufnahmen implizierten eine Kollokalisation von Hummergelsolin und Actin in den I-Bereichen der Sarkomere. Diese Beobachtungen wurden bereits für Mammaliagelsolin gemacht (Dissmann & Hinssen, 1994) Es konnte nicht geklärt werden, ob Gelsolin direkt an Actinfilamenten assoziiert ist und ob es homogen entlang der gesamten dünnen Filamente vorliegt. Die vorgelegten Beobachtungen wurden daher auf immunelektronenmikroskopischen Studien an verschiedenen Muskeln ausgeweitet.

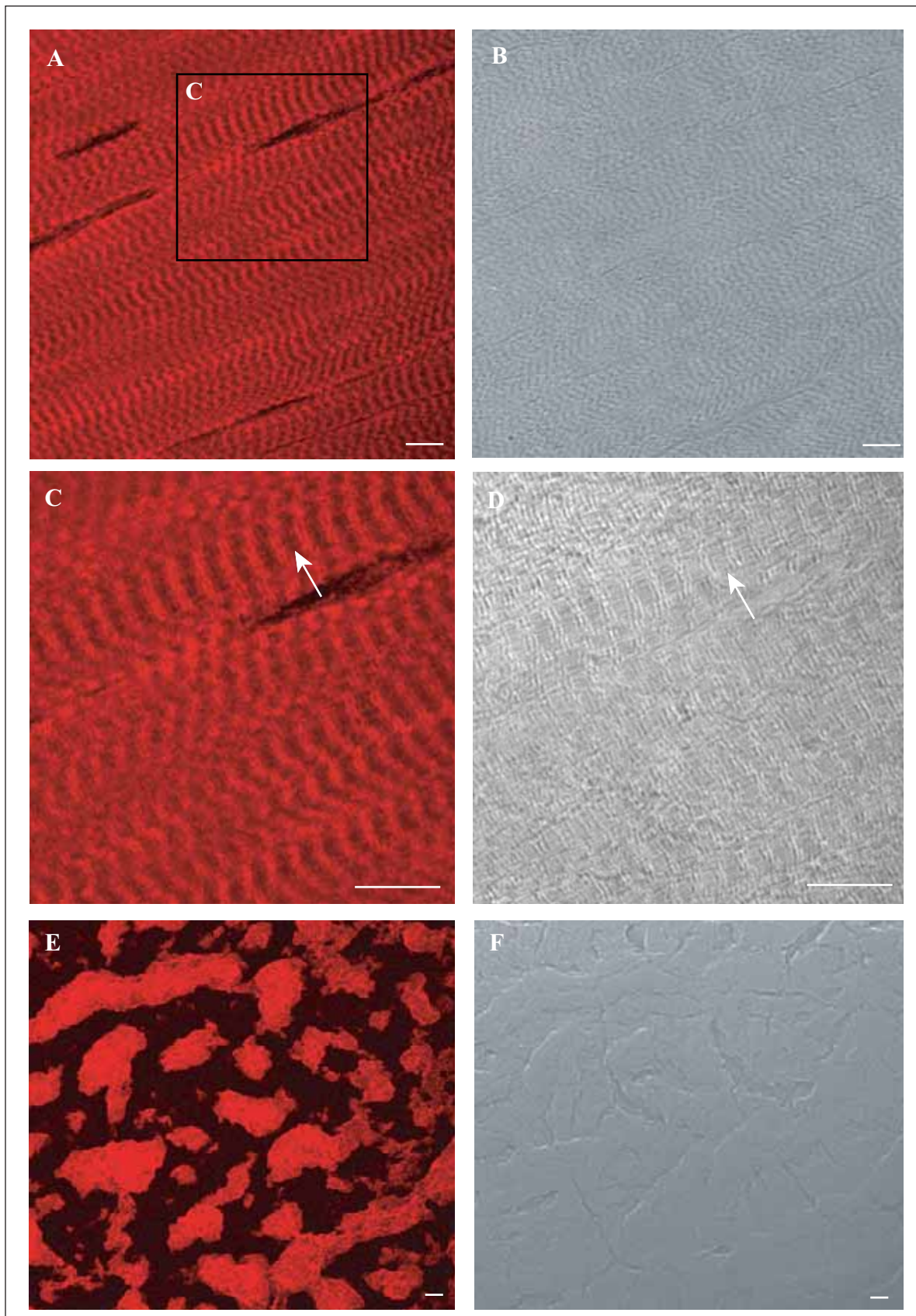


Abb 3.4.1: cLSM, Immunlokalisierung von Gelsolin in der abdominalen *Extensor-* muskulatur

Von expandierten Muskeln wurden longitudinale (A-D) und transversale (E,F) Kryoschnitte angefertigt und mit Gelsolin und einem TRITC-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt.

A-D: Neben einer intensiven Färbung der I-Bereich wurden ebenfalls AI-Bereiche markiert. Die Pfeile deuten auf unmarkierte Bereiche, die H-Zonen. E, F: In Querschnitten wurden gesamte Muskelzellen inhomogen angefärbt. A,C Fluoreszenzaufnahme, B,D Phasenkontrast, Balken: 10 μm

3.4.2 Zur Ultrastruktur der Abdominalen- und Scherenmuskulatur

Um ultrastrukturelle Analysen zur Lokalisation von Gelsolin durchzuführen wurden zunächst Präparate hergestellt, in denen eine weitgehende Strukturhaltung im Vordergrund stand. Immunfärbungen können nur sehr beschränkt an Präparaten durchgeführt werden, die mit starken Fixativen (Glutaraldehyden, OsO₄) behandelt wurden, ohne die Antigenität und damit die hier zu beobachtbaren Partikelzahlen zu minimieren. Gleichsam verringert sich die strukturelle Integrität der Präparate bei „weichen“ und kurzen Fixierungsprozeduren. Neben Glykogen und Mitochondrien erwiesen sich besonders actinhaltige Strukturen als schnell proteolysierende Bestandteile der Muskelzellen. Es sollte also zunächst eine optimale Strukturhaltung zum Studium der unterschiedlichen Muskelphänotypen erzielt und für die Immunlokalisation ein optimaler Kompromiss zwischen Antigen- und Strukturhaltung gefunden werden.

Aus den Übersichtsaufnahmen der stark expandierten und glutaraldehydfixierten Muskelproben des *Extensor*-Muskels (Abb.3.4.2) und des Scherenschließmuskels der Brechschere (*Crusher-closer*-Muskel, Abb.:3.4.3) werden grundsätzlich durch Myofibrillen dicht gepackte Zellen deutlich. Die Zellkerne befinden sich immer randständig unterhalb des Sarkolemmas und werden, wie auch die Myofibrillen, von zahlreichen Mitochondrien, granulärem Glykogen und Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums umgeben.

Die Myofibrillen des schnell kontrahierenden, abdominalen Muskels weisen kurze Sarkomere (2-4 µm) mit geradlinigen Z-Scheiben auf (Abb.3.4.2A-D). Sie sind im Vergleich zu Myofibrillen des Scherenschließmuskels breiter, in einigen Bereichen konnten Durchmesser bis 8 µm beobachtet werden (Abb.3.4.2C). Innerhalb der expandierten Sarkomere wurden Längen der dünnen Filamente von ~1,5 µm ermittelt, die Länge dicker Myosinfilamente beträgt ~2,2 µm. Auffällig erscheinen durch Expandierung sichtbare H-Zonen in der Mitte der elektronendunklen AI-Bande, die in Präparaten des Scherenschließmuskels weit weniger deutlich hervortreten. Die zentralen, actinfreien H-Zonen des abdominalen Muskels weisen Längen von ~720 nm auf. In deren Mitte konnte auch ein schmaler Bereich beobachtet werden, bei dem es sich um eine M-Linie handeln könnte. Aus Mammaliamuskelsystemen ist bekannt, dass die in der Mitte der Sarkomere lokalisierte M-Linie die Myosinfilamente über verschiedene Strukturproteine (z.B. M-Protein) miteinander verbindet. In trans-

versalen Schnitten sind zwischen den Myofibrillen die verzweigten Tubuli-Systeme im Kontakt mit Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums gut erkennbar, sie sind als Triaden bekannt. Diese Spezialisierungen bringen über die Membransysteme die Weiterleitung elektrische Anregungspotentiale die Ausschüttung interner Calciumionen in Einklang. Im Vergleich zum Brechscherenschließmuskel erscheint das sarkoplasmatische Retikulum in diesem Muskel weit stärker ausgebildet (Abb.: 3.4.2E). In Form von Di- und Triaden sind die Tubuli-Verzweigungen zwischen A und I-Banden, gelegentlich auch in Höhe der Z-Scheibe lokalisiert. Die Vergrößerung (Abb.:3.4.5 F) zeigt in Invertebraten häufig auftretende elektronenhelle, hohle Kernbereich der Myosinfilamente ($\varnothing \sim 20\text{nm}$), die in der Sarkomermitte (*bare-zone* der Myosinfilamente) dunkel erscheinen (hier nicht gezeigt). Die Filamente des rapide kontrahierenden, abdominalen *Extensor*-Muskels sind in klarer hexagonaler Anordnung orientiert und weisen ein niedriges Verhältnis (6:1) von dünnen zu dicken Filamenten auf (F, Inset).

Ultradünnschnitten des M. adductor dactylopoditis (Brechscheren-Muskel) sind in Abbildung 3.4.3 dargestellt. Der Muskel weist im expandierten Zustand Sarkomere von 10–12 μm Länge auf, die kontraktiellen Einheiten sind aber vergleichsweise nicht so periodisch übereinander liegend angeordnet, wie im abdominalen Muskelgewebe (Abb.:3.4.3A,B). Die Z-Scheiben sind wellig, in unmittelbarer Nähe scheinen die Aktinfilamente beidseitig der Scheiben zu verkleben (Abb.:3.4.3C), im weiteren Verlauf der I-Bande zeigen sie deutlich parallele Orientierungen (Abb.:3.4.3D). Die Aggregation stellt möglicherweise eine Folge der starken Expandierungen vor der Fixierung dar. Anhand der expandierten Präparate wurde die A-Bande mit einer Länge von $\sim 6,4 \mu\text{m}$ und die I-Bande mit $3,6 \mu\text{m}$ Länge vermessen. Der Scherenschließmuskel besitzt Filamente von bis zu vierfacher Länge gegenüber den Filamenten aus dem Muskel des Abdomens. Die H-Zonen treten trotz starker Expandierung weniger deutlich in Erscheinung (Abb.:3.4.3C, E), konnten aber durch die Abwesenheit von dünnen Filamenten bei hohen Vergrößerungen identifiziert werden. Im Querschnitt zeigt sich ein hohes Verhältnis (12:1) von Actin zu Myosinfilamenten (Abb.:3.4.3F, Inset). Diese unterschiedlichen Verhältnisse von dünnen und dicken Filamenten zwischen den schnellen- und langsamen Muskeltypen (S2-Typ) werden zusätzlich durch distinkte aufgebaute Myosinfilamente unterstrichen, die sich beispielsweise in dickeren Myosinfilamenten ($\varnothing \sim 30\text{nm}$) des *Crusher*-Muskels beobachten ließen.

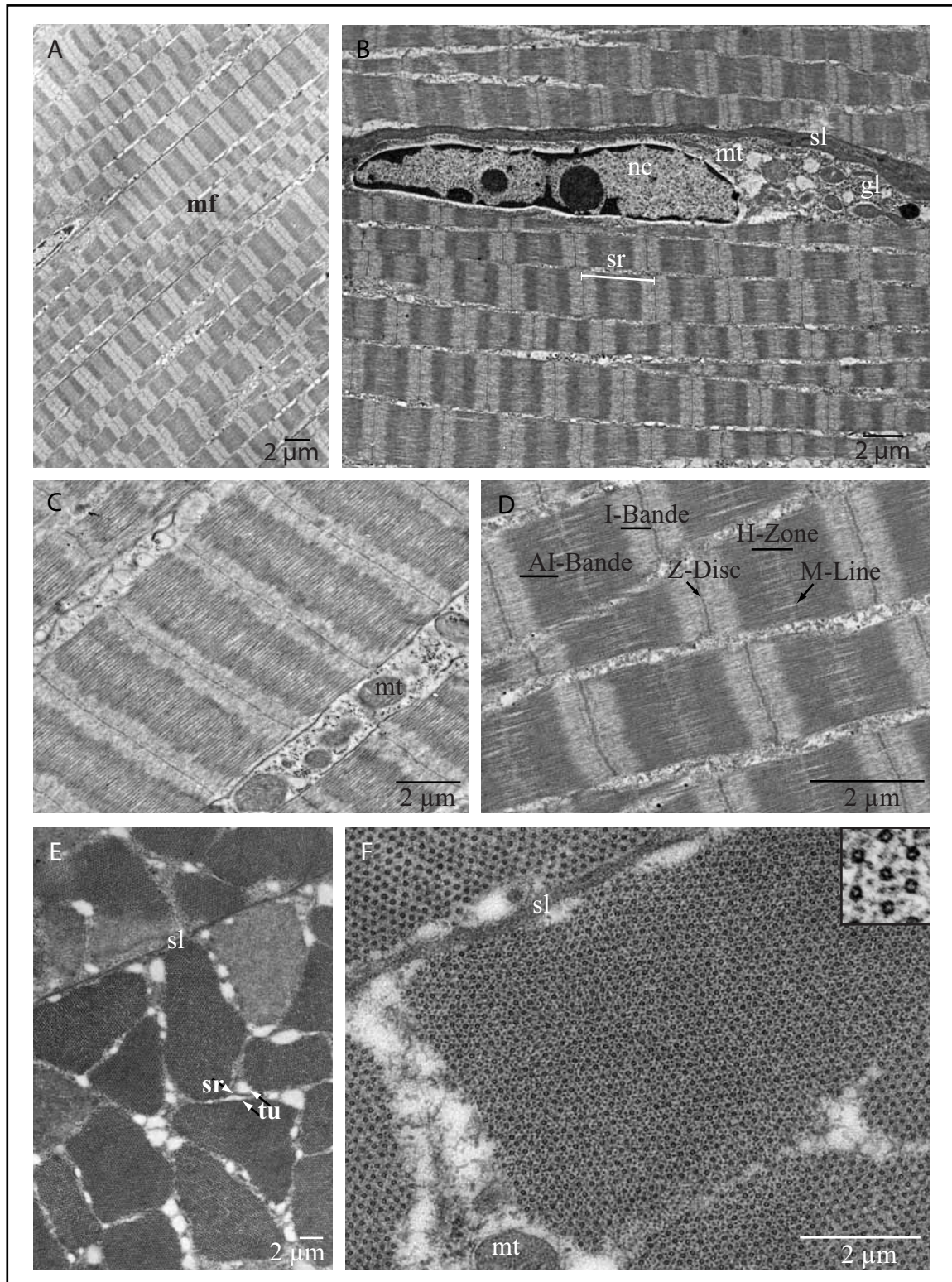


Abb.3.4.2: TEM, Longitudinale und transversale Aufnahmen der abdominalen Extensor- (A, C, E, F) und Flexormuskeln (B, D)

Die expandierten Myofibrillen (**mf**) sind mit kurzen Sarkomeren (**sr**, 2,5-3,5 µm) ausgestattet und von Bändern aus Glycogen (**gl**), Mitochondrien (**mt**), Cisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (**sr**) und deren eng assoziierten Tubuliverzweigungen (**tu**) umgeben. Die kontraktiellen Einheiten erscheinen oftmals dicker als lang (**A, C**). Sie sind durch geradlinige Z-Scheiben begrenzt. Durch die Expandierung wurden in der Mitte der Sarkomere H-Zonen sichtbar. Die als schnell kategorisierten Fasern sind durch ein geringes Verhältnis von dünnen und dicken Filamenten charakterisiert (**F, inset**). **sl**: Sarkolemma

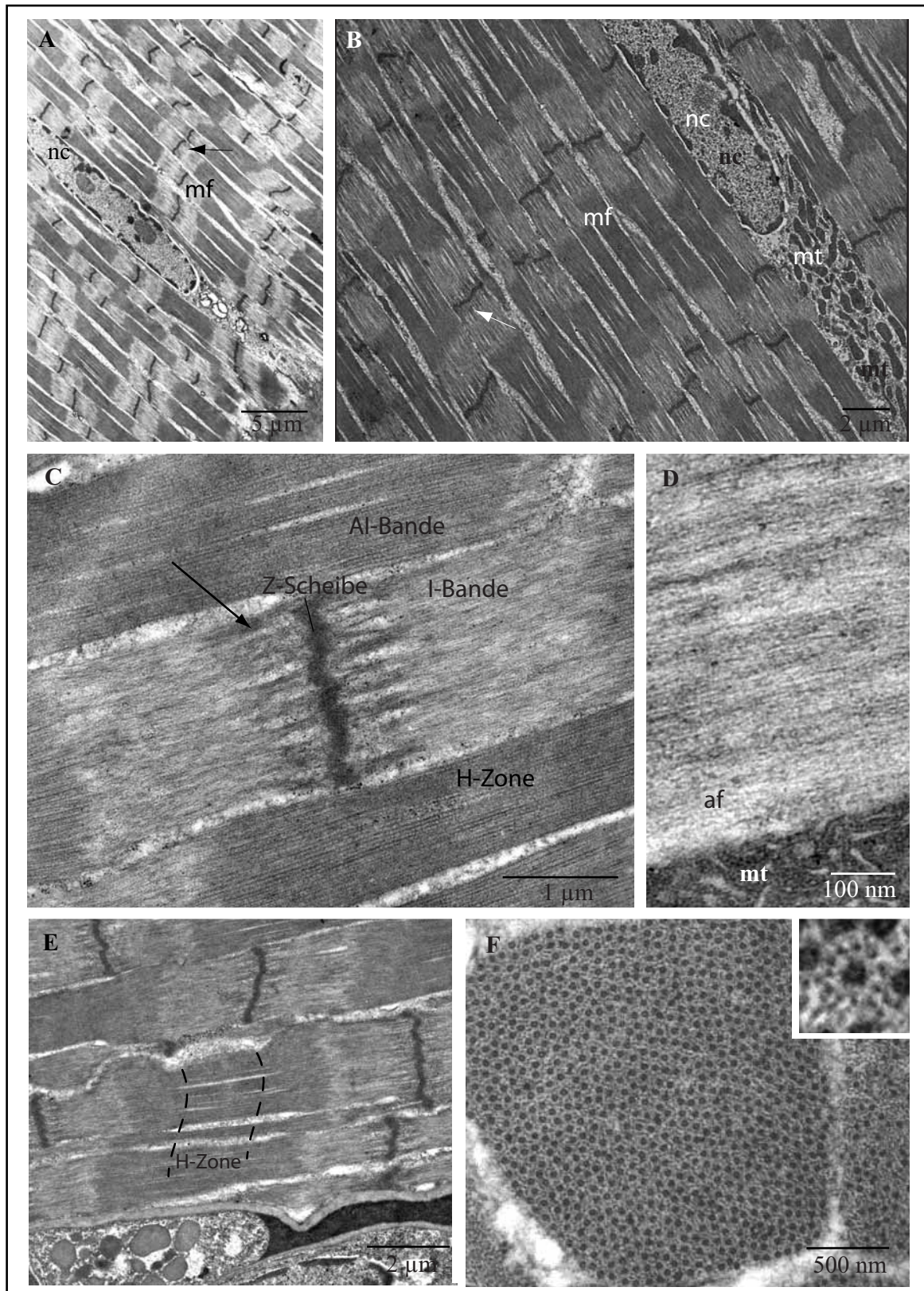


Abb.3.4.3: TEM, Architektur des *M. adductor dactylopoditis* (Brecht, *Crusher closer*) Der expandierte Scherenschließmuskel zeigt im Vergleich zum schnellen Muskelgewebe eine unregelmäßigere Organisation der Myofibrillen (**mf**, **A**, **B**). Die dünnen Actinfilamente (**af**, **C**, **D**) der große Sarkomere (9-12 µm) sind in welligen *Z-discs* (**A-E**) verankert, in deren Nähe sie möglicherweise -expansionsbedingt- aggregierten (**A-C**, Pfeil). Die H-Zonen sind nicht so deutlich sichtbar, wie in schnellen, abdominalen Muskeln (**C**, **E**). In dem tonischen Muskelfasern ist ein hohes Verhältnis von Actin- und Myosinfilamenten (**F**, **Inlet**) etabliert.

3.4.3 Immunelektronenmikroskopische Lokalisation von Gelsolin

Einem frisch getötetem Hummer wurde die Brechschere entnommen, die Hämolymphe entfernt und die Schere mit 4% PFA in Ringerlösung über 4h auf Eis perfundiert. Um das Schließen der Scheren zu vermeiden und den Erhalt expandierter Sarkomere zu gewährleisten wurde *praemortis* den Klauen der Schere ein Gummistopfen zwischengefügt. Nach der Fixierung wurde die Schere basal halbkreisförmig eröffnet und Muskelproben des M. adductor dactylopoditis entnommen. Das Abdomen wurde ebenfalls entnommen und das Telson entfernt. Auf der dorsalen und ventralen Seite wurde jeweils die sklerotisierte Chitinkutikula von proximal nach distal in der Mitte aufgeschnitten und das Abdomen so in zwei Hälften eröffnete. Das ermöglicht eine Probenentnahme ohne Verletzung der Gefäße oder des Muskelgewebes. Die beiden Hälften wurden so auf Holzstäbchen gespannt, sodass in der abdominalen Muskulatur ein maximaler Kontraktionsgrad erreicht wurde, der dem Tier auch *in vivo* möglich war. Die Hälften wurden sofort vollständig für 4h in 4% PFA in Ringerlösung auf Eis fixiert, das Fixativ nach 2h vollständig gewechselt.

Vollständig fixierte Muskelproben wurden in LRWhite eingebettet. In der Ultramikrotomie wurden Schnitte silbergrauer Interferenz (~60 nm Dicke) hergestellt und mit Gelsolinantikörpern und einem Gold-konjugierten Zweitantikörpern inkubiert. Es wurden Zweitantikörper mit verschiedenen großen Goldpartikeln (1, 5, 10, 20 nm) verwendet, um die beobachtbaren Partikelzahlen zu studieren. Final wurde ein 10nm Gold-konjugierter Zweitantikörper eingesetzt, da mit ihm ein sinnvoller Kompromiss aus Sichtbarkeit und Partikelzahl (Dichte/Fläche) erzielt werden konnte. Nach der Kontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat (Reynolds, 1963) wurden die Schnitte am Elektronenmikroskop analysiert und mit der digitalen Software ANALYSIS[®] ausgewertet. Für die Auswertung wurden Schwellenwertdefinitionen (Ø10nm, rundlich, schwarz) festgelegt und ROIs (*regions of interest*) definiert. Damit konnten die Partikelzahlen in gewünschten Bereichen ermittelt und zugeordnet werden. Zur Übersichtlichkeit nachfolgenden Abbildungen wurden jeweils fortlaufende Buchstaben verwendet, bei denen Übersichtsaufnahmen jeweils durch Große und Vergrößerungen/Ausschnitte durch kleine Symbole gekennzeichnet wurden.

Abbildung 3.4.4 gibt eine Zusammenstellung von Aufnahmen der Immunlokalisation von Gelsolin im *Extensor*-Muskel wieder. Aus Bereichen des Muskelschnittes, der eine Übersicht darstellt (Abb.:3.4.4A), wurden vergrößerte Aufnahmen gemacht, die das Immunlabel der A-Bande (Abb.:a, b, d) und der I-Bande (c) zeigen. Eine Markierung der Schnitte durch Immunogoldpartikel, die nachträglich durch ein Nanoprobes *Gold enhancement*TM Verfahren vergrößert wurden, ist in Abbildung 3.4.4.B dargestellt.

Die meisten Partikel konnten auf den Myofibrillen lokalisiert werden, das zentrale Myoplasma wurde geringer als die Myofibrillen markiert und nur sehr wenige Partikel wurden auf zellulären Kompartimenten wie dem Zellkern oder den Mitochondrien beobachtet.

Der erste Schritt der Quantifizierung eines spezifischen Labels bestand in der Ermittlung der Goldpartikel auf den Ultradünnschnitten im und außerhalb des Präparates. Auf dem Schnittbereichen, wo keine eingebetteten Strukturen vorhanden waren, wurden nur vereinzelte Partikel beobachtet; auch in extrazellulären Bereichen wurden nur wenige Partikel ermittelt. Innerhalb der Muskelzellen konnten zahlreiche Partikel *detektiert* werden, die an Filamente gebunden waren. An nicht-sarcomerischen Strukturen wurden ebenfalls wenige Goldkörnchen gefunden. Insgesamt wurden dann über 50 μm^2 myofibrilläre und nicht sarcomerische Bereiche als ROIs definiert und ausgewertet. Durch Analysen verschiedener Schnitte des abdominalen Muskels, welche mit dem polyklonalen anti HG₁ Serum inkubiert wurden, konnten durchschnittlich 54,8 (+/- 3,7) Partikel/ μm^2 auf Myofibrillen und 5,7 (+/- 0,6) Partikel/ μm^2 in cytosolischen Bereichen gezählt werden. Es zeigte sich, dass 89,6% aller detektierten Partikel mit den Myofibrillen assoziiert waren. Markierungsversuche mit Goldpartikelverstärkungen wurden nicht in die Analyse einbezogen.

Es wurden weitere Präparate angefertigt, die mit 15min mit Blockierungslösung und einem affinitätsgereinigten HG₁ Antikörper inkubiert wurden. Um die intra-myofibrillären Verteilungsmuster zu analysieren wurden innerhalb von 30 Sarkomeren ROIs auf der I-, AI- und H-Bande ausgewertet. Auf den Z-Scheiben wurden nur sehr wenige Goldpartikel beobachtet. Es konnte eine vollständige Markierung der dünnen Filamente ermittelt werden, auf den I-Banden wurden 24,8 (+/- 2,7) Partikel, auf den A-Banden 23,1 (+/-1,3) Partikel gezählt. Auf den H-Zonen wurden nur 1,9 (+/- 0,6) Partikel/ μm^2 ermittelt. Die H-Zonen blieben folglich durch

die Markierung weitgehend partikelfrei. Durch Inkubationen von Ultradünnschnitten unter verschiedenen Bedingungen (Blockierungslösungen, Partikelgröße) konnte oftmals eine deutliche Assoziation bis zu 90% aller Partikel an den dünnen Filamenten beobachtet werden. Innerhalb der Sarkomere wurden Partikel fast ausschließlich in Bereichen actinhaltiger Strukturen ermittelt.

Um die erhaltenen Befunde zu bestätigen, wurden Ultradünnschnitte des *Crusher closer*-Muskels mit HG₂-Antikörpern und einem 10nm Gold-konjugiertem Zweitantikörper inkubiert. Vergrößerungen aus der Übersicht (Abb.:3.4.5A) zeigen ein dichtes Band von Goldpartikeln sowohl in der I-, als auch in der A-Bande (b-d). An expandierten Scherenschließmuskelfibrillen ist die H-Zone nicht so eindeutig sichtbar, wie im abdominalen Muskel, dennoch konnten auf den Schnitten ebenfalls zentral-sarkomerische Bereiche ohne dünne Actinfilamente ermittelt und die die Partikelzahlen analysiert werden. Partikelabundanz wurden innerhalb gesetzter ROIs ausgewertet: Ein genereller Vergleich zwischen myofibrillären und cytosolischen Strukturen hinsichtlich assoziierter Partikel zeigte, dass 88,7% aller Partikel auf sarkomerischen Bereichen der Myofibrillen vorlagen. Aus den Zählungen ergaben sich 68,7 (+/- 5,2) Partikel/ μm^2 auf sarcomerischen- und 7,8 (+/- 0,7) in cytosolischen Zwischenräumen.

Auffällig erscheinen lokale Bereiche nahe den Z-Scheiben des Crusermuskels, an denen sich nur sehr wenige Goldpartikel ausmachen lassen (C). Elektronenmikroskopische Beobachtungen bei hoher Vergrößerung (Abb.: 3.3.6) zeigten die bereits erwähnte Aggregation dünner Filament. Möglicherweise wurden Epitope für die Bindung durch den verwendeten HG₂ Antikörper verdeckt. Dieser Bereich kann aber als Untermauerung der Spezifität des Labels der kontinuierlich anschließenden, parallel orientierten Actinfilamenten gedeutet werden, da dieser Bereich intensiv markiert wurde. Der Bereich der I-Bande mit aggregierten Filamenten wurde nicht in die Analyse miteinbezogen.

Die Analyse der intrasarcomerische Partikelverteilung erfolgte in gleicher Weise, wie auf den Ultradünnschnitten der abdominalen Muskulatur. Es zeigte sich, dass 72,4 (+/- 8,1) Partikel/ μm^2 auf den I-Banden und 51,4 (+/- 7,2) auf den A-Banden lokalisiert waren. 14,2 (+/- 1,8) Goldpartikel konnten den H-Banden zugeordnet werden. Alle ausgezählten Partikel sind in der Abbildung 3.4.7 (S.110) morphometrisch wiedergegeben.

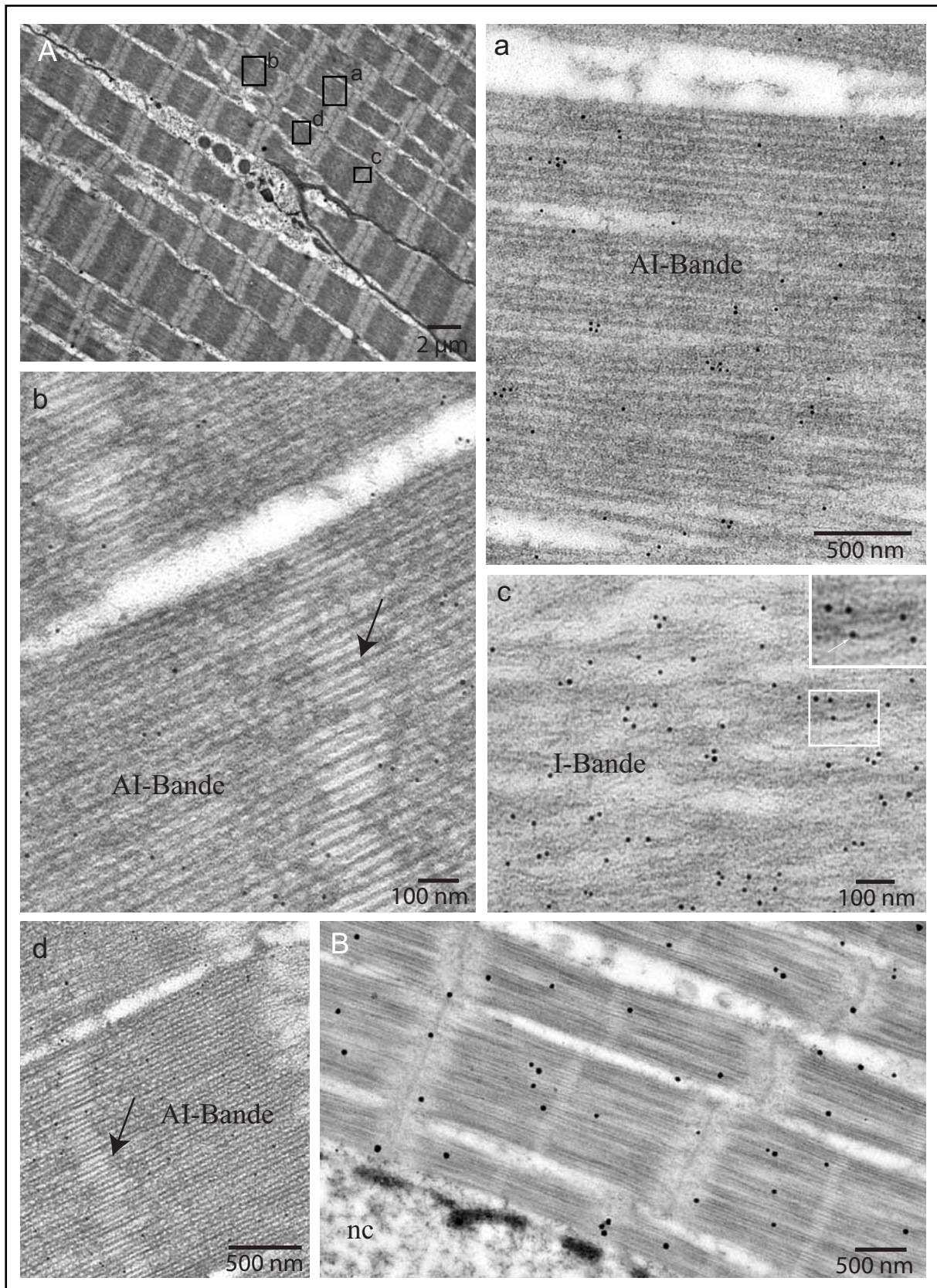


Abb.3.4.4: TEM, Immunlokalisierung von Gelsolin im abdominalen *Extensor*-Muskel

Die expandierten Muskeln wurden in LRWhite eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden dann mit affinitätsgereinigten HG1-Antikörpern gefolgt von 10-nm Gold konjugierten Zweitantikörpern inkubiert. Die Vergrößerungen (**a-d**) aus der Übersicht (**A**) zeigen eine Makierung der A~ (**a, b, d**) und I-Banden (**c**). Die durch die Expansion sichtbaren H-Zonen (**b, d, Pfeile**) blieben dabei weitgehend unmakiert, die Goldpartikel liegen unmittelbar an und auf den dünnen Filamenten (**c, inlet, Pfeil**). **B**: Verstärkung der Partikelgröße

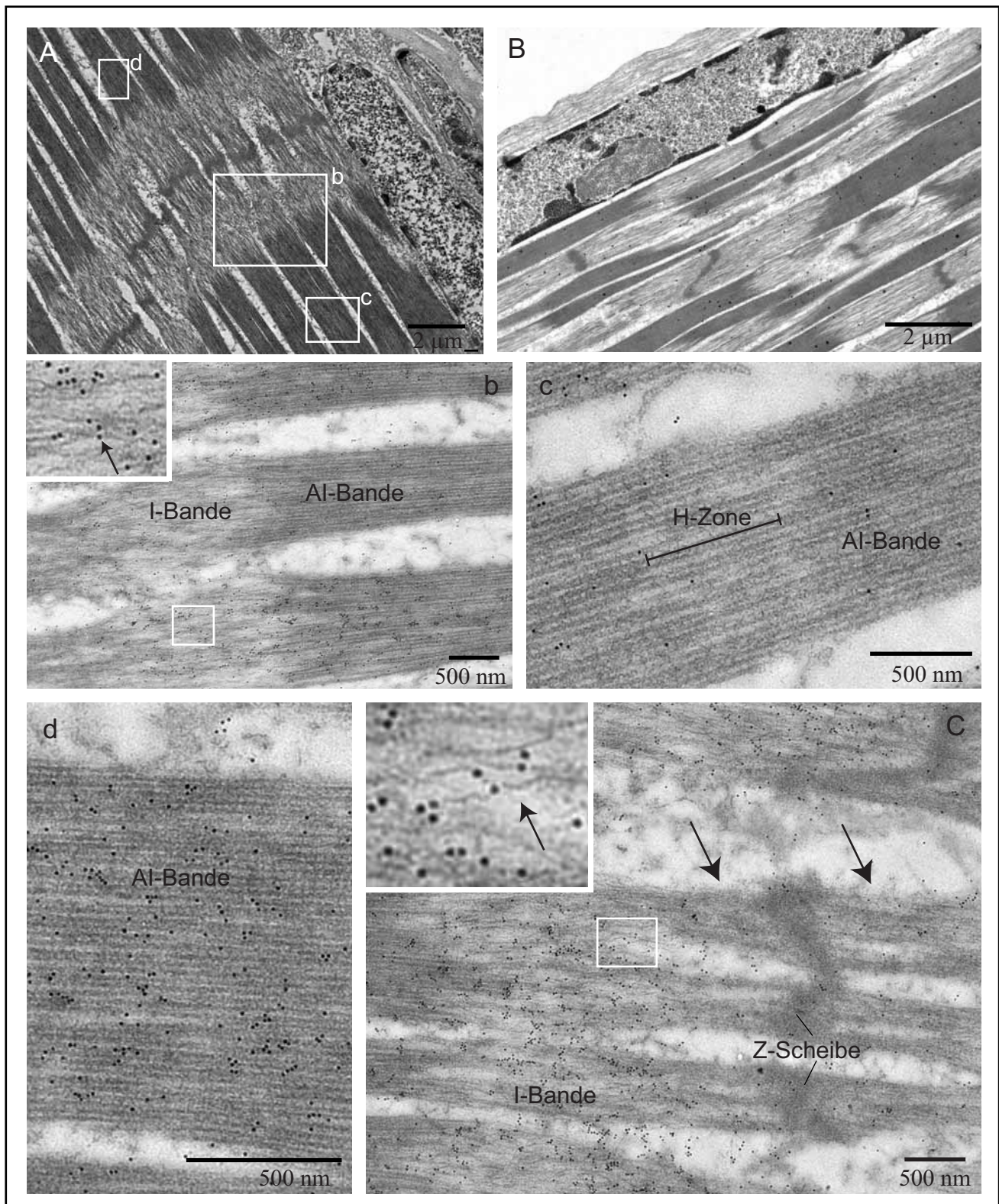


Abb.: 3.4.5 TEM, Immunlokalisation von Gelsolin im *Crusher closer*-Muskel Die Inkubation mit HG2 Antikörpern zeigt auch auf Schnitten des Scherenschließmuskels eine intensive Makierung der Myofibrillen durch Goldpartikel. Aus der Übersicht (A) entnommene Vergrößerungen (a-d) der einzelner Banden zeigen ein homogenes Label der dünnen Filamente. Die H-Zonen blieben weitgehend unmarkiert (c). Bereiche nahe der Z-Scheiben blieben durch Aggregation der Filamente ebenfalls unmarkiert (C, Pfeile). Die Goldpartikel sind in eindeutiger Assoziation mit den dünnen Filamenten beobachtet worden (C, Inset, Pfeil). B: Goldpartikelverstärkung

Die hier dargestellten Markierungen wurden nach Auswertung vielfacher Ansätzen mit unterschiedlichen Verdünnungen/Inkubationszeiten durch gleiche Routineapplikationen erzielt. Die ermittelten Werte von dem *Label* des Crushers und des Abdomens resultieren aus Inkubation der Schnitte mit Blockierungslösung und den beiden verschiedenen Antikörperseren. Die Partikelzahlen der intrazellulären Auswertung von Schnitten des abdominalen Muskels sind fast doppelt so hoch, wie in der intramyofibrillären Analyse. Auch die Daten aus der sarkomerischen Auszählung des Crushers zeigen eine 2,2 ~ (I-Bande) beziehungsweise eine 2,9 fache (A-Bande) Erhöhung der numerischen Abundanz gegenüber den Partikelsummen pro Fläche aus Schnitten vom abdominalen Muskel.

Dieser proportionale Anstieg zwischen den aus den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen resultierenden Summen belegt die Spezifität der Markierungsversuche: in allen Ansätzen konnte gleichsam ermittelt werden, dass ~90% der Goldpartikel mit den Myofibrillen assoziiert wurden. In beiden Muskelsystemen konnte auf den Myofibrillen ein annähernd 10fach höhere Partikelzahl/Fläche gegenüber nicht-sarcomerischen Strukturen festgestellt werden.

Während für den abdominalen *Extensor*-Muskel homogen Partikelabundanzen für die I- und A-Banden ermittelt wurden, zeigt sich für den Scherenschließmuskel eine 1,3 fache Erhöhung der Partikel pro Fläche auf der I-Bande. In vielen Fällen konnte beobachtet werden, dass sich die AI-Bande der beiden Muskelfasertypen unterscheiden (3.4.3 & 3.4.4), die Bereiche überlappender Filamente sind im *Crusher*-Muskel wesentlich elektronendichter, die Myosinfilamente ~1/3 dicker. Dies könnte hier zu einer sterischen Inhibition bei den Markierungsversuchen geführt haben, aus der eine niedrigere Partikelzahl hervorging. In beiden Muskelsystemen führten die Labelexperimente von Gelsolin zu geringen Partikelzahlen im Bereich der H-Zonen. Andererseits zeigten sich intensive Markierungen mit Goldpartikeln in actinhaltigen Bereichen der Sarkomere. Es konnten eine direkte Assoziation der Partikel an die dünnen Filamente beobachtet werden (Abb.3.4.5.C, Inset).

Diese Daten zeigen erstmalig auf der ultrastrukturellen Ebene, dass ~90% des intrazellulären Gelsolins unter *normalen* physiologischen Bedingungen laterale entlang der gesamten dünnen Filamente im Muskel assoziiert ist.

3.4.4 Intrazelluläre Verteilung von Gelsolin unter modifizierten physiologischen Bedingungen

Ultrastrukturelle Analysen zur Lokalisation von Gelsolin wurden von Hartwig *et al.* (1989) an Makrophagen und Thrombocyten durchgeführt. Die Studien haben gezeigt, dass eine Stimulierung der Zellen zu einer Relokalisation von Gelsolin führte und der Modulator mit Zellmembranen assoziiert werden konnte. An den Membranen wurde Gelsolin dann möglicherweise durch saure Phospholipide gebunden. Da auch Befunde zur Reversibilität von Hummergelsolin-Actin Komplexen vorlagen, wurden die physiologischen Bedingungen der Ringerlösung, in der die Muskelstreifen expandiert wurden, modifiziert. Zielsetzung war die elektronenmikroskopische Lokalisation von Gelsolin in den verschiedenen Hummermuskeln unter sehr geringen und calciumfreien Bedingungen. Die Anfertigung der Präparate erfolgte wie ganz analog zu Abschnitt 3.4.3, mit dem Unterschied, dass der Ringerlösung (a) kein zusätzliches Calcium und (b) 0,5 mM EGTA zugesetzt wurde.

Abbildung 3.4.6 zeigt die Goldpartikelverteilung des Musculus adductor abdominalis nach Expansion in calciumfreier Ringer und den Musculus adductor dactylopoditis nach EGTA-Ringer Inkubation. Die Verteilung der Goldkörner wurde auf Myofibrillen und in cytosolischen Bereichen ermittelt. Dazu wurden vom Sarkolemma ausgehend Bereiche mit $1 \mu\text{m}^2$ Fläche durch ROIs festgelegt und die Partikelzahl jeweils Richtung Zellmitte erfasst (Abb.:3.4.6A, Pfeilrichtung). Das unterlegte Histogramm gibt die Partikel pro Flächeneinheit der ausgewerteten Bereiche wieder. Die größte Partikelzahl/ μm^2 wurde in intrazellulären Bereichen des corticalen Myoplasmas ermittelt. In intermyofibrillären Zwischenräumen und auf den Myofibrillen wurden Partikel beobachtet. Die Vergrößerung aus Abbildung 3.4.6 A zeigt Partikel sowohl in Assoziation mit der Membran, als auch in unmittelbarer Nähe (b). Das Verhältnis von Partikeln auf den Myofibrillen zur Zahl der Partikel pro Fläche im Myoplasma der Zellmitte ist vergleichsweise hoch (Abb.:3.4.63.4.6 c). In der histogrammischen Darstellung wird deutlich, dass der Anteil myofibrillär gebundener Partikel im analysierten Bereich weitgehend gleich bleibt, sich die vergleichsweise hohe Partikelzahl vom Cytosolzentrum in Richtung der Bereiche des Sarcolemmas aber verfünffacht.

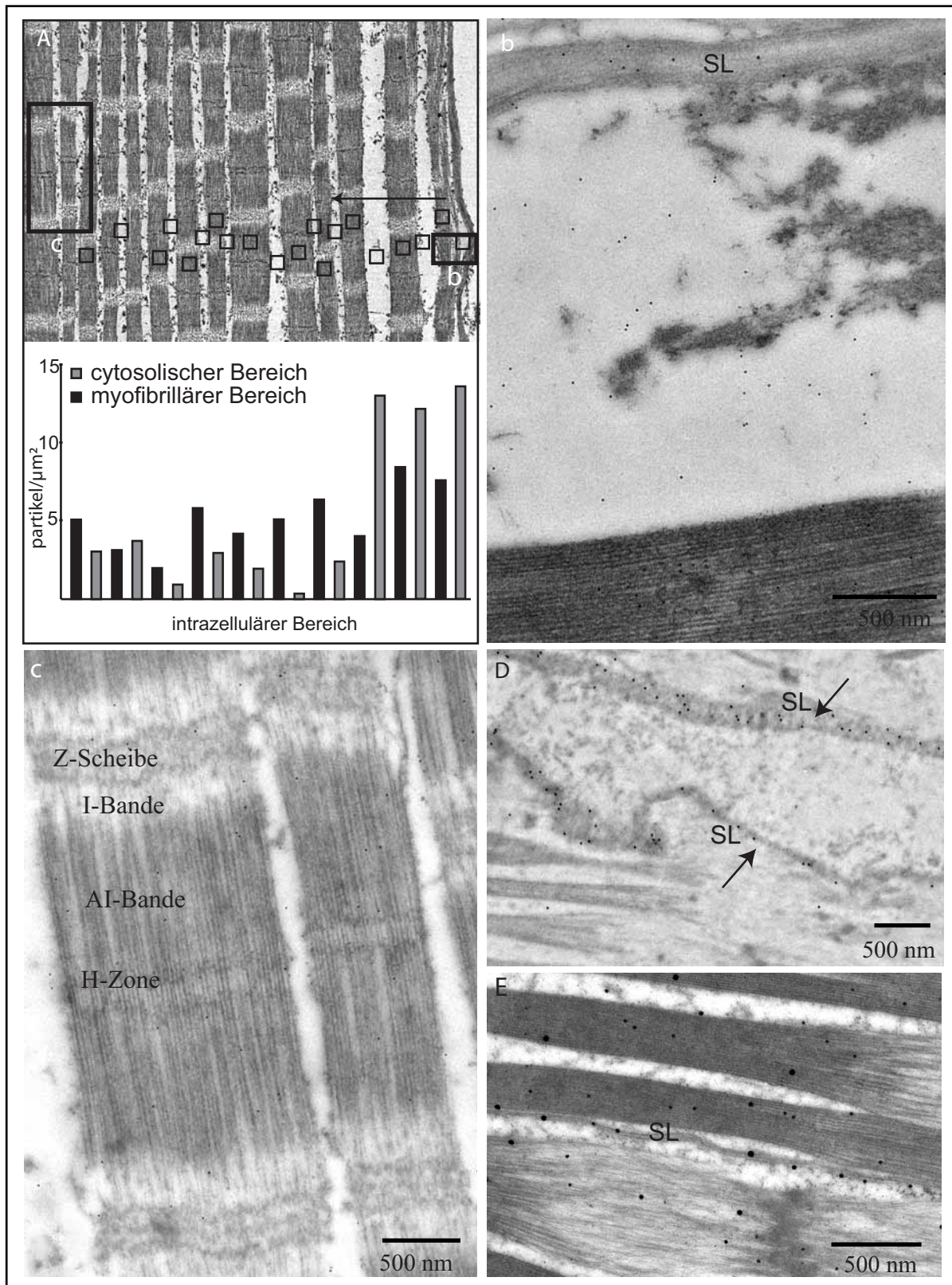


Abb. 3.4.6: TEM, Immunlokalisierung von Gelsolin in Muskeln unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen (A): Die Inkubation von Ultradünnschnitten des abdominal *Extensormuskels* in calciumfreier-Ringerlösung zeigt nach dem *Label* eine distinkte Verteilung der Goldpartikel. Während unter normalen Bedingungen die Goldpartikel fast ausschließlich mit den dünnen Filamenten assoziiert waren, wurde nun eine erhöhte Partikelabundanz in cytosolischen Bereichen (**a, b**) und besonders in der Nähe des Sarcolemmas (SL) festgestellt (**A**). Vergleichsweise wenige Partikel wurden auf den Myofibrillen ermittelt (**c**).

D, E: Partikelanalysen an Schnitten des *Crusher closer*-Muskels nach Inkubation mit EGTA-Ringerlösungen zeigten den gleichen Effekt.

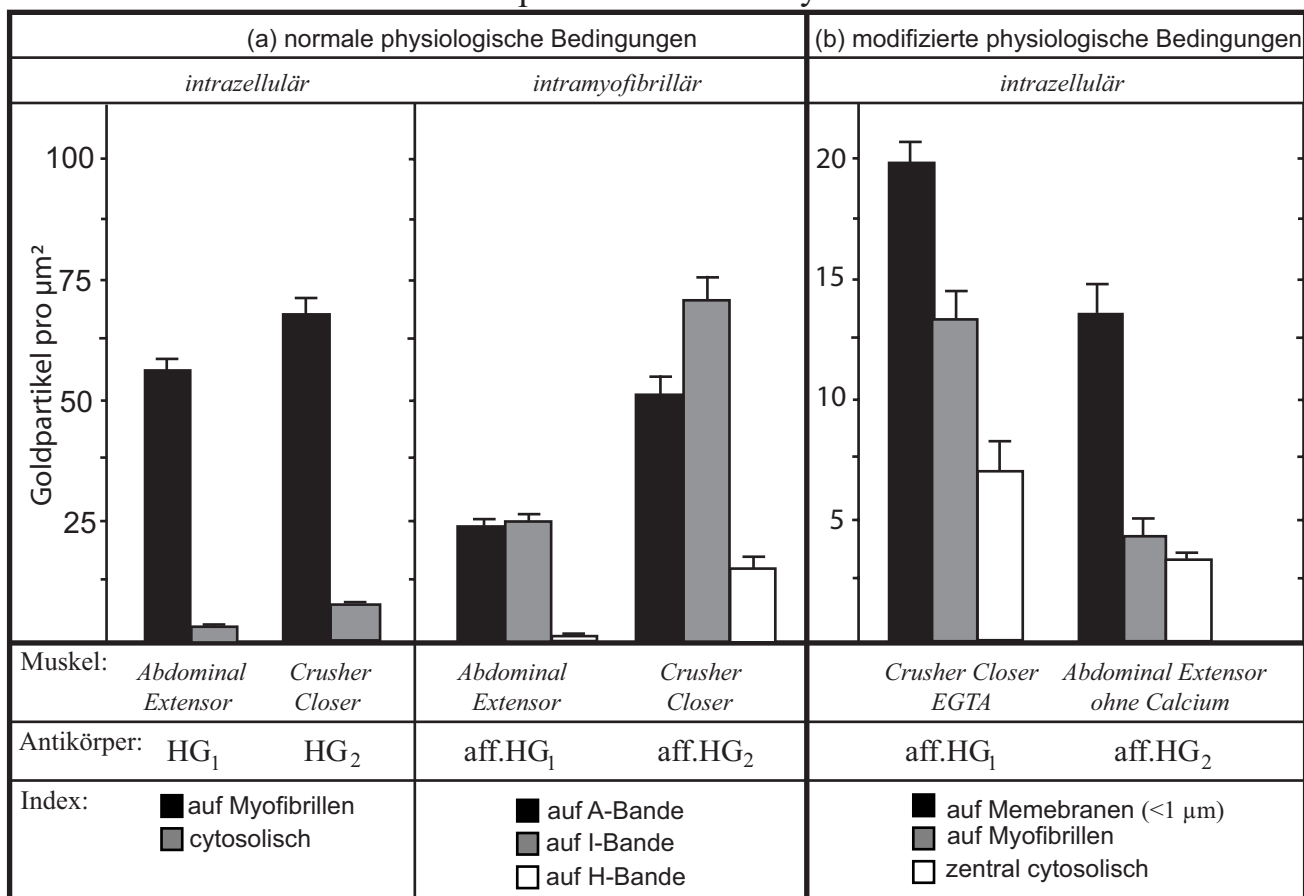
Die Analyse wurde auf drei Kategorien kondensiert: (1) Partikel auf Myofibrillen, (2) im zentralen Cytosol und (3) Bereiche $< 1 \mu\text{m}$ Entfernung zum Sarcolemma. Muskelpräparate des *Crushers*, die mit EGTA-Ringerlösung inkubiert wurden, sind in analoger Weise ausgewertet worden. Es wurde jeweils eine Fläche von $25 \mu\text{m}^2$ ausgewertet. Auf Schnitten des abdominalen *Extensor*-Muskels wurden nahe der Membran $13,2 (+/- 1,9)$ Partikel/ μm^2 , auf Myofibrillen $4,1 (+/- 0,9)$ und in zentral cytosolischen Bereichen $3,1 (+/- 0,4)$ Partikel/ μm^2 ermittelt. Folglich waren an den Membranen die Partikelsummen pro Fläche 3,2-fach höher, als auf den Myofibrillen. Zusammen mit den cytosolisch ermittelten Partikeln verblieben folglich nur noch 1/5 der Gesamtpartikel auf den Myofibrillen. Diese Relokalisation von Gelsolin wird durch die Auswertung des Labels auf den Schnitten des Scherenschließmuskels untermauert: $19,6 (+/- 1,4)$ Partikel/ μm^2 wurden nahe und auf Sarkolemmastrukturen erfasst. Aufnahmen der dichten Markierung des Sarkolemmas sind in 3.4.6 D und E dargestellt. Auf Myofibrillen wurden $13 (+/- 1,6)$ Partikel/ μm^2 , im zentralen Cytosol $7,1 (+/- 2,1)$ Partikel/ μm^2 detektiert. Die ermittelten Partikelsummen belegen eine gegenüber den Myofibrillen 1,5x höhere Partikelkonzentration an den Membranen. Alle Daten sind in Abbildung 3.4.7 zusammengefasst.

Aus allen Analysen gingen höhere Partikelsummen auf Ultradünnschnitten des *Crushermuskels* im Vergleich zu abdominalen Sektionen hervor. Das könnte möglicherweise durch höheren Konzentrationen von Gelsolin in der Scherenmuskulatur begründet sein, die auch durch die Immunblotanalysen (3.1.1) ermittelt wurden.

Die Inkubationen der unterschiedlichen Muskelsysteme unter normalen und calciumfreien Bedingungen erzeugte signifikant unterschiedliche Partikelverteilungsmuster. In calciumfreien Muskelpräparaten konnte eine 4x (*Extensor*), beziehungsweise doppelt (*Crusher*) so hohe cytosolische Partikelabundanz gegenüber Abundanzen der Myofibrillen ermittelt werden. In Markierungsexperimenten unter physiologischen Bedingungen blieben Sarkolemmastrukturen partikelfrei, aus den Inkubationen ohne Calcium/mit EGTA resultierten in den beiden untersuchten Muskeln lokal hohe Konzentrationen von cortical assoziiertem Gelsolin.

Diesen Immunlokalisationsstudien an den Muskelsystemen visualisieren die reversible calciumabhängige Assoziation eines großen Anteils von Gelsolin, das unter normalen physiologischen Bedingungen mit Actin kolokalisiert vorliegt.

Morphometrische Analyse



Numerische Analyse

(a)	auf Myofibrillen	cytosolisch	A-Band	I-Band	H-Band
<i>Abdominal Extensor</i>	54,8 (+/- 3,7)	5,7 (+/- 0,6)	23,1 (+/- 1,3)	24,8 (+/- 2,7)	1,9 (+/- 0,4)
<i>Crusher Closer</i>	68,7 (+/- 5,2)	7,8 (+/- 0,7)	51,4 (+/- 7,2)	72,4 (+/- 8,1)	14,2 (+/- 2,8)
(b)	auf Membranen (<1 µm)		auf Myofibrillen	zentral cytosolisch	
<i>Abdominal Extensor</i>	13,2 (+/- 1,9)		4,1 (+/- 0,9)	3,1 (+/- 0,4)	
<i>Crusher Closer</i>	19,6 (+/- 1,4)		13,0 (+/- 1,6)	7,1 (+/- 2,1)	

Abb.: 3.4.7: Morphometrie der Immunlokalisationen von Gelsolin in verschiedenen Hummermuskeln unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen

(a) Unter normalen physiologischen Bedingungen ist ~90% des zellulären Gelsolins mit den dünnen Filamenten assoziiert. Die Analyse der Verteilung von Gelsolin nach der Inkubation von Muskeln mit calciumfreier (*Extensor*) und EGTA-Ringerlösung (*Crusher closer*) zeigt abweichend von den normalen physiologischen Bedingungen erhöhte Goldpartikelabundanzen in cytosolischen Bereichen (b).

Besonders hoch ist die Anzahl der Partikel pro µm² nahe dem Sarcolemma (< 1 µm). Für die Analyse wurden über 100 µm² von 5 verschiedenen Zellen mit je 25 Sarkomeren pro Präperat ausgezählt. Die Daten implizieren eine calciumabhängige, reversible Assoziation von Hummergelsolin an den dünnen Filamenten in verschiedenen Muskelzellen.

3.4.5 Immunlokalisierung von Gelsolin in isolierten Myofibrillen

In den vorangegangenen Experimenten zur Lokalisation von Gelsolin unter modifizierten physiologischen Bedingungen konnten ~ein Fünftel der Goldpartikel auch nach Inkubation mit calciumfreier Ringerlösung und EGTA-Ringer an den Myofibrillen ermittelt werden. Um zu klären, ob ein Teil des actin-assoziierten Gelsolins irreversibel, bzw. calciumunabhängig gebunden vorliegt, wurden Myofibrillen in Anwesenheit von EGTA isoliert und markiert.

Einem frisch getötetem Hummer wurde die Brechschere entnommen basal eröffnet, die Hämolymphe entfernt und ein Gummistopfen so eingefügt, dass der Muskulus adductor dactylopoditis gestreckt wurde. Die Schere wurde für 3 Tage in Glycerinlösung (100mM KCl, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, 1mM DTT, 10 mM Imidazol, pH 7.0, 50% Glycerin) bei -35°C eingefroren. Muskelfaserbündel des Schließmuskels wurden dann entnommen und in Myofibrillenpuffer (100 mM KCL, 2mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 10mM Imidazol pH 7.0) zur Entfernung des Glycerins mehrfach gewaschen. Mit einem Ultraturax wurden die Muskelstücke homogenisiert, durch lichtmikroskopische Kontrollen wurde der Reinigungsprozess überwacht und eine für Färbeversuche adäquate Verdünnung eingestellt. Die expandierten Myofibrillen wurden dann mit Rhodamin-Phalloidin und dem HG₂-Antikörper unter Agitation in Eppendorfgefäßen gefärbt, auf Objektträger transferiert und in Moviol eingebettet. Am cLSM wurden optische Schnittserien der Präparate angefertigt und ausgewertet (Abb.:3.4.8).

Sowohl die F-Aktin, als auch die Gelsolinfärbung erzeugten ein periodisches Fluoreszenzmuster. Durch Phasenkontrastaufnahmen und der Übereinanderlagerung (*Overlay*) der Aufnahmen konnte die Rhodamin-Phalloidin Färbung dem I-Z-I Bereich der expandierten Sarkomere zugeordnet werden (Abb.:3.4.8.C) Im Bereiche der AI-Bande ließ sich keine Fluoreszenz ausmachen. Die Gelsolinmarkierung zeigt, durch Identifikation im Phasenkontrast und *Overlay*, eine Färbung der I-Banden, die Z-Scheiben (Abb.:3.4.8D-F, Pfeilspitzen) und Bereiche in unmittelbarer Nähe blieben ungefärbt. In der AI-Bande konnte nur eine vergleichsweise schwache Markierung des Gelsolins beobachtet werden.

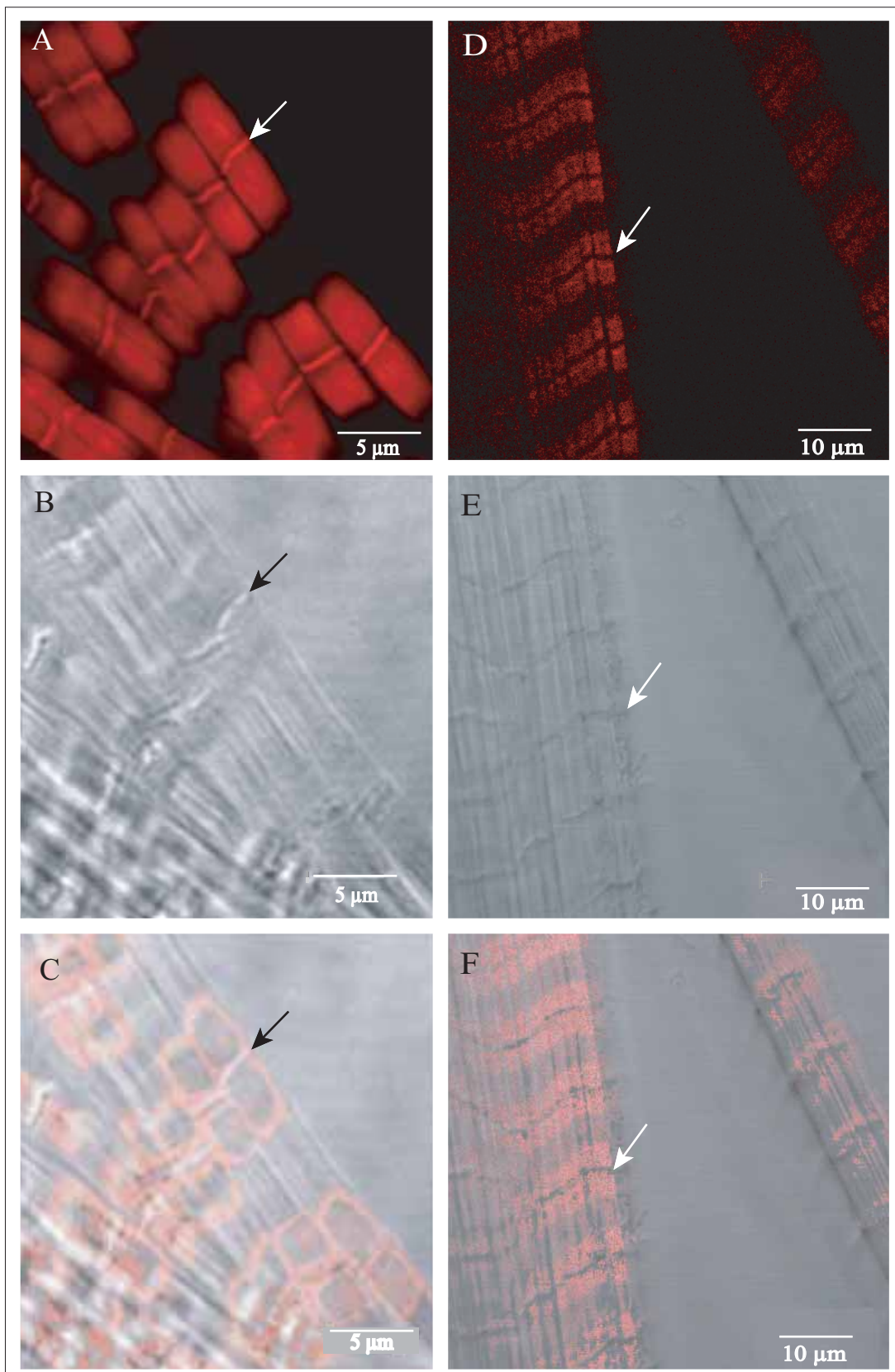


Abb. 3.4.8: cLSM, Immunocytochemische Lokalisation von Gelsolin und Actinfärbung an isolierten Myofibrillen aus der Scherenmuskulatur von *H. americanus*
 Expandierte Myofibrillen des *Crusher closer*-Muskels wurden mit Rhodamin-Phalloidin (A-C) und mit Gelsolin Antikörpern (D-F) gefärbt. Die Markierung von Gelsolin und F-Actin erfolgte jeweils im Bereich der I-Bande.

A,D Fluoreszenzaufnahme, **B,E** Phasenkontrast, **C,F** *Overlay*, **Pfeile**: Z-Scheiben

Um Gelsolin in Myofibrillen der Pleopodenmuskulatur zu lokalisieren wurden die Laufbeine einem Hummer entnommen, lateral von proximal nach distal eröffnet, der Musculus adductor meropoditis entnommen und durch Homogenisation gewonnene Myofibrillen analog derer des Scherenmuskels gefärbt. In Abbildung 3.4.9 sind konfokale Aufnahmen der RhodaminPhalloidin-Markierung (A, B), sowie der immunocytochemische Färbung von Gelsolin (C-E) der isolierten Myofibrillen aus der Pleopodenmuskulatur dargestellt.

Auch hier zeigt sich eine periodische Fluoreszenz. Die Markierung durch Rhodamin Phalloidin erzeugte eine vollständige Fluoreszenz der kontrahierten Myofibrillen. Lediglich Bereiche in unmittelbarer Nähe der Z-Scheiben (Abb.: 3.4.9A, B Pfeile) blieben von der Markierung ausgespart. Durch die Phasenkontrastaufnahme wird deutlich, dass ca. 90% der kontrahierten Sarkomere durch den AI-Bereich ausgefüllt werden, d.h. durch die Überlappung von dicken und dünnen Filamenten repräsentiert werden. Die vollständige Färbung dieses Bereiches untermauert die Spezifität der Färbungen der stark expandierten Myofibrillen des Scherenschließmuskels aus Abbildung 3.4.8, da hier nicht auszuschließen war, dass eine Färbungen des F-Actins im dicht gepacktem AI-Bereich durch sterische Inhibition verhindert wurde. Innerhalb der vollständig markierten Sarkomere lässt sich eine intensivere Färbung der kurzen I-Banden erkennen. Auch in der Mitte der Sarkomere ist eine intensive Färbung zu beobachten, die vermutlich aus der Übereinanderlappung gegen-überliegender Actinfilamente resultierte.

Durch den HG₂-Antikörper wurde ebenfalls vorwiegend der I-Bereich markiert (Abb.:3.4.9C, D). Aber auch im AI-Bereich war eine vergleichsweise schwächere Fluoreszenz erkennbar. Die Ergebnisse dieser Färbungen an Myofibrillen zeigen unterschiedliche Intensitäten von Actin und Gelsolin in den verschiedenen Banden. Es konnte nicht geklärt werden, ob Gelsolin entlang der gesamten dünnen Filamente lokalisiert ist, da möglicherweise sterische Effekte die Markierungen in den AI-Bereichen beeinträchtigten.

Dennoch zeigte sich deutlich eine Markierung der Myofibrillen durch den Gelsolinantikörper, obwohl die Myofibrillen in EGTA-haltiger Lösung isoliert wurden. Das Ergebnis der beiden Färbungen an den verschiedenen Muskeln zeigt, dass ein Anteil des Gelsolins im Muskel fest an Actinfilamente gebunden ist und nicht durch Komplexbildung gebundener Calciumionen extrahiert werden kann.

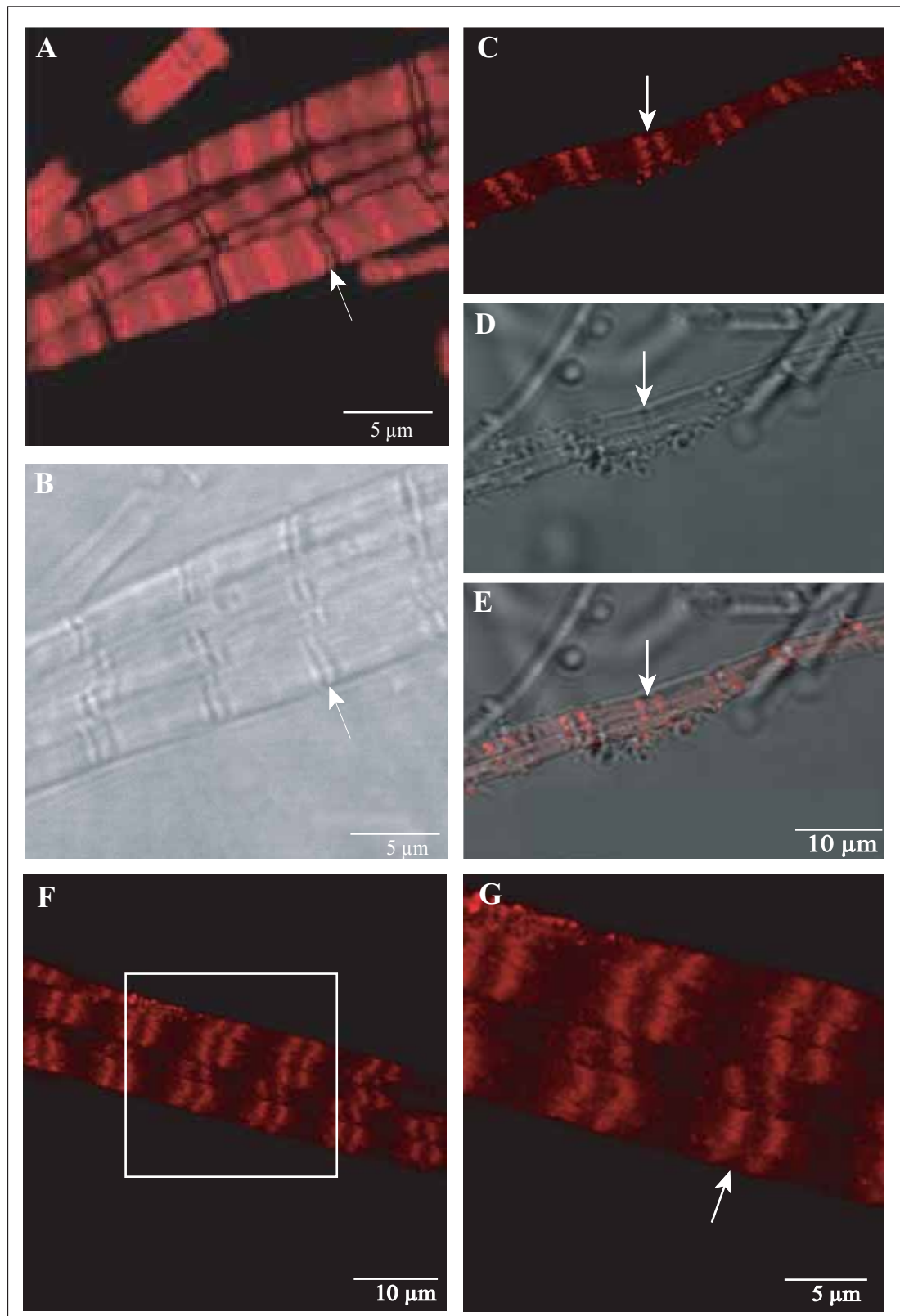


Abb.3.4.9: cLSM, Immuncytochemische Lokalisation von Gelsolin und Markierung von Actin in der Pleopodenmuskulatur von *H.americanus* A-D: Isolierte Myofibrillen des M. adduktor meropoditis wurden mit Rhodamin-Phalloidin (A-B) und Gelsolin Antikörpern (C-G) gefärbt. Markierungen erzeugten regelmäßige Färbung der I-Banden. A,C:Fluoreszenzaufnahme; B,D:Phasenkontrast; E:overlay Pfeile: Z-Scheiben

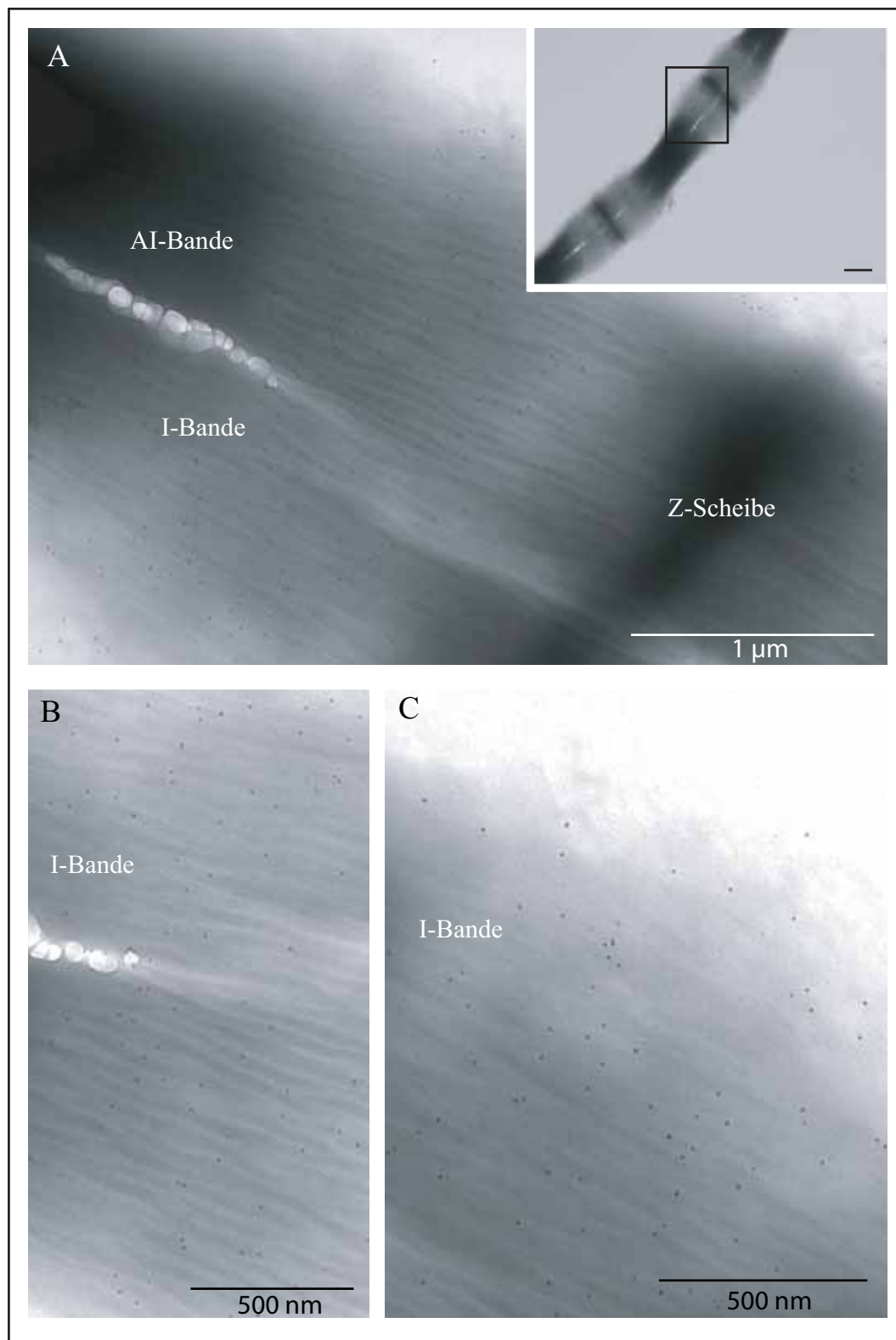


Abb 3.4.10 TEM, Immunelektronenmikroskopische Lokalisation von Gelsolin in isolierten Myofibrillen des *M. adductor dactylopoditis*: Expandierte und isolierte Myofibrillen des *Crusher closer*-Muskels (**A, Inlet**) wurden mit HG2-Antikörpern markiert. Die Kontrastierung erfolgte durch Ammoniummolydat. In der I-Bande ließen sich zahlreiche Goldpartikel beobachten (**A-C**). inlet-bar 1µm

In Abbildung 3.4.10 ist eine immunelektronenmikroskopische Lokalisierung von Gelsolin an expandierten und isolierten *Crusher*-Myofibrillen dargestellt. Die Myofibrillen wurden auf kohlebeschichtete Nickelgrids, die vorher durch Hydrophilisierung konditioniert wurden, adsorbiert. Die Myofibrillen wurden mit dem HG₂-Antiserum und dann mit einem 10nm Gold-konjugierten Zweitantikörpern inkubiert. Mit dem Schwermetalsalz Ammoniummolybdat wurden die Myofibrillen dann kontrastiert.

Die vergrößerten Aufnahmen in Abbildung 3.4.8 A-C zeigen zahlreiche Goldpartikel in den I-Banden. Auch innerhalb der sehr elektronendichten AI-Banden konnten Goldpartikel ausgemacht werden. Ein Vergleich der Partikelverteilung in den Zonen wurde nicht ausgeführt, da auch aus verschiedenen Verdünnung des Ammoniummolybdates immer sehr elektronendichte AI-Banden resultierten. Die Ansätze diente aber vor allem der Visualisierung von Gelsolin in Myofibrillen, die in Gegenwart von EGTA isoliert worden waren.

Aus den Beobachtungen der kontrastierten Myofibrillen (A, inset) ließen sich ebenfalls nahe der Z-Scheiben Bereiche höhere Elektronendichte ermitteln, die als lokale Aggregation von dünnen Filamenten bereits an Ultradünnschnitten des *Crushers* beschrieben wurden (Abb.:3.4.5). Auch hier zeigte sich ein vergleichsweise schwächeres *Label* der dünnen Filamente in unmittelbarer Nähe der Z-Scheiben, dass im anschließenden Bereich der I-Bande intensiv ausgeprägt war (A-C).

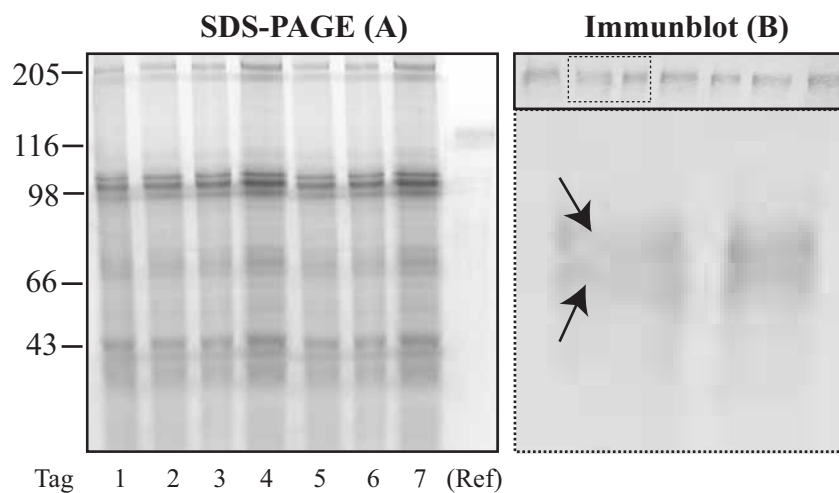
Die lichtmikroskopischen Beobachtungen von actingebundenem, calciumunabhängig regulierten Gelsolin wurden durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt. Es konnte ermittelt werden, dass nach der Extraktion von Ca²⁺ ein Anteil der Gelsoline im Crustaceenmuskel nicht reversibel an Actinfilamenten gebunden bleibt. Welcher Anteil des myofibrillären Gesamtgelsolins durch diese Markierungen repräsentiert wurde, soll im Rahmen der Diskussion näher beleuchtet werden.

3.5 Hummergelsolin in embryonalen ZOEALarven

Die Proteinarchitektur von Muskelfasern wird bei Crustaceen in der postembryonalen Entwicklung besonders während cyclischer Häutungsphasen moduliert. Strukturelle Daten zu den myofibrillären Proteinkompositionen während der Entwicklung finden sich in Govind *et al.* (1987, 1992). Für die Ecdysis wird die Körpermuskulatur um bis zu 50 % reduziert und das Gewebe aus dem Exoskelett zurückgezogen. Involviert in diesen Prozess sind besonders Calpaine, eine Familie calciumabhängiger Cysteinproteasen (Yu & Mykles, 2003). Dahingehend wurden Überlegungen angestellt, ob Gelsoline an diesen Prozess eventuell ebenfalls beteiligt sein könnten. In diesem Falle hätten sich die Konzentrationen innerhalb eines Häutungszykluses signifikant geändert. Postembryonale Zoea 1 Larven vollziehen über den Zeitraum von einer Woche eine Häutungsphase, mit der sie sich zum Zoea 2 Stadium entwickeln (Govind *et al.*, 1977). Die einzelnen Stadien können eindeutig taxonomisch zugeordnet werden.

3.5.1 Identifikation von Gelsolin in der Muskulatur postembryonaler ZOEAL₁ Larven

Über einen Zeitraum von zehn Tagen wurden in der Biologischen Anstalt Helgoland täglich drei Zoea₁ Ganzmuskelprouben entnommen und elektrophoretisch analysiert (Abb. 3.5.1 A). Ein korrespondierender Immunblot (Abb. 3.5.1 B) sollte Aufschluß darüber geben, ob sich die Gelsolinkonzentrationen über diesen Zeitraum wesentlich verändert und der Actinmodulator möglicherweise an der Muskelreduktion involviert ist. Scholz und Hinssen (1995) konnten eine Zunahme der Gelsolinkonzentration um das 20fache innerhalb sich differenzierender Myotuben zeigen. Da sich für die elektrophoretische Untersuchung von Proben entwickelnder Gewebe häufig erhöhte Proteaseaktivität feststellen lässt, wurde der Versuchsansatz mehrfach wiederholt. Es zeigte sich anhand der erhaltenen Immunreaktionen von den Ganzmuskelprouben, dass beiden Isoformen (B, Vergrößerung) in annähernd gleichen Verhältnissen exprimiert werden. Die Befunde aus den Immunblots zeigten außerdem für den gesamten ersten Ecdysis-Zyklus weitgehend gleich bleibende Gelsolinkonzentrationen.

**Abb. 3.5.1: Identifikation von Gelsolin in Zoa Larven**

Zoa1-Larven wurden über den Zeitraum von einer Woche (= Zeitraum erster, post-embryonaler Ecdysis) einer Zuchtkultur entnommen, in SDS-Probenpuffer aufbereitet und elektrophoretisch analysiert.

Ein Immunblot wurde angefertigt, um zu prüfen, ob sich die Konzentrationsverhältnisse an Hummergelsolin über diesen Zeitraum verändern. Die Analyse deutet auf gleichbleibende Konzentrationsverhältnisse von Hummergelsolin während der Reduktion der Muskelgewebe in einer Häutungsphase. Es konnten zwei Gelsolinvarianten ermittelt werden (Vergrößerung, Pfeile), deren Molekulargewichte denen aus adulten Hummermuskeln entspricht.

Lane 8: aufgereinigtes Gelsolin (Referenz)

3.5.2 Lokalisation von Gelsolin in der Muskulatur postembryonaler ZOEALarven

Durch Immunblotanalysen von den Hummerlarven konnte auch ermittelt werden, dass Gelsolin während der embryonalen Entwicklung bereits in vergleichsweise größeren Mengen im Muskel vorkommt. Um ebenfalls Aufschluss über die Lokalisation des Actinmodulators zu erhalten, wurden einem weiblichen Hummer ungeschlüpfte Zoeal Larven entnommen, mit Paraformaldehyd in Seewasser fixiert und in LRWhite eingebettet. Von Bereichen des Abdomens und des antenalen Remotors wurden Ultradünnschnitte angefertigt und mit HG₂-Antikörpern markiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des erhaltenen *Labels* sind in Abbildung 3.5.2. dargestellt.

Aus der longitudinalen Übersicht (3.5.2 B, D) werden intakte Muskelzellen mit übereinander liegenden, expandierte Sarkomeren von Längen bis 6 µm deutlich, die von zahlreichen Mitochondrien, Glycogen und Zellkernen umgeben sind. Dieser Fasertyp stellt bei adulten Organismen einen intermediären Fasertyp dar (Govind *et al.*, 1992), detaillierte Studien über Fasertypen in Muskeln von Zoea-Larven liegen aber bis dato noch nicht vor.

Die Vergrößerungen (3.5.2 c, e, f) zeigen eine spezifische Markierung der Myofibrillen mit Goldpartikeln. Auch hier blieben, analog zu den durchgeführten Analysen an adulten Crustaceenmuskeln, die H-Zonen der Sarkomere weitgehend gering bzw. unmarkiert. Durch Auswertung der Partikelverhältnisse wurde ermittelt, dass ~90% aller beobachteten Goldkörner mit den Myofibrillen assoziiert wurden. Es konnte vielfach Partikel auf und an den dünnen Filamenten beobachtet werden. Weitere histologische und elektronenmikroskopische Markierungsexperimente, die an den abdominalen Muskeln der Larven durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls intensive Markierungen der Myofibrillen (nicht gezeigt).

Daher wird konkludent mit den Daten aus Markierungsexperimenten an den Muskelsystemen adulter Hummer auch für praejuvenile Stadien eine laterale Assoziation von Gelsolin entlang der dünnen Filamente favorisiert.

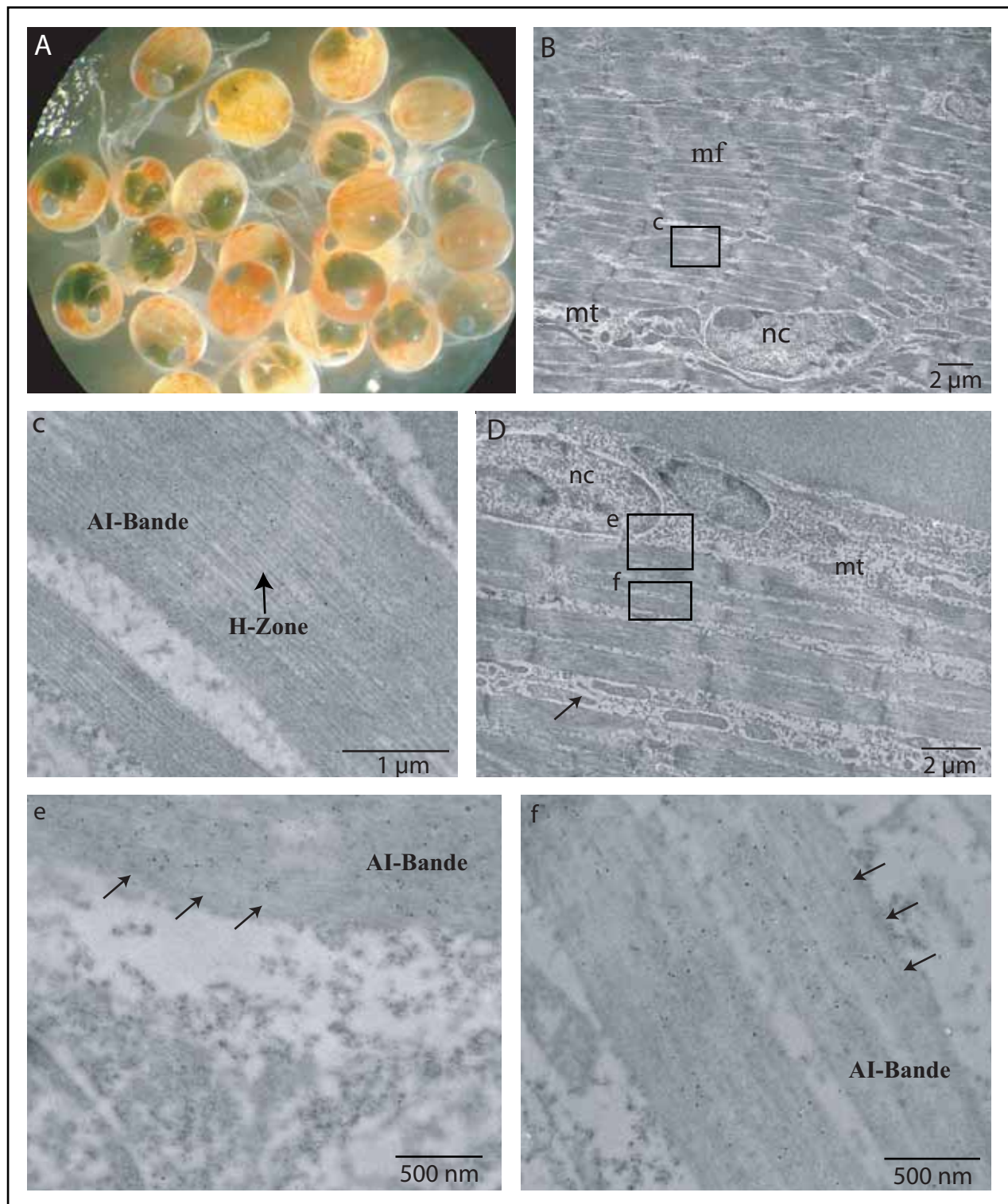


Abb. 3.5.2: Immunlokalisation von Gelsolin in Larven von *H. gammarus*

Ungeschlüpfte Zoea-Larven des europäischen Hummers (A, lichtmikroskopische Aufnahme) wurden in LRWhite eingebettet und Ultradünnschnitte von lateral im Bereich über den Omantidienaugen angefertigt. Die expandierten Sarkomere des *antennalen Remotor* Muskels (B, C) liegen regelmäßig geordnet übereinander und weisen bereits eine hohe strukturelle Organisation auf. Die Sarkomere zeigen Längen bis 6 µm.

Markierungen mit dem Gelsolin- und 10nm Gold-konjugierten Zweitantikörpern zeigen eine deutliches *Label* auf den Myofibrillen (mf, c, e, f, Pfeile). In der Auszählung wurden über neunzig Prozent aller ermittelten Goldpartikel den Myofibrillen zugeordnet. Da hier auch die deutlich erkennbaren H-Zonen unmarkiert blieben, ist Hummergelsolin im Muskel der Zoea-Larven folglich ebenfalls mit den dünnen Filamenten von Sarkomeren assoziiert.

4 Diskussion

4.1 Aufreinigung von Gelsolin aus Muskelzellen von Crustaceen

Die beiden isolierten Gelsoline aus der abdominalen und Scherenmuskulatur von Crustaceen wurden auf der Grundlage der Methode von Hinssen *et al.* (1984) und Bock *et al.* (1995) in Gegenwart von EGTA aufgereinigt. Die apparente Molekularmasse betrug in der SDS-PAGE für HG₁ 116kDa und bei HG₂ 113kDa. Damit weichen die beiden unter gleichen Bedingungen ermittelten Molekulargewichte um 10 kDa von dem für Crustaceengelsolin beschriebenen Gewicht (105 kDa, Bock *et al.*, 1994; Lück *et al.*, 1995) und um 30 kDa für das cytoplasmatische Mammaliengelsolin nach oben hin ab. Der Präparationsverlauf wurde im Bezug auf die Fällungsstufen mit Ammoniumsulfat optimiert und die verwendeten KCl Gradienten der ersten und finalen Anionenaustauschersäule modifiziert. Die beiden Crustaceengelsoline eluierten zwischen 350 und 370 mM und damit bei ähnlicher Konzentration wie Gelsolin aus Mollusken (Remmert, 1999), aber bei einer deutlich höheren Konzentration, als das Gelsolin aus der glatten Muskulatur von Vertebraten mit 170mM (Hinssen *et al.*, 1984). Aus den Sequenzdaten (Lück *et al.*, 1994) konnte ein vergleichsweise hoher Gehalt an sauren Aminosäureresten (Nettoüberschuss von 37 negativen Ladungen, 758 AS insgesamt) ermittelt werden, die möglicherweise zu geringerer Bindung an SDS und damit zu abnormaler Mobilität in der SDS-PAGE führten. Kalkulationen anhand der Sequenzdaten von HG₁ ermöglichen die Ermittlung einer Molmasse von 83,5 kDa, in Gegenwart von Calcium konnte durch analytische Gelfiltration ein Molekulargewicht von ~ 80kDa ermittelt werden. Damit lassen sich die Gelsoline HG₁ & 2, basierend auf dem Gewicht, in die Gruppe der 80kDa Modulatoren einordnen.

In den untersuchten Scheren- und abdominalen Muskeln konnten durch densitometrische Messungen von Immunblots ~360 mg Gelsolin pro kg Muskel-Feuchtgewicht ermittelt werden. Die Werte stimmen mit den geschätzten Werten für Gelsolinkonzentrationen aus der Muskulatur des Flußkrebsses und des Hummers von 500mg/kg (Bock *et al.*, 1994; Lück *et al.*, 1995) gut überein. Ähnliche Werte ergaben sich aus Kalkulationen für die Konzentration von Pecten Gelsolin (Remmert & Hinssen, 1996), von Actinmodulatoren aus dem Hautmuskelschlauch (D'Haese & Hinssen, 1987) und dem Kaumagen (Krüger, 2001) von *Lumbricus terrestris*. Für das Gelsolin aus der glatten Muskulatur des Schweinemagens werden 120 mg Modulator/kg Muskel angegeben, die isoliert werden

konnten, der tatsächliche Gehalt ist möglicherweise höher und liegt schätzungsweise bei 0,1% des Gesamtproteins des Muskels (Hinssen *et al.*, 1985b). Im Skelettmuskeln von Mammaliern wurden signifikant niedrigere (~20fach) Konzentrationen an Gelsolin ermittelt (Hinssen *et al.*, 1985; D'Haese & Hinssen, 1987). Der Mammaliermuskel ist zugleich aber auch der Syntheseort für vergleichsweise große Mengen an Plasmagelsolin (Nodes *et al.*, 1984; Yin *et al.*, 1987). Aus den vorliegenden Untersuchungen geht jedoch hervor, dass es sich bei den beiden isolierten Actinmodulatoren aus den Crustaceenmuskeln um cytosolische Proteine handelt, da sich in den immunelektronenmikroskopische Studien keine Markierung in extrazellulären Bereichen beobachten ließen und auch keine Gelsolinnachweise durch Immunblotreaktionen von Proben der Hämolymphe erhalten wurden (unveröffentlicht). Interessanterweise wird in *Drosophila* ebenfalls die Existenz einer cytoplasmatische und einer sekretorische Variante des Gelsolins vermutet, wie es bei Mammaliergelsolin der Fall ist (Heinzelman *et al.*, 1993; Stella *et al.*, 1994). Lokalisationsexperimente von EWAM und Pecten-Gelsolin deuten ebenfalls auf cytoplasmatische Varianten.

4.2 HG₁ & HG₂ sind Isoformen

Durch die Immunblotanalysen von unterschiedlichen Ganzmuskelpollen wurde die Existenz von zwei Gelsolinvarianten aufgedeckt. Es zeigte sich dabei, dass Muskelfasern unterschiedliche Expressionsmuster dieser Varianten aufweisen. Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit lag in der Aufklärung der Existenz von Isoformen, deren funktionelle und strukturelle Eigenschaften, sowie deren mögliche Unterschiede.

Aufgrund der *in vitro* ermittelten, nicht voneinander abgrenzbaren Eigenschaften vermuteten D'Haese und Hinssen (1987), dass die EWAM-Varianten möglicherweise Isoformen darstellen, was später durch Sequenzanalysen bestätigt wurde (Giebing *et al.*, 1997). Generell entstehen Isoformen durch Genduplikationen oder alternative *splicing* Prozesse, Proteinsuperfamilien entstanden aber eher aus sehr ursprünglichen, alten Duplikationen, Exon/Domänen Verdoppelungen oder konvergenten Evolutionen (Gunning *et al.*, 1998). Isoformen sind Varianten einer Proteinfamilie, die entweder durch Translation verschiedener Gene oder durch unterschiedlich prozessierte RNA-Transkripte des gleichen Gens entstehen (Schiaffino & Reaggiani, 1996). Wesentlich ist dabei, dass sie sich mindestens durch Substitution einer Aminosäure unterscheiden. Denkbar ist dabei auch das Fehlen oder die Addition von einigen Aminosäuren.

Dass es sich bei den beiden ermittelten Hummergelsolinen nicht um zwei Isoformen handelt ist prinzipiell möglich. Eine artifizielle Aufspaltung in mehrere Modulatorfraktionen könnte z.B. durch präparationsbedingte Modifikationen wie Oxidation oder partielle proteolytische Degradation erfolgt sein. Auch posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Methylierung von Aminosäuren nach der Proteinsynthese können zur Identifikation von Varianten führen, die keine Isoformen darstellen, allerdings aber auch keine Massenunterschiede ergeben. Häufig auftretende Modifikationen, wie die Phosphorylierung und die Addition von Kohlenhydraten (Glykolysierung) wurden an HG 1 und 2 untersucht, jedoch ohne Befunde zu ermittelt, die auf derartige Veränderungen der Proteins deuten. Der Vergleich massenspektroskopischer Daten über Internetdatenbanken (Mascot) oder auch mit Biotoools[®] wurde ebenfalls unter Berücksichtigung verschiedener möglicher Modifikationen (Acetylierung, Methylierung, Oxidation) durchgeführt, was zu keiner verstärkten Peptididentifikation und damit zu einer Steigerung der Sequenzabdeckung führte. Damit reduziert sich allerdings nur die Wahrscheinlichkeit einer solchen Modifikation, da in einzelnen Messungen nie alle Peptide aus den tryptischen Verdau detektiert werden konnten.

Mehrfache Messungen mit Proben aus unterschiedlichen Präparationen und SDS-Gelen ermöglichten die Identifikation von über 60% Sequenzhomologie. Bei den Messungen muß berücksichtigt werden, dass sehr kleine Peptide (4-7 AS) aufgrund ihres geringen Molekulargewichts nicht ermittelt wurden, da sie von der Matrix nicht abgrenzbar sind. Es muss auch berücksichtigt werden, dass verwendetes Trypsin zwischen Lysin und Arginin schneidet, diese Schnittstellen aber theoretisch verdeckt sein können. Daraus resultieren dann teilweise sehr große Peptide, die sich möglicherweise einerseits nicht aus den Gelproben herauswaschen lassen oder andererseits während des Fluges im Massenspektrometer zerbrechen können. Letzteres ermöglicht dann keine Identifikation der Peptide anhand der Sequenzdaten, da nur vollständige Peptide anhand des theoretischen Verdaus ermittelt werden. Durch diese eindeutige Identifikation und besonders durch die vielfache Wiederholung der Messungen von Proben unterschiedlicher Präparationen wird die ermittelte Sequenzhomologie jedoch hochsignifikant. Auffällig zeigte sich, dass im N-Terminus das terminale Peptid immer fehlte. Auch am C-Terminus deutete sich eine mögliche Abweichung der HG₂-Sequenz von der aus HG₁ an. Da sich über das Fehlen von Eigenschaften oder Strukturen nur sehr bedingt Ergebnisse herleiten lassen und durch proteolytische Spaltung mit nachfolgender Aufreinigung der Spaltprodukte Hinweise auf eine N-Terminale Abweichung der Isoformen ergaben, wurde

die HG₂-Variante isoliert, auf Nitrocellulose geblottet und zur Ansequenzierung in Auftrag gegeben. Aufgrund einer N-terminalen Blockierung der Polypeptidkette von HG₂ ließ sich der Hinweis aber nicht validieren.

Aus Untersuchungen unterschiedlicher Muskelfasern verschiedener Crustaceen wurden zahlreiche Isoformen verschiedener myofibrillärer Proteine ermittelt (Medler & Mykles, 2003, Medler *et al.*, 2004). Dabei ließ sich eine Korrelation zwischen den Fasertypen und Proteinen struktureller, regulatorischer Isoformen ableiten. Für Hummer wurde distinkte Troponine, Paramyosine und Myosin *light chains* identifiziert (Mykles, 1985, 1988). In einer Vielzahl von vorgelegten Studien wird allerdings von der Existenz von Isoformen gesprochen, die oftmals nur auf Immunblotanalysen basiert. Die Identifikation resultieren aus verschiedenen Verteilungsmustern der verschiedenen Gewebeproben, was die Existenz von Isoformen zwar grundsätzlich wahrscheinlich macht, strukturelle und funktionelle Unterschiede und damit direkte Nachweise der Existenz von Isoformen aber nicht belegt. Hier, wie in zahlreich vorgelegten isoformspezifischen Lokalisationsstudien (Fallon & Nachmias, 1980; Lubit & Schwartz, 1980), wird die Bedeutung der Isoformen vergleichsweise früh erkannt, führte aber nicht direkt zur Ausweitung der Arbeiten und Untersuchungen zugrundeliegender Mechanismen. Das reflektiert sowohl das Fehlen verwendbarer Nachweismethoden, als auch das Fehlen von fundamentalen Unterschieden zwischen Isoformen. β - und γ -Actin sind beispielsweise nur in einem verschwindet geringem Anteil in Fraktionen von Skelettmuskelactin enthalten.

Der speziell gegen Antigene der leichteren Variante hergestellte HG₂-Antikörper belegt durch die weitgehend gleichen Immunreaktionen mit Banden beider Varianten eine hohe Sequenzhomologie der Hummergelsoline. Durch vergleichende Immunblotanalysen nach verschiedenen Affinitätsreinigungen wurden keine Unterschiede in der Färbeintensität beobachtet, die auf eine Isoformspezifität des Antikörpers hätten schließen lassen können.

Funktionelle Unterschiede von Isoformen wurden, nachdem sich aus experimentellen Daten zunächst eine Redundanz andeutete (Gunning *et al.*, 1984), bereits für Tubuline (Hoyle, 1990), Actin (Khaitlina, 2001) und Tropomyosin (Gunning *et al.*, 1998) gezeigt.

In neueren, molekularen Studien adulter Skelettmuskeln aus dem amerikanischen Hummer werden die differentielle Expression durch Transkriptanalysen von Myosinen (LaFramboise *et al.*, 2000), Actin und Troponin in schnellen, S1 und S2 Fasern gezeigt (Medler & Mykles 2003). Den schnellen Fasern wurden so verschiedene Isoformen von Paramyosin, TnT₂, TnI_{1, 3, 5} zugeordnet, für die S1 (*slow-phasic*) und S2 (*slow-tonic*)-

Fasern wurde die Isoformen TnT₃, TnI₂ nachgewiesen. Der wesentliche Unterschied zwischen den S1~ und S2-Fasern besteht demnach in der Expression der TnT₁ Isoform in S2-Fasern. In Hummer werden mindestens zwei Isoformen der Myosin-Schwere-Kette synthetisiert, die in schnellen und langsamen Muskeln unterschiedlich exprimiert werden (Mykles, 1985). Auch für α -Actinin, Troponin T und Troponin I konnten Unterschiede in der Muskelzusammensetzung gezeigt werden (Mykles *et al.*, 2002). Die Untersuchungen zeigen auch, dass die Innervierungsmuster und deren Stärke mit der Expression regulatorischer Proteinenisoformen korrelieren können (Mykles *et al.*, 2002).

Aus den Identifikationen der beiden Gelsolinisoformen in den verschiedenen Muskeln lässt sich ebenfalls eine Zuordnung in die Faserkategorien vornehmen. Während in dem tonischen Scherenschließmuskel aus der Brechschere vorwiegend die HG₂-Variante nachgewiesen wurde, konnte in schnellen, abdominalen Muskelsystemen hauptsächlich HG₁ identifiziert werden. Die Konzentrationen in den beiden Muskelsystemen, die Mengen an praktisch isolierten Isoformen, als auch der mengenmäßige Anteil der jeweilig anderen Variante (schätzungsweise 1/5) erwiesen sich als annähernd gleich. Auch im langsamen kontrahierenden Musculus adductor meropoditis aus den Pleopoden wurde vorwiegend HG₂ identifiziert. Scheren und Pleopoden sind phylogenetisch gesehen homologe Extremitäten und besitzen gleichsam Muskeln des S2 Fasertyps (Mykles *et al.*, 2002). Aus den Daten der Immunblatanalyse wird eine Korrelation zwischen Expressionsmuster der Isoformen und der Fasertypheterogenität nahegelegt. Möglicherweise synthetisieren schnelle Muskeln vorwiegend Isoform1, intermediäre Fasertypen wie beispielsweise die Musculi superficiales abdomini weisen beide Isoformen auf, wohingegen in langsam kontrahierenden Extremitätenmuskeln vorwiegend die leichteren Gelsolinvariante exprimiert wird. Wie bereits erwähnt impliziert die Identifikation verschiedener Expressionsmuster von Gelsolinvarianten in unterschiedlichen Muskeltypen die Existenz von Isoformen, kann sie jedoch nicht eindeutig belegen.

Hinweise auf die Existenz von zwei unterschiedlichen Isoformen ergaben sich nach der Quantifizierung der unterschiedlichen Verhältnisse der beiden Varianten in verschiedenen Muskelsystemen und der nachfolgenden Isolierung aus den Geweben. Durch die analytische (NH₄)₂SO₄-Fällung konnte ermittelt werden, dass sich die beiden Varianten durch unterschiedliche Sättigungskonzentrationen voneinander abgrenzen ließen. Die leichter HG₂ Variante präzipitiert bereits ab einer Sättigung durch Ammoniumsulfat von 35%, die schwerere Form wurde ab 50% (NH₄)₂SO₄ ausgefällt. Dieses unterschiedliche Verhalten ist nicht denkbar, wenn sich die Proteine nur aufgrund artifizierlicher oder

posttranslationaler Modifikationen unterscheiden würden. Die beiden Varianten ließen sich final durch einen KCl-Gradienten an einer Anionenaustauschersäule (MonoQTM HR 5/5) separieren. Das Elutionsprofil zeigte dabei Peaks bei ~360mM (HG₂) und ~375 mM KCl (HG₁). Die unterschiedlichen Elutionskonzentrationen belegen ebenfalls Abweichungen in der Struktur der nativen Proteine. Von den chromatographisch trennbaren Varianten wurden anschließend die Spaltmuster untersucht. Die limitierte Proteolyse zeigte, dass die zwei hinsichtlich ihres apparenten Molekulargewichts unterschiedlichen Proteine auch zwei voneinander abweichende Spaltmuster ergaben.

Die unterschiedlichen, apparenten Molekulargewichte aus der SDS-PAGE, die verschiedenen Expressionsmuster in den Muskeln, die distinkten Präzipitationseigenschaften in Gegenwart von Ammoniumsulfat, als auch das deutlich voneinander abgrenzbare Elutionsverhalten im Salzgradienten belegten nicht nur die Existenz von Isoformen, sondern verwiesen auch auf ihre Unterschiede, die durch funktionellen Analysen ermittelt werden konnten.

4.3 Crustaceengelsoline sind „klassische“ Gelsoline

Durch die vorliegenden, biochemischen Untersuchungen konnten die Actinmodulatoren aus den Humtermuskeln der Gelsolinefamilie zugeordnet werden. Der Nukleationseffekt von Gelsolin auf die Actinpolymerisation wird durch die Formation von ternären Komplexen mit Actin begünstigt, die Ausbildung der Nuclei erfolgt dabei wahrscheinlich durch Gelsolin in Komplex mit zwei Monomeren. Vertebratengelsoline binden am ersten und vierten Segment G-Actine und vermitteln eine antiparallele Orientierung der Monomere (Eichinger & Schleicher, 1992; Hestekamp *et al.*, 1993). Bock und Mitarbeiter (1994) postulierten im Falle des Actinmodulators aus *Astacus leptodactylus* die Ausbildung von quaternären Komplexen, deren Bildung sich bei der initialen Phase der Polymerisation möglicherweise auf eine geringere Verstärkung der Nucleationsförderung auswirkt, als das vergleichsweise bei Mammaliengelsolin der Fall ist.

Vergleichende Analysen zur Nucleationsaktivität deuten auf annähernd gleiche, wenn nicht gar stärkere Nucleationsbegünstigungen durch Gelsolin aus *Homarus americanus*, als durch Gelsolin aus der glatten Muskulatur von Mammaliern. Durch die Mobilität in einer hochauflösenden Gelfiltration wurden HG-Actin Komplexe mit denen von Mammaliengelsolin miteinander verglichen (Beulen, Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2002). In Anwesenheit von 0,5 mM Ca²⁺ zeigte sich die Ausbildung von 1:2 Komplexen.

Die Komplexbildung von Hummergelsolin mit monomerem Actin wurde in dieser Arbeit durch Quervernetzungsexperimente untersucht. In Anwesenheit von EDC wurden die beiden Gelsolinvarianten jeweils durch Calcium aktiviert und parallel mit G-Actin inkubiert. Aus den beiden Versuchsreihen konnte durch nachfolgende Immunblotanalysen Banden als Resultate von möglichen Quervernetzungsprodukten ermittelt werden, die jeweils auch eine Assoziation von Gelsolin mit zwei Monomeren favorisieren. Die beiden Gelsoline aus den unterschiedlichen Crustaceen könnten sich hinsichtlich dieser Eigenschaft natürlich auch unterscheiden.

Actin und Vertebratengelsolin bilden in Gegenwart von $\sim 200 \mu\text{M Ca}^{2+}$ stabile, ternäre Komplexe aus (Khaitlina & Hinssen 2002). Erst bei Ca^{2+} -Konzentrationen von $< 30 \mu\text{M}$ werden die Komplexe instabil und führen zur Dissoziation in einen 1:1 Komplex. Unterhalb von 10^{-7} M konnten keine Interaktionen beobachtet werden. In Anwesenheit von EGTA dissoziieren ternäre in binäre, EGTA-resistente Komplexe und freies Actin (Bryan & Kurth, 1984; Coue' *et al.*, 1985). Diese EGTA-sensitiven Komplexe sind für Vertebraten, Severin aus Dictyostelium (Giffard *et al.* 1984, Eichinger & Schleicher, 1992), Pecten-Gelsolin aus Mollusken (Remmert & Hinssen, 1996) und auch für EWAM beschreiben (D'Haese & Hinssen, 1987).

In Gegenwart von EGTA dissoziieren dagegen Komplexe aus Crustaceengelsolin und Actin vollständig. Im Falle von Gelsolin aus *H. americanus* sind möglicherweise die Bindungsstellen am C-Terminus, die bei Vertebratengelsolin eine Bindung an Actin vermitteln, nicht so hochaffin, wie es vergleichsweise bei Vertebraten der Fall ist. Durch die von Lück (1995) vorgelegten Sequenzdaten konnte eine inter- und eine intramolekulare Bindungsstelle für Calcium beschrieben werden, die sich aus bekannten Motiven von Gelsolin aus Vertebraten (McLaughlin *et al.*, 1993) ableiten ließ, Bindungsstellen für weitere Calciumionen sind für Hummergelsolin nicht identifiziert.

Diese vollständige Reversibilität von Gelsolin-Actin Interaktionen durch EGTA wurde genutzt, um die Hummergelsolin zu isolieren. Unter den gleichen Extraktionsbedingungen von Gelsolin aus der glatten Muskulatur von Vertebraten kann Gelsolin aus dem Komplex mit Actin nur durch Zugabe von Harnstoff separiert werden (Hinssen *et al.*, 1984). Der Verlauf der HG-Präparationen wurde durch viskosimetrische Fragmentationsmessungen in Gegenwart von $0,5 \text{ mM Ca}^{2+}$ begleitet. (Hinssen *et al.* 1984). Mit vorangeschrittenen Aufreinigungsstufen zeigten sich oftmals Zunahmen der Aktivität um mehr als 200fache. Die isolierten Gelsoline zeigten neben den nucleationsfördernden Eigenschaften, in denen

sich die beiden Varianten durch verschiedene molare Verhältnisse nicht signifikant unterschieden, auch calciumabhängige Fragmentationsaktivität.

In Viskositätsmessungen zeigten beide Varianten unterschiedliche Aktivierungsschwellen für die Fragmentation von F-Actin. HG₂ erzeugte durch Fragmentation bereits bei einer Calciumkonzentration von $\sim 4,2 * 10^{-8}$ M Ca²⁺ eine Reduktion der Viskosität, wohingegen HG₁ erst bei $\sim 2,8 * 10^{-7}$ M Ca²⁺ eine äquivalente Aktivität (25%) aufwies. Eine halbmaximale Aktivierung der Fragmentationsrate von Isoform 2 wurde bei $3,2 * 10^{-7}$ M Ca²⁺ erreicht. Isoform 1 zeigte diese erst bei $1,5 * 10^{-6}$ M Ca²⁺, bei der bereits 90% der Fragmentationsaktivität von HG₂ erreicht war. Damit zeigte sich eine um den Faktor 8,3 fache niedriger Konzentration für die HG₁ Aktivierung als für die von HG₁. Die Ansätze wurden mehrfach wiederholt, durch Reproduktion bestätigt und durch die sensitivere Fluorometrie ergänzt. Eine initiale Fragmentation durch Isoform 1 wurde erst ab einer Calciumkonzentration von $3,7 * 10^{-7}$ gemessen. Die Aktivierung der Fragmentation durch Isoform 2 benötigte 6,2x weniger freie Calciumionen. In Messungen mit höheren Calciumkonzentrationen wurde im Bereich von $\sim 3 * 10^{-5}$ M Ca²⁺ eine 100%ige Fragmentationsaktivität für die HG-Isoformen 1 ermittelt. HG₂ zeigte bereits bei $7 * 10^{-7}$ M Ca²⁺ maximale Fragmentationsaktivität. Diese Messungen waren ebenfalls vollständig reproduzierbar.

Theoretisch ist denkbar, dass eine Verunreinigung durch unvollständige Aufreinigung die Fragmentationsmessungen beeinträchtigt haben. Niedermolekulare Proteine in der Kontroll SDS-PAGE könnten das Gel nach Beendigung bereits passiert haben und hätten bei der Abstimmung der Proteinkonzentrationen zu nicht äquivalenten Bedingungen geführt, möglicherweise sogar die Aktivitäten der Proteine beeinträchtigt. Da die Präparationsmethode aber für beide Proteine synchron durchgeführt wurde und ähnlich niedrige Aktivierungsschwellen durch Calcium bereits für andere Actinmodulatoren aus Invertebraten (EWAM, Pecten-Gelsolin) ermittelt werden konnten, erscheint eine Beeinträchtigung eher unwahrscheinlich. Vergleichende Studien zur Fragmentationsaktivität von Invertebraten und Vertebraten deuten auf eine generell niedrigere Aktivierungsschwelle durch Calcium bei den Invertebraten-Actin-Modulatoren (Hinssen *et al.*, 1986).

Actinmodulator aus der quergestreiften Muskulatur von *Lumbricus* benötigen 3x mehr Ca²⁺ für eine halbmaximale Aktivierung, als vergleichsweise die isolierte Actomyosin ATPase des Muskels (D'Haese & Hinssen, 1987). Dieser Faktor wurde auch für die

durchgeführten Actomyosin-ATPasen der beiden Crustaceenmuskeln im Vergleich zu den Isoformen ermittelt. Die isolierten Actomyosine benötigen beide jeweils $\sim 3x$ weniger Calcium für vergleichbare Aktivitätsraten der Isoformen. Da sich die Bereiche aktivierender Calciumkonzentrationen überlappen, erscheint unklar, wie die beiden Prozesse *in vivo* unabhängig reguliert werden. Prinzipiell müßte einer vollständigen Aktivierung der ActomyosinATPase auch eine zumindest partielle Aktivierung der Gelsoline resultieren. Auf diese Überlegungen sollen im Verlaufe von Kapitel 5, zur Funktion von Gelsolin in Muskelzellen, vertieft eingegangen werden.

Aus den Aktivitätsvergleichen zeigte sich auch ein $[Ca^{2+}]$ -Unterschied zwischen den beiden Actomyosinen, der dem Unterschied der Isoformen proportional ist. Sowohl die Isoformen, als auch die Actomyosine zeigten distinkte Calciumaktivierungsschwellen und halbmaximale Aktivitätswerte, die sich jeweils beide um den Faktor 5-6 voneinander unterschieden. Der Scherenschließmuskel exprimiert hauptsächlich HG₂, Isoform1 wird in größeren Mengen im abdominalen Muskel gebildet. Es zeigten sich geringere Calciumschwellenwerte für die Aktivierung der Actomyosin ATPase und für die von HG₂ des langsamen *Crusher closer*-Muskel. Diese, aus voneinander unabhängigen Experimenten resultierenden Ergebnisse werden durch die Arbeiten von Galler & Neil (1994) bestätigt: Der S2-Fasertyp ist durch eine höhere Calciumsensitivität gekennzeichnet, als S1 Fasern.

Die Unterschiede in der Actomyosin ATPase/pCa Beziehung reflektieren möglicherweise auch Unterschiede in den Eigenschaften regulatorischer Proteine. In schnellen Muskeln von Hummern wurden drei Troponin C Isoformen ermittelt (Garone *et al.*, 1991), sollten diese Isoformen unterschiedliche Affinitäten zu Ca^{2+} besitzen, würden sie möglicherweise zur unterschiedlichen Calciumsensitivität der Fasertypen beitragen. Lehman und Szent-Gyorgyi (1975) zeigten, dass unterschiedliche Ca^{2+} -Regulationsmechanismen in den Fasertypen agieren. Die Kontraktion langsamer S2-Muskelfasern wird dual reguliert, schnell-kontrahierende Muskelfasern besitzen kein Myosin-basierendes Ca^{2+} -Regulationssystem.

Aus diesem Unterschied können physiologisch Implikationen gemacht werden: geringe Ca^{2+} -Grenzwerte für die Krafterzeugung von S2-Fasern ermöglichen möglicherweise andere calciumabhängige Prozesse in den Zellen oberhalb dieser Grenze. Es gibt Hinweise, dass unterschiedliche Calciumniveaus in den beiden Fasertypen die Kontraktion regulieren (Kaila & Voipio, 1990; Galler & Neil, 1994).

Physiologische gesehen bedeutet die Identifikation von zwei parallel exprimierten Gelsolinisoformen innerhalb der Muskelzellen ein biphasisches System, bei dem in calcium-abhängiger Weise erst eine Isoform und dann die andere aktiviert wird. Das deutet auf die Möglichkeit die Aktivität der Gelsoline stufenweise zu regulieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch umfassende Bindungsstudien gezeigt werden, dass die beiden Crustaceengelsoline sich in die Familie der klassische Gelsoline einreihen. Sie zeigen die typischen Gelsolin-Actin Interaktionen: Komplexbildung mit G-Actin, Verstärkung der Nucleation, Fragmentation von F-Actin, sie können als Kappe an (+)-Filamentenden verbleiben. Im Hinblick auf die Calciumabhängigkeit konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden identifizierten Isoformen festgestellt werden, der mit unterschiedlichen Calciumniveaus, die möglicherweise in den beiden verschiedenen Muskelsystemen vorliegen, korreliert.

4.4 Lokalisation von Gelsolin

Es wurden bereits mehrfach Studien vorgelegt, die Gelsolin in myogenen Zellen und in Skelettmuskeln als einen integralen Bestandteil von Myofibrillen darstellen (Rouayrence *et al.*, 1984; Dissman & Hinssen 1994; Gonsior & Hinssen, 1995). Andererseits liegt in Nichtmuskel- und Muskelzellen auch ein beträchtlicher Anteil cytosolisch vor (Lind *et al.*, 1987; Finidori *et al.*, 1992; Scholz & Hinssen, 1995). Aus lichtmikroskopischen Untersuchungen ging hervor, dass Mammaliengelsolin in Muskelzellen hauptsächlich im Bereich der dünnen Filamenten der I-Bande vorliegt. Diese Beobachtungen ließen sich auch aus den Immunfluoreszenz-Präparaten verschiedener Muskelfasern des Hummers entnehmen. Die expandierten Myofibrillen zeigten im Bereich der I-Bande eine deutliche Färbung, die dann aber in Bereichen überlappender Filamente (AI-Bande) vergleichsweise schwächer vorlag. In der Mitte der Sarkomere, wo die H-Zone vermutet wurde, zeigte sich vielfach keine Markierung mehr. Dies deutete prinzipiell auf eine mögliche Assoziation von Gelsolin an die dünnen Filamente, auch wenn dies lichtmikroskopisch nicht direkt gezeigt werden kann. Da die Färbung der actinhaltigen Strukturen aber nicht homogen vorlag, konnten auch keine Aussagen zur Verteilung des Gelsolins entlang dünner Filamente getroffen werden. Diese Färbemuster, die sich je nach Kontraktionsgrad der Myofibrillen unterschiedlich gestalteten, wurden ebenfalls bei Markierungen des Actins durch Rhodamin-Phalloidin beobachtet (Bukatina *et al.*, 1984; Antin *et al.*, 1986). Möglicherweise wurde die Markierung durch sterische Inhibition innerhalb der dichten AI-Bereiche beeinträchtigt und führten so zu vergleichsweise schwächeren Färbungen.

Andererseits wurde an Mausfibroblasten beobachtet, dass Gelsolin nicht ausschließlich an Actinfilamentbündeln assoziiert ist, sondern vor allem diffus im cytoplasmatischen Raum verteilt vorliegt (Cooper *et al.*, 1987, 1988). Chaponnier *et al.* (1985) verwiesen ebenfalls auf eine diffuse cytoplasmatische Verteilung von Gelsolin in weißen Blutzellen, was zuvor auch für kultivierte Lymphzellen gezeigt wurde (Thorstensson *et al.*, 1982). Dies bedeutet allerdings nicht, dass Gelsolin nicht an cytoplasmatischen Actinfilamenten vorliegt.

Kolokalisationen von Gelsolin mit Actin wurden von einigen Autoren als Resultat von Fixierungen gedeutet, die Assoziation sei *in situ* nur kurzzeitiger Natur. Eine Immunlokalisierung von Gelsolin in Vertebraten könnte auch durch die hohe Konzentration von Gelsolin im Serum beeinträchtigt worden sein (Kwiatkowski *et al.*, 1988b), was folglich zu fehlerhaften Folgerungen aus Annahmen einer Lokalisation entlang der Filamente permeabilisierter Zellen führe (Carron *et al.*, 1986). Hier wurde gezeigt, dass sich Gelsolin in Blutplättchen vorwiegend in der Zellperipherie befindet. Das diese Diskussion bis heute noch anhält, zeigte auch Guttman *et al.* (2006) mit Daten einer Kolokalisation von Gelsolin und Actin an ektoplasmatischen Bereichen von Sertolizellen, die einige Monate später reevaluiert wurde (Guttman *et al.*, 2007). Andererseits wurde unter Ausschluss von xenogenem Gelsolin die Assoziation von Gelsolin an Actinfilamenten bereits in Fibroblasten (Kanno & Sasaki, 1989) und im Bereich der I-Z-I Region im quergestreiften Vertebratenmuskel gezeigt (Dissman & Hinssen, 1994). Auch hier erlaubten die Resultate allerdings nicht eine direkte Schlussfolgerung auf eine Assoziation mit dünnen Filamenten.

Diese direkte Schlussfolgerung kann auch nicht ohne Weiteres erfolgen, da sie dem Model der Gelsolin-Actin Interaktion *in vitro* nicht entspricht. Ein Zustand, in dem Gelsolin lateral an F-Actin bindet und nicht schneidet, existiert nach den bisherigen Befunden nicht. Die Unklarheiten über die Verteilung von Gelsolin sollten durch gründliche elektronenmikroskopische Studien geklärt werden. In dieser Arbeit wird erstmalig die Lokalisation von Gelsolin in unterschiedlichen Muskelsystemen auf ultrastruktureller Ebene untersucht. Damit wird auch das bisherige Model auf eine Interaktion von Gelsolin mit dünnen Filamenten erweitert.

4.4.1 Ultrastrukturelle Eigenschaften unterschiedlicher Hummermuskeln

Als Extreme, innerhalb einer kontinuierlichen Fasertypheterogenität wurden der Scherenschließmuskel der Brechscheren (*Crusher closer*-Muskel) und der *Deep abdominal Extensormuskel* bereits charakterisiert (Jahromi & Atwood, 1969, 1971). Da sich aus den Immunblotanalysen unterschiedliche Verhältnisse der beiden Hummergelsoline ergaben, schien eine ultrastrukturelle Charakterisierung dieser Fasertypen in Hinsicht auf nachfolgende Markierung in sofern sinnvoll, als sich aus ihnen auch möglicherweise Aufschluss über Unterschiede zwischen den Isoformen gewinnen ließe.

Die Fasertypen unterscheiden sich morphologisch primär aufgrund ihrer unterschiedlich langen Sarkomere. Ob die Z-Scheiben (wellig vs. geradlinig) sich ebenfalls unterscheiden, kann aus den Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise resultieren die welligen Z-Scheiben aus der starken Expandierung der Sarkomere. Die welligen Z-Scheiben wurden aber bereits früher auf ultrastruktureller Ebene beschrieben (Jahromi & Atwood, 1971; Ogonowski *et al.*, 1980) und vermittelt den Sarkomeren des *Crusher*-muskels möglicherweise eine höhere Elastizität, die den starken Zugkräften entgegenwirkt.

Die beiden Fasertypen weisen auch unterschiedliche Verhältnisse zwischen dünnen und dicken Filamenten auf. Abseits dieser morphologischen Beobachtungen wurden diese Verhältnisse bereits biochemisch charakterisiert (Medler & Mykles, 2003). Im schnell kontrahierenden Muskel des Abdomens konnten die muskeltypischen Hexagone vergleichsweise gut ausgemacht werden, in dem Scherenmuskel wird ein dickes von zwölf dünnen Filamenten umgeben. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Lang *et al.* (1978) wurde dieses Verhältnis in dieser Arbeit auch als konstant ermittelt und bestätigen die Auswertung von Hayashi *et al.* (1981). An Querschnitten konnte beobachtet werden, dass Fasern mit hohen Verhältnissen von Actin- und Myosinfilamenten vergleichsweise elektronendichter waren, die Myosinfilamente des Scherenschließmuskels haben einen 30% größeren Durchmesser, als die in dem abdominalen *Extensormuskel*. Dieser Unterschied resultiert u.a. aus der höheren Anzahl und distinkten Anordnung von MyosinII-Molekülen in dicken Filamenten, die mit den Actinen umgebender, dünner Filamente während der Kontraktion interagieren (Hayes *et al.*, 1971). Die Myosinfilamente des tonischen *Crusher*-muskels sind ~4fach länger, als diejenigen aus dem abdominalen Muskelgewebe und besitzen eine von ihnen abweichende Verteilung der *myosin light chains* (Brown & Cantino, 2001), die direkt mit der Rate der ATP-Hydrolyse

am Myosinkopf korreliert und damit für die Kontraktionsgeschwindigkeit verantwortlich sind (Schiaffino & Reggiani, 1996).

In Crustaceenmuskeln wurden von 2 bis 19% Paramyosin relativ am Gehalt des Myosins ermittelt, die mit der Erscheinung der geringen Dichte in transversen Schnitten durch den Kern von dicken Filamenten korrelieren (Kehrel, 1982). Die Region in der Mitte der A-Bande weist ein solides transversales Profil auf, zeigt einen Durchmesser von 25nm und ist 140nm lang, was den schmalsten Bereich (M-Linie) eines durchschnittlich 2,7 μm langen Sarkomers ausmacht (Ashton *et al.*, 1987). Die beiden Fasertypen enthalten auch unterschiedliche Anteile an Paramyosinisoformen, die je nach Anteil die verschiedenen Filamenttypen unterschiedlich stark stabilisieren (Medler & Mykles, 2003).

Aus vergleichenden *in vitro* Studien wurde die Existenz einer *bare zone* in dicken Filamenten des Scherenschließmuskels ermittelt (Hayashi *et al.*, 1981). Dieser Bereich des Filaments ist frei von Myosinköpfchen und hat einen deutlich sichtbaren, geringeren Durchmesser, obwohl dort akzessorische Proteine die Myosinfilamente im Sarkomer miteinander verknüpfen. Am Rand dieses Bereiches wird je nach Kontraktionszustand der Sarkomere die H-Zone sichtbar, die als actinfreie Zone definiert ist. Die Abwesenheit von Actin und der MyosinII-Moleküle führt zu einer vergleichsweise deutlichen Beobachtbarkeit der hellen H-Zone in der Mitte des Sarkomere. Diese Zonen konnten im stark expandierten Scherenschließmuskel nicht so eindeutig ermittelt werden, wie in schnellen Muskelfasern. Bei starken Vergrößerungen konnten die Grenzen der AI-Zonen und die anschließende Abwesenheit der Actinfilamente in den Sarkomermitten eindeutig beobachtet werden.

Auffällig erschienen auch vergleichsweise enormen Durchmesser einiger Myofibrillen des abdominalen *Extensormuskels*. In Längsschnitten wurde oftmals eine Dicke von 8 μm beobachtet. Während des Wachstums können sich individuelle Myofibrillen mit großem Durchmesser longitudinal teilen (Goldspink, 1972). Ein Teil der durch Kontraktion resultierenden Kraft wirkt auch rechtwinklich zur Achse von Myofibrillen mit hohem Durchmesser so das die Z-Scheibe aufgebrochen wird. Daraus resultiert einer Separation der Myofibrille in zwei schmalere Tochtermyofibrillen.

Es konnten grundsätzliche Unterschiede zwischen den Muskelfasertypen beobachtet werden, die aber nicht direkt Aufschluss über die Gelsolinisoformen vermittelten. Möglicherweise sorgt die vergleichsweise weniger extensive Ausbildung des sarkoplasmatischen Retikulums (Loesser *et al.*, 1992) in langsamen Muskeln für eine

leichtere Diffusion der Proteine von und zu den Myofibrillen, als auch für unterschiedliche Calciumkonzentrationen in den Muskelfasertypen, wie durch die Actomyosinexperimente, als auch durch die unterschiedlichen calciumabhängigen Isoformaktivitäten impliziert wurde. Ohne weitere Untersuchungen verbleibt diese Annahme aber als spekulativ.

4.4.2 Ultrastrukturelle Immunlokalisation von Gelsolin unter physiologischen Bedingungen

Die Ergebnisse aus lichtmikroskopischen Beobachtungen, die nicht zu eindeutigen Aussagen über die Lokalisation von Gelsolin in Muskelzellen führten, sollten in der vorliegenden Arbeit mit vergleichenden Studien auf ultrastrukturellem Niveau geklärt werden. Dazu wurden verschieden Muskelpräparate expandiert, fixiert und in LRWhite eingebettet. Die Strukturhaltung der Präparate ist im Vergleich zu osmierten und glutaraldehydfixierten Präparaten schlechter, aus Markierungsversuchen stark fixierter Muskelproben resultierten jedoch keine verwendbaren Färbungen. Dennoch zeigten sich, dass auch in markierbaren Präparate bis auf das Fehlen von Glycogen und der „Deformierung“ einiger Organellen wie Mitochondrien und Zellkernen die Myofibrillen strukturell vergleichsweise gut konserviert wurden.

Die Ultradünnschnitte wurden dann vielfach bei unterschiedlichen Bedingungen mit den HG-Antiseren und Zweitantikörpern, die mit verschiedenen Partikelgrößen konjugiert wurden, inkubiert. Aus einer Analyse von Markierungen mit Antikörpern, die mit vergleichsweise großen Goldkörnchen (Partikeldurchmesser = 20nm) ausgeführt wurden, ergaben sich geringere Partikelabundanzen als mit „kleineren Partikeln“, ohne dass sich dabei wesentliche Unterschiede im Verteilungsmuster der Goldpartikel beobachten ließen. Es wurden auch Zweitantikörper verwendet, die mit 5nm Goldkörner konjugiert wurden, da diese Partikel besonders in den dicht gepackten Sarkomeren des Scherenschließmuskels nur schwerer zu identifizieren waren, wurden für Markierungen und nachfolgende Analysen grundsätzlich *goat-anti-rabbit* 10nm Gold Antikörper verwendet.

Nach den Markierungen konnten am Elektronenmikroskop die Goldpartikel vorwiegend auf den Myofibrillen lokalisiert werden. Das zentrale Myoplasma wurde geringer markiert, als die Myofibrillen und nur sehr wenige Partikel wurden auf zellulären Kompartimenten wie dem Zellkern oder den Mitochondrien beobachtet. Auf dem Schnitt, wo keine eingebetteten Strukturen vorhanden waren, wurden nur vereinzelte Partikel

beobachtet; auch in extrazellulären Bereichen wurden nur wenige Partikel ermittelt. Durch Inkubationen von Ultradünnschnitten des abdominalen *Extensor*-Muskels und denen des *Crusher-closer*-Muskels mit den beiden HG-Antisera wurden ~90% aller ermittelten Partikel auf den Myofibrillen ausgezählt. In beiden Muskelsystemen konnte auf den Myofibrillen ein annähernd 10fach höhere Partikelzahl/Fläche gegenüber nicht-sarcomerischen Strukturen festgestellt werden.

Auffällig erschienen lokale Bereiche nahe den Z-Scheiben des Crasher Muskels, an denen sich nur sehr wenige Goldpartikel ausmachen ließen, die Aggregation dieser dünner Filamente wurde auch in glutaraldehyd-fixierten Übersichtspräparaten beobachtet. Möglicherweise wurden Epitope für die Bindung der verwendeten Antikörper verdeckt. Sich kontinuierlich anschließende, parallel orientierte Actinfilamente wurden intensiv markiert. Die Analysen der intrasarkomerischen Partikelverteilungen der beiden unterschiedlichen Fasertypen zeigten beide weitgehend homogene Verteilungen der Goldpartikel im Bereich dünner Filamente. Für den abdominalen *Extensor* Muskel wurden gleiche Partikelabundanz für die I- und AI-Banden ermittelt, für den Scherenschließmuskel zeigte sich eine 1,3 fache Erhöhung der Partikel pro Fläche auf der I-Bande im Vergleich zur A-Bande. Die AI-Bande der beiden Muskelfasertypen unterscheiden sich in Bereichen überlappender Filamente: im *Crusher*-Muskel sind diese Regionen wesentlich elektronendichter. Dies könnte zu einer sterischen Inhibition bei den Markierungsversuchen geführt haben, aus der dann niedrigere Partikelzahlen resultierten. Das sich *in vivo* in diesen Bereichen aufgrund der hohen Dichte tatsächlich weniger Gelsolinmoleküle befinden ist ebenfalls denkbar, erscheint jedoch unwahrscheinlich, da sich im kontrahierten Muskel die räumliche Enge natürlich auch für die Bereiche der geringfügig stärker markierten I-Bande ergibt.

In beiden Muskelsystemen führten die Markierungen von Gelsolin zu geringen Partikelzahlen im Bereich der H-Zonen. Parallel dazu zeigten sich intensive Markierungen durch Partikel an actinhaltigen Strukturen innerhalb der Sarkomere. Dabei wurde sehr häufig eine direkte Kollokalisierung der Partikel mit dünnen Filamenten beobachtet. Aus der Orientierung der Bindung durch die beiden Antikörper resultierte ein mehr oder weniger geringer Abstand zum jeweiligen dünnen Filament. Dieser Abstand war nie so groß, als das sich daraus eine lokale Präsenz von Gelsolin hätte schließen lassen können, die nicht auf einer direkten Assoziation an die Filamente beruhte.

Die in dieser Arbeit erstmalig vorgelegten, ultrastrukturellen Studien von Markierungen an den verschiedenen Muskeltypen unter normalen physiologischen Bedingungen lassen eindeutig die Aussage zu, dass Gelsolin laterale entlang der gesamten dünnen Filamente im Muskel assoziiert ist.

Die Markierungen an den Muskeln der Zoea-Hummerlarven zeigten ein übereinstimmendes Bild: ~90% aller ausgezählten Goldpartikel wurden auf den Myofibrillen ermittelt. Bei den Untersuchungen von Färbungen des antennalen Remotormuskels, aber auch an den Markierungen abdominaler Muskeln, wurden vielfach Goldpartikel unmittelbar an und auf den Filamenten beobachtet. Gelsolin liegt hier ebenfalls in Kolokalisation mit den dünnen Filamenten vor.

Da die verwendeten Antiseren nicht isoformspezifisch sind, kann aus den Lokalisationsstudien keine direkte Aussage zur Verteilung der Isoformen gemacht werden. Aus den Immunblotanalysen geht aber hervor, dass in den beiden markierten Muskelfasertypen vorzugsweise jeweils eine Isoform exprimiert wird. Durch die Aufreinigung der Isoformen aus den Muskeln wurden unterschiedliche Mengen gewonnen, die ebenfalls zeigten, dass in den jeweiligen Muskeln vorwiegend eine Isoform vorliegt. Da aus den intensiven Markierungen gleichsam die Assoziation der Gelsoline an dünne Filamente hervorgeht, wird angenommen, dass sich die Isoformen bezüglich ihrer Lokalisation im Muskel nicht unterscheiden.

4.4.3 Ultrastrukturelle Immunlokalisation von Gelsolin unter modifizierten physiologischen Bedingungen

Aus den biochemischen Daten wurde ersichtlich, dass die calciumabhängige Bindung der Hummergelsoline an Actin reversibel ist. Diese Reversibilität zeigte sich schon anfangs in der Aufreinigung der einzelnen Isoformen und in indirekter Weise aus den Cosedimentationsexperimenten der beiden Isoformen in Gegenwart des Calcium-EGTA-Puffersystems. Auch aus Untersuchungen an Gelsolin Actin Komplexen ging eine vollständige Reversibilität hervor (Bock *et al.*, 1994). Unklar war allerdings, ob sich diese Reversibilität auch durch Immunlokalisationen an intakten Zellen zeigen lassen kann.

Muskelproben des M. adductor dactylopodis und des M. anterior obliquus wurden in Ringerlösung (1) ohne Calcium und (2) mit 0,5 mM EGTA inkubiert. Die nachfolgenden Immunmarkierungen wurden in gleicher Weise angefertigt, wie sie bereits in Gegenwart von Calcium ausgeführt wurden. Die Inkubation unter physiologischen Bedingungen in

Abwesenheit von Calcium erzeugte eine vergleichsweise schwache Strukturhaltung. Es konnten nur noch sehr wenige Zellkerne und Mitochondrien beobachtet werden, die Myofibrillenstrukturen zeigten geringere Dichten, besonders an den Z-Scheiben. Die Membranen waren aber intakt und es wurde vermutet, dass die dort lokalisierten Calciumpumpen die intrazelluläre Calciumkonzentration entgegen dem Gradienten des extrazellulären Milieus stark erniedrigt hatten.

Aus den Analysen der Partikelverteilung des abdominalen Muskels wurde deutlich, dass an den Membranen die Partikelzahlen pro Fläche 3,2-fach höher waren, als auf den Myofibrillen. Zusammen mit den cytosolisch ermittelten Partikeln verblieben nur noch 1/5 der Gesamtpartikel auf den Myofibrillen. Ein ähnliches Bild resultierte aus Beobachtungen des Schließmuskels: die ermittelten Partikelsummen belegen eine gegenüber den Myofibrillen 1,5x höhere Partikelabundanz im Bereich des Sarkolemmas. In calciumfreien Muskelpräparaten konnte eine 4x (*Extensor*), beziehungsweise doppelt (*Crusher*) so hohe cytosolische Partikelabundanz gegenüber den Abundanzen der Myofibrillen ermittelt werden. Abseits der morphologischen Defekte zeigte sich deutlich, dass die Assoziation von Gelsolin an dünne Filamente in calciumabhängiger Weise reversibel ist. Andererseits wurde auch deutlich, dass ein Teil des Gelsolins an den dünnen Filamenten verblieb und möglicherweise nicht mehr einer Calciumabhängigkeit unterliegt.

4.4.4 Immunlokalisation von Gelsolin in isolierten Myofibrillen

Um zu klären, ob ein Teil des actin-assoziierten Gelsolins irreversibel, bzw. calciumunabhängig gebunden vorliegt, wurden Myofibrillen in Anwesenheit von EGTA isoliert und markiert. Sowohl die Markierung des F-Aktins durch Rhodamin-Phalloidin, als auch die Gelsolinfärbung an verschiedenen Muskelfasertypen erzeugten periodische Fluoreszenzmuster. Durch Phasenkontrastaufnahmen und der Übereinanderlagerung der Aufnahmen konnte die Rhodamin-Phalloidin Färbung dem I-Z-I Bereich der expandierten Sarkomere zugeordnet werden. Im Bereiche der AI-Bande ließ sich keine Fluoreszenz ausmachen. Die Gelsolinmarkierung zeigt, durch Identifikation im Phasenkontrast, eine Färbung der I-Banden, die Z-Scheiben und Bereiche in unmittelbarer Nähe blieben ungefärbt. In der AI-Bande konnte eine vergleichsweise schwache Markierung beobachtet werden. Das Ergebnis der Färbungen an verschiedenen Muskeln zeigt, dass ein Anteil des Gelsolins nicht durch Komplexbildung gebundener Calciumionen extrahiert werden kann. Diese lichtmikroskopischen Beobachtungen von actin-gebundenem, calciumunabhängig reguliertem Gelsolin wurden durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an

isolierten Myofibrillen bestätigt. An Gelsolin-markierten Myofibrillen des *Crushers* konnten sowohl in der I-Bande, als auch im AI-Bereich zahlreiche Goldpartikel beobachtet werden.

Eine Interpretation dieser Befunde bleibt spekulativ. Möglicherweise ist dieser zelluläre Anteil des Gelsolins calciuminsensitiv, andererseits könnte die Calciumbindestelle, die eine Assoziation mit den Actinfilamenten bedingt auch durch die Interaktion mit weiteren Proteinen kryptisch geworden sein. Denkbar wäre auch eine Interaktion von Gelsolin mit Tropomyosin, die bereits für Mammaliargelsoline gezeigt wurde und dessen weitere Bedeutung noch unklar ist (McGough, 2003). Möglicherweise führt die Interaktion dazu, das Gelsoline im Muskel calciumunabhängig agieren können. Gelsoline können nach der Fragmentation nur durch Phospholipide von Actinfilamenten sequestriert werden (Janmay & Stossel, 1987; Yin & Janmay, 2003), so dass es auch möglich erscheint, dass diese mutmaßlichen 20% der Gelsoline den Anteil darstellen, der die dünnen Filamente ohne deutlich erkennbare Fragmentation geschnitten haben. Analog dem Mechanismus der Fragmentation von F-Actin könnte Gelsolin dann am Ende des Filaments als Kappe verbleiben.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Isoformen im Bezug auf die Actin-Interaktion in ihrer Calciumabhängigkeit unterscheiden. In den verschiedenen Fasertypen liegen beide Isoformen jeweils mit dünnen Filamenten kolokalisiert vor. Da in den Muskelfasern immer auch ein vergleichsweise geringer Anteil der jeweilig anderen Isoform exprimiert wird, der mengenmäßig dem durch EGTA nicht von dünnen Filamenten dissoziierbaren Anteil entspricht, erscheint letztlich auch denkbar, dass diese jeweiligen Isoformen sich nicht nur in ihrer Calciumabhängigkeit, sondern auch durch spezifische Interaktionen mit Proteinen (Actin, Tropomyosin) der dünnen Filamente der verschiedenen Fasertypen unterscheiden. Welche Funktion dieser jeweilig geringere Isoformanteil in den jeweiligen Muskelfasern besitzt bleibt unklar und es gibt auch letztlich keine Beweise, die eine dieser Vermutungen untermauern können.

Aus den Untersuchungen bei unterschiedlichen physiologischen Bedingungen resultiert, dass ein Großteil des Gelsolins entlang der dünnen Filamente assoziiert ist. Da dieses Ergebnis aus experimentellen Ansätzen mit höheren Calciumkonzentrationen resultiert, als sie zellulär erreicht werden, muß im Hinblick auf die ermittelte Relokalisation in Abwesenheit von Calcium die Aussage zur Lokalisation *in vivo* überdacht werden. Die erstmalig in dieser Arbeit durchgeführten Immunlokalisationen an den Muskeln der Zoea-

Larven zeigen ebenfalls die Assoziation von Gelsolin an dünne Filamente. Die Larven wurden nach der Entnahme vom Muttertier sofort in Seewasser-PFA fixiert. Daraus resultieren physiologische Bedingungen, welche die intrazellulären Calciumspiegel wahrscheinlich nicht wesentlich beeinträchtigt haben. Annähernd 90% der Goldpartikel wurde auf den Myofibrillen verschiedener Muskelfasertypen ausgezählt. Damit wird die favorisierte Annahme der Kolo-kalisation von Gelsolin mit dünnen Filamenten bestätigt.

Bei der Untersuchung der Myofibrillen von Zoea Larven wurde auch deutlich, dass die Sarkomere noch nicht so hochgeordnete Struktur darstellen, wie es vergleichsweise bei adulten Muskeln zu beobachten ist. Die Myofibrillen der Larven unterliegen durch vergleichsweise stärkeres Wachstum und den schnelleren Häutungszyklen einer höheren Dynamik. In den Immunlokalisationsstudien an den Larven ließ sich, wie auch an Untersuchungen adulter Muskeln, keine vollständige Degradierung der Filamente durch Gelsolin beobachten. Vielmehr impliziert die homogene Verteilung von Gelsolin entlang der dünnen Filamente in den sich organisierende Muskelzellen Hinweise auf die Funktion von Gelsolin in Muskeln.

4.5 Zur Funktion von Gelsolin in Muskelzellen

5.5.1 Der Proteinturnover in Muskelzellen

In Nichtmuskelzellen ist der Erhalt der Dynamik des Actin-basierten Cytoskeletts von entscheidender Bedeutung. Actin modulierenden Proteinen wie Gelsolin sind zur Aufrechterhaltung dieser Dynamik essenziell und spielen für den *turnover* des Actins eine wesentliche Rolle.

Die Muskelsysteme erscheinen weniger variabel, dünne Filamente sind an ihren beiden Enden mit einer Kappe versehen (Plusende: CapZ, Minusende: Tropomodulin) und auch lateral durch assoziierte Filamentsysteme stabilisiert. Die Integrität der Myofibrillen ist für die Erzeugung und Übertragung der Kontraktionskraft essentiell. Aber auch nach Abschluss der Genese sind Myofibrillen keine absolut starren Strukturen, sondern sie unterliegen einer dynamischen Reorganisation. Die Proteine werden kontinuierlich abgebaut und ersetzt, die Raten unterscheiden sich im Bezug auf einzelne Fasertypen, dem Ernährungszustand und nach dem Alter der Organismen (Millward, 1980).

Da diese Überlegungen schon frühzeitig angestellt wurden, zeigen Studien mit radioaktiv-markierten Aminosäuren (Oja, 1967, Goldberg, 1969, 1971 Millward, 1971,

Millward *et al.*, 1976, Bates & Millward 1983): Velick (1956) verglich die relative Konzentrationen von Phenylalanin und Thyrosin in vielen aufgereinigten und isolierten myofibrillären Proteinen und glykolytischen Enzymen aus dem Kaninchenskelettmuskel. Die relativen Inkooperationsraten von Actin, Myosin und Tropomyosin, ermittelt aus den Aktivitäten war 1:1,5:2,4. Velick zeigte damit erstmalig, dass myofibrilläre Proteine unterschiedliche Syntheseraten aufweisen. Daraus ließ sich schließen, dass sich die relativen Turnoverraten sich unterscheiden, möglicherweise mit einer sechsfach unterschiedlichen Rate zwischen den am schnellsten ausgetauschten Proteinen (Troponin und M-Protein) und den „Langsamsten“ (Actin). Dadurch wurde auch klar, dass die funktionellen Einheiten nicht als gesamtes ausgewechselt werden, sondern dass es Prozesse geben muß, welche den individuellen Austausch von Proteinen vermitteln. Die Beziehung zwischen Gesamtproteinsynthese~ sowie Degradierungsraten und den Turnoverraten individueller, myofibrillärer Proteine wurde später von Bates und Millward (1983) untersucht. Dabei zeigte sich, dass die langsamere *turnover*-Rate myofibrillärer Proteine sensitiver für Veränderungen (ermittelt aus dem Gesamtturnover) ist, als die vergleichsweise schnellere Rate sarkoplasmatischen Proteins. Das bedeutet, dass auch unter verschiedenen Ernährungsbedingungen eine konstante Gewebekomposition etabliert bleibt. Unklar verblieb jedoch, wie die individuelle Proteine ausgetauscht werden.

4.5.2 Myofibrilläre Dynamik in Muskelzellen

Mit Blick auf die Schneide~ und Nucleationseigenschaften werden die vermuteten Funktionen der Gelsolin verwandten Proteine in Muskeln im Zusammenhang mit dem Auf~ und Umbau der dünnen Filamente gesehen (Rouayrenc *et al.*, 1984). Es liegen Befunde aus Experimenten mit Gelsolin an rekonstituierten Filamenten vor, die eine Beteiligung an der Regulation der Kontraktion in Betracht ziehen. Die Mechanismen sind aber noch unklar und es muss bedacht werden, dass sich solch komplexe Systeme *in vitro* von den nativen Systemen stark unterscheiden können. In glatten Muskelzellen scheint eine direkte Beeinträchtigung der Calciumsensitivität der Actomyosin-ATPase durch Reduktion der Caldesmon-Inhibition des Gelsolins möglich. Gelsolin hat demnach möglicherweise einen begünstigenden Effekt auf Calmodulin, was die Inhibition von Caldesmon auf die Actin-aktivierte MyosinATPase aufhebt. Diese Bedeutung des Gelsolins sollte eher als ein sekundärer Effekt angesehen werden, da es die wesentlichen Funktionen von Gelsolin nicht widerspiegelt.

Die Beteiligung von Gelsolin in adulten Skelettmuskelzellen an der Begünstigung einer Nukleation während der Aktinpolymerisation erscheint physiologische eher wenig relevant, daher rückt die Fragmentationsaktivität als wesentliche Funktion in den Vordergrund. Es wurde bereits nahegelegt, dass Vertebratengelsolin *in situ* an dünne Filamente assoziiert ist, ohne sie zu zerschneiden (Gonsior & Hinssen, 1994).

Fluoreszierende Actinmonomere, die in adulte Herzmuskelzellen injiziert wurden, sind bereits nach 30 sec. nach der Injektion in die I-Bande und Z-Scheibe eingebaut worden (Dome *et al.*, 1988, Lorusso *et al.*, 1992). Otey *et al.* (1988) beobachtete bei skeletalen Myotuben geringe Präferenzen für den Einbau von α -Actin in Myofibrillen und cytoplasmatischen γ -Actin in cortikale Regionen. Die Sortierung der Isoformen war in den Myotuben folglich weit weniger stringent, als sie vergleichsweise in adulten Skelettmuskelzellen zu beobachten ist (Gunning *et al.*, 1998). Die Muskelisoformen von α -Actin, α - & β -Tropomyosin und sarcomerischem MyosinII sind im adulten Zellen im quergestreiften Kontraktionsapparat lokalisiert, der das Zentrum der Muskelzelle ausfüllt. Nichtmuskelisoformen sind im Membran-assoziierten Cytoskelett mit β -Actin und einem an neuromuskulären Verknüpfungen angereicherten Tropomyosin lokalisiert. γ -Actin kommt an Costameren, dem Sarcolemma und in Filamenten vor, die Mitochondrien umrunden und kolokalisieren mit nichtmuskel-MyosinII. (Fallon & Nachmias, 1980, Lubit & Schwartz, 1980; Hall *et al.*, 1981; Lubit 1984; Anthony *et al.*, 1988). Ähnliche Studie der *initialen* Skelettmuskeldifferenzierung zeigt ebenfalls keine signifikante Differenzierung von α - und γ -Actin (Handel *et al.*, 1989). Es ist unklar warum während der Myogenese verschiedene Actine redundant in Myofibrillen eingebaut werden, in adulten Zellen aber eine Sortierung vorliegt. Noch weniger klar ist, wie diese Sortierung bis zum adulten Stadium vorgenommen wird.

Die Gelsolinkonzentration steigt in sich ausdifferenzierenden Skelettmyoblasten an (Chaponnier *et al.* 1989, Scholz & Hinssen, 1995). Von Gelsolin wird angenommen, das es durch seine Fragmentationsfunktion beim Zusammenbau der Myofibrillen eine wesentliche organisatorische Rolle übernimmt. Gelsolin wird dabei in die zu einem großen Teil in die Myofibrillen inkooperiert. Dabei wurde überlegt, dass Nichtmuskelproteinisoformen als Schablone für den Zusammenbau früher Myofibrillen dienen könnten (Holtzer *et al.* 1987), die dann nach Abschluss der Myogenese durch Gelsolin degradiert werden könnten. Die funktionelle Rolle beim Zusammenbau der Myofibrillen kann sich möglicherweise auch auf die Sortierung der Actinisoformen ausweiten lassen. Eberhart *et al.* (1990) zeigt in regenerierenden, adulten Cardiomyocyten, dass α -

Skelettmuskelactin primär in myofibrillären Strukturen lokalisiert ist, wohingegen α -Glattmuskelactin verstärkt in nicht-myofibrillären, stressfaserartigen Strukturen beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu ist α -Glattmuskelactin in fetalen Geweben in myofibrillären Strukturen akkumuliert. Wie und ob diese Sortierung durch Gelsoline vorgenommen wird ist nicht belegt, theoretisch können auch andere Proteine wie beispielsweise Cofilin mit seinen Filament-schneidenden Funktionen diese Aufgabe übernehmen.

Chaponier *et al.* (1990) demonstrierte einen wechselnden Gehalt von Gelsolin in der glatten Muskulatur der Aorta im Laufe der Entwicklung, Migration und Proliferation. Bei einer Verletzung der Gefäße werden die Myofilamente stark umorganisiert, der Gehalt an Gelsolin stieg dann jedoch nicht über den Gehalt normaler, unverletzter Muskelzellen. Das deutet auf eine permanente Rolle, wie sie beispielsweise beim *Turnover*prozess denkbar ist. Andererseits zeigten Rattenversuche, dass unter katabolen Bedingungen die Aktivität von Gelsolin zunimmt, möglicherweise um Actinfilamente abzubauen und zu verstoffwechseln (D'Haese *et al.*, 1987). Skinner (1966) konnte zeigen, dass sich die Muskulatur von Crustaceen bei der Häutung um 40% reduziert. Durch Immunblotanalysen der Zoea¹ Larven, die innerhalb einer Woche einen Ecdysiscyklus durchlaufen, konnte keine signifikante Konzentrationserhöhung festgestellt werden. Da solche Untersuchungen aufgrund hoher Proteaseaktivitäten bei juvenilen Organismen nicht unproblematisch sind, wurden die Immunblotanalysen mehrfach wiederholt. Aus allen Ansätzen zeigten sich tendenziell eher gleichbleibende Gelsolinkonzentrationen. Es wird daher angenommen, dass Gelsolin keinen wesentlichen Einfluß auf die Muskelreduktion während der Häutung von Crustaceen hat. Diese Aufgaben werden besonders von Proteasen der Calpaninfamilie übernommen (Mykles & Skinner, 1983; 1986; Yu & Mykles, 2003).

Im Gegensatz zur Hochregulierung während der Myogenese fällt die Gelsolinkonzentration, in neonatalen Muskeln stetig. Die Gelsolinkonzentration in adulten Skelettmuskeln von Vertebraten ist vergleichsweise niedrig (50-100ng/mg Protein, Hinssen, unpubliziert, Kwiatkowski *et al.*, 1988). In adulten Skelettmuskeln von Invertebraten sind weit höhere Gelsolinkonzentrationen (~ 20 fach) vorhanden. Auch hier ist die Funktion ungeklärt, es wird parallel zur Funktion bei Vertebraten vermutet, dass gealterte Actinmoleküle aus den Filamenten herausgeschnitten werden (Rouayrenc *et al.*, 1984, Gonsior & Hinssen, 1995).

4.5.3 Invertebratenactine sind instabiler als Vertebratenactine

Eine höhere Gelsolinkonzentration bei Invertebraten ist möglicherweise Folge einer geringeren Stabilität von Actinfilamenten. In G-Actinen ist das gebundene Nucleotid normalerweise ATP, dagegen besitzen die Actinuntereinheiten im Polymer gebundenes ADP. Ein Austausch des eng gebundenen ADP zu ATP erzeugt eine Öffnung der C-terminalen Aminosäuren (Kim *et al.*, 1995). Ähnliche intramolekulare Bewegungen wurden an Untereinheiten von F-Actin beobachtet. Die Freisetzung von anorganischem Phosphat aus der ATP-Hydrolyse resultiert in einer Reorientierung der Subdomäne 2 (Muhlrad *et al.*, 1994), was zur Destabilisierung der Filamente führt (Egelman & Orlova, 1995). Vergleichende proteolytische Spaltungsexperimente zwischen Kaninchen-skelettmuskelactin und Actin aus Jacobsmuscheln zeigen schnellere tryptische Spaltungen des Actins aus den Invertebraten. Es wird angenommen, dass Aminosäuresubstitutionen an der Subdomäne 1 diese Begünstigung verursachen (Khaitlina *et al.*, 1999). Ein Austausch von Calcium gegen Magnesium konnte die Trypsinolyse des Molluskenactins weniger effizient inhibieren, als es bei Kaninchenactin der Fall war. Das impliziert, dass im *Scallop*-Mg-G-Actin die Nucleotidspalte stärker geöffnet vorliegt, als im Skelettmuskelactin von Vertebraten. Diese Unterschiede konnten durch Vergleiche von γ -Glattmuskelactin und Skelettmuskel α -Actin bei Vertebraten nicht ermittelt werden. Vertebraten-Skelettmuskelactin besitzt eine höhere Affinität zu ATP, als das cytoplasmatische Actin aus Hefen, der Nucleotidaustausch in Hefen zeigt eine fünfmal höhere Rate als im Skelettmuskelactin der Vertebraten (Miller *et al.*, 1995).

Vergleichende Untersuchungen an unterschiedlichen, nichtsarcomerischen Mg-Actinen zeigen, dass Skelettmuskel- α -Actinmonomere eine geschlossener Konformation aufweisen, als andere Actin Isoformen (Khaitlina, 2001). Proteolytische Spaltungsexperimente an F-Actin aus Kaninchen-skelettmuskeln und *Scallop* F-Actin mit Subtilisin zeigen das Mollusken F-Actin für eine Proteolyse stärker zugänglich ist (Khaitlina *et al.* 1999). Es konnte so gezeigt werden, dass die Nucleotidspalte im Polymer in einer offeneren Konformation vorliegt, als im Skelettmuskel F-Actin. Auch in Hefen liegen strukturelle Unterschiede im Vergleich zu Vertebratenactinen vor. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Filamenten deckten schwächere Kontakte zwischen den einzelnen Untereinheiten im Filament von Hefeactin auf (Kim *et al.*, 1996), die ebenfalls zu vergleichsweise schwächeren Färbungen durch Rhodamin-Phalloidin führten (La Cruz & Pollard, 1996). Die Unterschiede in der Stabilität von verschiedenen Actin-

filamenten korrelieren mit einer weiter geöffneten Position der Spalte in Hefe und Molluskenactin, als bei Vertebratenskelettmuskelactin.

Diese Studien zeigen, dass die Actine aus Invertebraten nicht so stabil sind, wie die der Vertebraten. Das impliziert folglich Mechanismen in Muskelzellen von Invertebraten, welche für den Austausch instabiler Actine aus den dünnen Filamenten sorgen. Wie der Austausch „gealterter“ Actine vorgenommen wird ist ungeklärt, gleichsam gibt es bis dato keine Daten zu Synthese oder *Turnover*raten myofibrillärer Proteine in Invertebratenmuskeln.

4.5.4 Zur Funktion von Gelsolin in Invertebratenmuskeln

Die Funktion von Gelsolin und auch der Grund für die vergleichsweise hohen Konzentrationen im Invertebratenmuskel sind und verbleiben ungeklärt. Es erscheint lediglich denkbar, dass die instabilen bzw. gealterten Actinmonomere durch eine Fragmentation von Gelsolin aus den dünnen Filamenten herausgeschnitten werden. Diese strukturelle Reorganisation würde zum Erhalt der Kontraktionsfähigkeit der Sarkomere beitragen (Dissmann & Hinssen, 1992). Gelsolin könnte bei Invertebraten folglich eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität kontraktieller Strukturen des Skelettmuskels übernehmen und würde demnach einen, im Vergleich zum Vertebraten, verstärkten *Turnover*prozess im Muskel vermittelt.

Wie dieser Austausch abläuft, lässt sich nur hypothetisieren. Eine Fragmentation der Filamente durch Gelsolin kann möglicherweise durch Tropomyosin inhibiert werden (Hinssen *et al.*, 1985a). Ausdifferenzierte Myotuben, denen exogenes Gelsolin zugeführt wurde, zeigten lichtmikroskopisch die Bindung von Gelsolin an Aktin ohne erkennbare Fragmentation, wohingegen Stressfasern von Fibroblasten vollständig bei Zugabe von exogenem Gelsolin degradiert werden (Huckriede *et al.*, 1988). Während der Myofibrillogenese von Skelettmuskel-Myofibrillen der Vertebraten tritt Nebulin erst sehr spät in der entwickelnden Myofibrille auf (Fürst *et al.* 1989, Moncman & Wang, 2000), wohingegen die Gelsolinkonzentration in sich ausdifferenzierenden Skelettmyoblasten ansteigt (Chaponnier *et al.* 1989, Scholz & Hinssen, 1995) Es wurde bereits erwähnt, dass sich die funktionelle Rolle von Gelsolin beim Zusammenbau der Myofibrillen möglicherweise auf die Sortierung der Actinisoformen ausweiten lassen kann, solange Nebulin in den Sarkomeren noch nicht etabliert ist.

In Vertebratenskelettmuskeln erscheinen die dünnen Filamente „resistent“ gegen die Fragmentation durch Gelsolin (Gonsior & Hinssen, 1995), diese Resistenz wird möglicherweise durch Nebulin vermittelt. Trotz einiger Hinweise ist die Existenz von Nebulin bei Invertebraten nicht belegt. Frühere Untersuchungen zum Vorkommen von Nebulin in Invertebraten lieferten die Untersuchungen von Locker & Wild (1986) und Hu *et al.* (1986), die zeigten, dass bei verschiedenen Invertebraten Proteine mit einer Molmasse von Nebulin vorkommen. Nebulin konnte aber immunocytochemisch nicht nachgewiesen werden und es ist bekannt, dass Mini-Titine ebenfalls im Molekularbereich des Nebulins liegen (Nave & Weber, 1990). Royuela *et al.* (1997) verwiesen durch Immunnachweise auf die Existenz Nebulin-verwandter Proteine in der schräggestreiften Muskulatur von *Eisenia foetida*. Diese Nachweise konnten nicht reproduziert werden und daher bleibt es bis dato unklar, ob Nebulin bei Invertebraten vorkommt.

Gelsoline binden bei niedrigeren Calciumkonzentrationen an Actin, als sie für die Fragmentation benötigen (Janmey *et al.*, 1985). Im Gegensatz zu Vertebratengelsolin, das nicht signifikant bei $[Ca^{2+}] < 10^{-6}$ M an Actinfilamente bindet (Yin *et al.*, 1989), haben Invertebratengelsoline die Eigenschaft, schon bei geringeren Konzentrationen an die dünnen Filamente zu assoziieren (3.3.5, Hinssen, 1986; Bock *et al.*, 1994). Wenn Gelsolin an ein Filament gebunden hat, bleibt es auch bei niedrigeren Calciumkonzentrationen assoziiert. Die vollständige Aktivierung der Actomyosin-ATPase führt auch zu einer zumindest partiellen Aktivierung der Gelsoline (3.3.10). Für eine vollständige Aktivierung benötigt Gelsolin sowohl Ca^{2+} , als auch die Hydrolyse von PIP_2 (Prof. Janmay, persönliche Mitteilung). Die aus der Hydrolyse resultierenden Inositoltriphosphate stimulieren die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern wie dem sarkoplasmatischen Retikulum (Berridge, 1993). Möglicherweise wird Gelsolin dann vollständig aktiviert und kann dann zwischen zwei Monomeren die dünnen Filamente fragmentieren. Das ist allerdings nur theoretisch denkbar, da der exakte Fragmentationsprozess von F-Actin noch nicht geklärt ist und in dieser Modellerweiterung auch noch zusätzlich Elemente der dünnen Filamente (Tropomyosin-Troponin, Nebulin) hinzukommen, zu deren Einfluß auf eine mögliche Fragmentation nur sehr wenige Informationen vorliegen. Experimentell ließ sich zeigen, dass Tropomyosin die Fragmentation zwar verlangsamt, aber nicht vollständig inhibiert (Gonsior & Hinssen, 1994). Von Nyakern-Meazza *et al.* (2002) konnte gezeigt werden, dass Tropomyosin Gelsolin-Actinkomplexe dissoziieren kann und dabei das hochaffin gebundene G-Aktinmoleküle *in vitro* von Tropomyosin verdrängt wird. Folglich könnte im

Invertebratenmuskel nach einer Gelsolinfragmentation diese Tropomyosin-induzierte Konformationsmodifikation am Gelsolin-Actinkomplex zur Freisetzung der Monomere aus dem dünnen Filament führen. Die regulatorischen Filamente, möglicherweise aber auch Nebulin-artige Proteine, könnten dann bis zur Rekonstitution durch den Einbau eines intakten Actinmonomers die Stabilität der dünnen Filamente gewährleisten. Wie sich der Austausch von Monomeren vollzieht ist ebenfalls nicht bekannt, Klarheit existiert nur darüber, dass diese Prozesse stattfinden. Es konnte mehrfach *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass Actin sehr schnell in Myofibrillen eingebaut wird (Dome *et al.*, 1988, Cunningham *et al.*, 1991, Lorusso *et al.*, 1992). Sollte Gelsolin diesen *Turnover*prozess vermittelten, wird somit eine Aufrechterhaltung der Integrität kontraktieler Strukturen erzeugt, die dann zum Erhalt der Kontraktionsfähigkeit von Invertebratenmuskeln beiträgt.

Schlussbetrachtung:

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden verschiedene Skelettmuskeltypen aus der Muskulatur von Crustaceen herangezogen. Die Verwendung von Crustaceen für Studien von Invertebratenmuskeln haben den Vorteil, dass sie eine große Diversität an Muskelfasertypen mit Proteinen in vielfachen Variationen aufweisen, die trotz ihrer Variabilität funktionell korrekt interagieren. Mammalier besitzen beispielsweise keine derart langsamen Muskelfasern, wie sie in den Scherenschließmuskel der Brechschere von Hummern zu finden sind.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmalig zwei intrazelluläre Gelsolin-Isoformen nachgewiesen werden, die sich in ihrer Calciumabhängigkeit funktionell unterscheiden. Die physiologische Bedeutung eines biphasischen Systems, in dem möglicherweise erst eine und dann die andere Isoform aktiviert wird, sollte eingehend untersucht werden.

Der sequenzielle Unterschied zwischen den beiden Gelsolinen sollte identifiziert werden, damit wäre die Grundlage zur Erzeugung von zwei Peptidantikörpern ermöglicht. Die in dieser Arbeit indirekt nachgewiesenen Lokalisationen der Isoformen ließen sich dann innerhalb eines Muskels und auch an den verschiedenen Muskeltypen von Crustaceen durchführen. Mit den Isoform-spezifischen Lokalisationsstudien könnten sich weitere Hinweise auf die Funktion der Isoformen in den einzelnen Muskelzellen ergeben.

Untersuchung zur Struktur und Funktion einzelner Domänen sollten vorgenommen werden, um die Calciumabhängigkeit der Gelsolin-Actin Interaktion näher zu beleuchten.

Die Bindungsstellen für Calciumionen, die auch für den ungeklärten Ablauf der Fragmentation relevant sind, wurden für Hummergelsolin noch nicht identifiziert.

Das bisherige Model der Gelsolin-Actin Interaktion zeigt keinen Zustand in dem Gelsolin an Actin bindet und nicht schneidet. Die Hummergelsoline sind „klassische“ Gelsoline, nur im Kontext mit den Literaturdaten ließ sich erst eine Vorstellung darüber gewinnen, welche Funktion sie im Invertebratenmuskel besitzen. Eine Involvierung von Gelsolin in einen *Turnover*prozess erscheint wahrscheinlich, ist aber keinesfalls erwiesen. Ob und welche Rolle Gelsolin an diesem Prozess hat, sollten zukünftige Untersuchungen klären und damit auch einen weiteren Einblick in die Dynamik von Muskeln vermitteln.

5. Inhaltsverzeichnis

- (1) Allan PG, Janmey PA, Gelsolin displaces phalloidin from actin filaments 1994 J Biol.Chem 269 32916-32923
- (2) Ampe C, Vandekerckhove J. 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. 1987 Dec 20;6(13):4149-57.
- (3) Ampe C, Vandekerckhove J. 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. 1987 Dec 20;6(13):4149-57.
- (4) Andre E, Lottspeich F, Schleicher M, Noegel A. Severin, gelsolin, and villin share a homologous sequence in regions presumed to contain F-actin severing domains. J Biol Chem. 1988 Jan 15;263(2):722-7.
- (5) Anthony FA, Winkler MA, Edwards HH, Cheung WY. Quantitative subcellular localization of calmodulin-dependent phosphatase in chick forebrain. J Neurosci. 1988 Apr;8(4):1245-53.
- (6) Antin PB, Tokunaka S, Nachmias VT, Holtzer H. Role of stress fiber-like structures in assembling nascent myofibrils in myosheets recovering from exposure to ethyl methanesulfonate. J Cell Biol. 1986 Apr;102(4):1464-79.
- (7) Arora PD, Chan MW, Anderson RA, Janmey PA, McCulloch CA. Separate functions of gelsolin mediate sequential steps of collagen phagocytosis. Mol Biol Cell. 2005 v;16(11):5175-90. Epub 2005 Aug 24.
- (8) Asakura S, Oosawa F. Dephosphorylation of adenosine triphosphate in actin solutions at low concentrations of magnesium.
- (9) Ashton FT, Beinbrech G, Pepe FA. Subfilament organization in myosin filaments of the fast abdominal muscles of the lobster, *Homarus americanus*. Tissue Cell. 1987;19(1):51-63.
- (10) Atwood HL. Organization and synaptic physiology of crustacean neuromuscular systems. Prog Neurobiol. 1976;7(Pt 4):291-391.
- (11) Azuma T, Kohts K, Flanagan L, Kwiatkowski D. Gelsolin in complex with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits caspase-3 and -9 to retard apoptotic progression. J Biol Chem. 2000 Feb 11;275(6):3761-6.

- (12) Bates PC, Millward DJ. Myofibrillar protein turnover. Synthesis rates of myofibrillar and sarcoplasmic protein fractions in different muscles and the changes observed during postnatal development and in response to feeding and starvation. *Biochem J.* 1983 Aug 15;214(2):587-92.
- (13) Bazari WL, Matsudaira P, Wallek M, Smeal T, Jakes R, Ahmed Y. Villin sequence and peptide map identify six homologous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(14):4986-90.
- (14) Bazari WL, Matsudaira P, Wallek M, Smeal T, Jakes R, Ahmed Y. Villin sequence and peptide map identify six homologous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(14):4986-90.
- (15) Berridge MJ, Inositol triphosphate and calcium signaling (1993) *nature* 361,315-325
- (16) Behnke O, Ammitzboll T, Jessen H, Klokke M, Nilausen K, Tranum-Jensen J, Olsson L. n-specific binding of protein-stabilized gold sols as a source of error in immunocytochemistry. *Eur J Cell Biol.* 1986 Aug;41(2):326-38.
- (17) Beulen N, Biochemische Charakterisierung der funktionellen Domänen eines Gelsolin-verwandten Proteins aus dem Schwanzmuskel des Hummers *Homarus americanus*, Diplomarbeit, Universität Bielfeld, 2002
- (18) Bevington M, McTeague JM, Govind CK, Fibre composition of antennal muscles in lobster and crayfish (1993) *J Crust. Biol.* 13 256-267
- (19) Bloom W, Fawcett DW *A textbook of histology* 1975 WB Saunders & Co, Philadelphia
- (20) Bock D, Hinssen H, D'Haese J. A gelsolin- actin-severing protein with fully reversible actin-binding properties from the tail muscle of crayfish, *Astacus leptodactylus*.
- (21) Bonilla M, Garcia MC, Orkand PM, Zuazaga C. Ultrastructural and mechanical properties of electrically inexcitable skeletal muscle fibers of the crustacean *Atya lanipes*. *Tissue Cell.* 1992;24(4):525-35.
- (22) Bremel RD, Weber A. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nat New Biol.* 1972 Jul 26;238(82):97-101.
- (23) Bremer A, Aebi U. The structure of the F-actin filament and the actin molecule. *Curr Opin Cell Biol.* 1992 Feb;4(1):20-6. Review.

- (24) Bretscher A, Weber K. Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner. *Cell*. 1980 Jul;20(3):839-47.
- (25) Brock AM, Pardee JD. Cytoimmunofluorescent localization of severin in *Dictyostelium amoebae*. *Dev Biol*. 1988 Jul;128(1):30-9.
- (26) Brown LD, Canti ME. Nonuniform distribution of myosin light chains within the thick filaments of lobster slow muscle: Immunocytochemical study. *J Exp Zool*. 2001 Jun 15;290(1):6-17.
- (27) Bryan J, Kurth MC. Actin-gelsolin interactions. Evidence for two actin-binding sites. *J Biol Chem*. 1984 Jun 25;259(12):7480-7.
- (28) Bryan J. Gelsolin has three actin-binding sites. *J Cell Biol*. 1988 May;106(5):1553-62.
- (29) Bukatina AE, Sonkin BY, Alievskaya LL, Yashin VA. Sarcomere structures in the rabbit psoas muscle as revealed by fluorescent analogs of phalloidin. *Histochemistry*. 1984;81(3):301-4.
- (30) Bullard B, Dabrowska R, Winkelman L. The contractile and regulatory proteins of insect flight muscle. *Biochem J*. 1973 Oct;135(2):277-86.
- (31) Burtnick LD, Koepf EK, Grimes J, Jones EY, Stuart DI, McLaughlin PJ, Robinson RC. The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):661-70.
- (32) Burtnick LD, Urosev D, Irobi E, Narayan K, Robinson RC. Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *EMBO J*. 2004 Jul 21;23(14):2713-22. Epub 2004 Jun 24.
- (33) Carlier MF, Pantaloni D. Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol*. 1997 Jun 20;269(4):459-67. Review.
- (34) Carlier MF. Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem*. 1991 Jan 5;266(1):1-4. Review.
- (35) Carlier MF. Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int Rev Cytol*. 1989;115:139-70. Review.
- (36) Carlier MF. Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Feb;10(1):45-51. Review.
- (37) Carron CP, Hwo SY, Dingus J, Benson DM, Meza I, Bryan J. A re-evaluation of cytoplasmic gelsolin localization. *J Cell Biol*. 1986 Jan;102(1):237-45.

- (38) Chaponnier C, Janmey PA, Yin HL. The actin filament-severing domain of plasma gelsolin. *J Cell Biol.* 1986 Oct;103(4):1473-81.
- (39) Chaponnier C, Yin HL, Stossel TP. Reversibility of gelsolin/actin interaction in macrophages. Evidence of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent pathways. *J Exp Med.* 1987 Jan 1;165(1):97-106.
- (40) Chen GX, Tan RY, Gong ZX, Huang YP, Wang SZ, Cao TG. Paramyosin and the catch mechanism. *Biophys Chem.* 1988 Feb;29(1-2):147-53.
- (41) Choe H, Burtnick LD, Mejilla M, Yin HL, Robinson RC, Choe S. The calcium activation of gelsolin: insights from the 3A structure of the G4-G6/actin complex. *J Mol Biol.* 2002 Dec 6;324(4):691-702.
- (42) Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:637-706. Epub 2002 Apr 2. Review.
- (43) Coluccio LM, Sedlar PA, Bryan J. The effects of a 45 000 molecular weight protein from unfertilized sea urchin eggs and its 1:1 actin complex on actin filaments. *J Muscle Res Cell Motil.* 1986 Apr;7(2):133-41.
- (44) Cooper JA, Bryan J, Schwab B 3rd, Frieden C, Loftus DJ, Elson EL. Microinjection of gelsolin into living cells. *J Cell Biol.* 1987 Mar;104(3):491-501.
- (45) Cooper JA, Loftus DJ, Frieden C, Bryan J, Elson EL. Localization and mobility of gelsolin in cells. *J Cell Biol.* 1988 Apr;106(4):1229-40.
- (46) Cooper JA, Loftus DJ, Frieden C, Bryan J, Elson EL. Localization and mobility of gelsolin in cells. *J Cell Biol.* 1988 Apr;106(4):1229-40.
- (47) Costello WJ, Govind CK. Contractile proteins of fast and slow fibers during differentiation of lobster claw muscle. *Dev Biol.* 1984 Aug; 104(2):434-40.
- (48) Coue M, Korn ED. Interaction of plasma gelsolin with G-actin and F-actin in the presence and absence of calcium ions. *J Biol Chem.* 1985 Dec 5;260(28):15033-41.
- (49) Cunningham CC, Stossel TP, Kwiatkowski DJ. Enhanced motility in an NIH 3T3 fibroblast 1991 *science* 251 1233-1236
- (50) DeCouet HG. Studies on the antigenic side of actin: A comparative study of the immunogenic cross-reactivity of invertebrate actins *J Muscle Res. Cell Motil* 4: 405-427

- (51) DeLaCruz EM, Pollard TD. Kinetics and thermodynamics of phalloidin binding to actin filaments from three divergent species. *Biochemistry*. 1996 v 12;35(45):14054-61.
- (52) D'Haese J, Hinssen H, Isolation and charakterisation of a calcium activated actin modulating protein from oblique straited muscle 1987 *J.Comp.Phsiol. (B)* 248:397-402
- (53) D'Haese J, Fey M Calcium activated actin modulating proteins of the 40kDa typ in various invertebrate muscle tissues 1989 *Eur.J.Cell Biol* 48 Suppl.26:81
- (54) Dissmann E, Hinssen H. Immucytochemical localization of gelsolin in fibroblasts, myogenic cells, and isolated myofibrils. *Eur. J. Cell. Biol.* 1994 Apr;63(2):336-44.
- (55) Dome JS, Mittal B, Pochapin MB, Sanger JM, Sanger JW. Incorporation of fluorescently labeled actin and tropomyosin into muscle cells. *Cell Differ.* 1988 Mar;23(1-2):37-52.
- (56) Doolittle RF. Reconstructing history with ami acid sequences. *Protein Sci.* 1992 Feb;1(2):191-200. Review.
- (57) DosRemedios C, Barden J Actin structure and function in muscle and nonmuscle cells 1983 Academic press Sydney 1-336
- (58) Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, sworthy NJ. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 2003 Apr;83(2):433-73. Review.
- (59) Ebashi S. Excitation-contraction coupling and the mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:1-16. Review.
- (60) Ebisawa K, Nomura Y. Enhancement of actin-activated myosin ATPase by an 84K Mr actin-binding protein in vertebrate smooth muscle. *J Biochem (Tokyo).* 1985 Oct;98(4):1127-30.
- (61) Egelman EH, Orlova A. Two conformations of G-actin to two conformations of F-actin. *Results Probl Cell Differ.* 2001;32:95-101. Review.
- (62) Egelman EH. Molecular evolution: actin's long lost relative found. *Curr Biol.* 2001 Dec 11;11(24):R1022-4. Review.
- (63) Eichinger L, Schleicher M. Characterization of actin- and lipid-binding domains in severin, a Ca(2+)-dependent F-actin fragmenting protein. *Biochemistry.* 1992 May 26;31(20):4779-87.

- (64) El Haj AJ, Lewis SE, Goldspink DF, Merry BJ, Holehan AM. The effect of chronic and acute dietary restriction on the growth and protein turnover of fast and slow types of rat skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 1986;85(2):281-7.
- (65) Epstein HF, Miller DM 3rd, Ortiz I, Berliner GC. Myosin and paramyosin are organized about a newly identified core structure. *J Cell Biol.* 1985 Mar;100(3):904-15.
- (66) Estes JE, Selden LA, Kisian HJ, Gershman LC. Tightly-bound divalent cation of actin. *J Muscle Res Cell Motil.* 1992 Jun;13(3):272-84. Review.
- (67) Fahrenbach WH. The fine structure of fast and slow crustacean muscles. *J. Cell Biol.* 1967 Oct;35(1):69-79.
- (68) Fallon JR, Nachmias VT. Localization of cytoplasmic and skeletal myosins in developing muscle cells by double-label immunofluorescence. *J. Cell Biol.* 1980 Oct;87(1):237-47.
- (69) Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochimistry.* 1971 v;8(11):1081-3.
- (70) Feng L, Mejilla M, Yin HL, Chen J, Prestwich GD. Full-contact domain labeling: identification of a novel phosphoinositide binding site on gelsolin that requires the complete protein. *Biochemistry.* 2001 Jan 30;40(4):904-13.
- (71) Finidori J, Friederich E, Kwiatkowski DJ, Louvard D. In vivo analysis of functional domains from villin and gelsolin. *J Cell Biol.* 1992 Mar;116(5):1145-55.
- (72) Flanagan LA, Cunningham CC, Chen J, Prestwich GD, Kosik KS, Janmey PA. The structure of divalent cation-induced aggregates of PIP2 and their alteration by gelsolin *Biophys J.* 1997 Sep;73(3):1440-7.
- (73) Fowler WS, Neil DM. Histochemical heterogeneity of fibers in the abdominal superficial flexor muscles of the rway lobster, *Nephrops rvegicus* (L.). *J Exp Zool.* 1992 Dec 15;264(4):406-18.
- (74) Friederich E, Huet C, Arpin M, Louvard D. Villin induces microvilli growth and actin redistribution in transfected fibroblasts. *Cell.* 1989 v 3;59(3):461-75.
- (75) Fürst DO, Osborn M, Weber K. Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *J Cell Biol.* 1989 Aug;109(2):517-27.

- (76) Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. 1997 *J.Neurosci.*(1) 17(21) 8178-86
- (77) Gailly P, Lejeune T, Capony JP, Gillis JM. The action of brevin, an F-actin severing protein, on the mechanical properties and ATPase activity of skinned smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 1990 Aug;11(4):293-301.
- (78) Garone L, Theibert IL, Miguel, A, Maeda, Y Murphy, C, Collins, YH, Lobster Troponin C: amino acid sequence of three isoforms 1991 *Arch. Biochem. Biophys.*291 89-91
- (79) Garrels JI, Gibson W. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell.* 1976 Dec;9(4 PT 2):793-805.
- (80) Gershman LC, Selden LA, Estes JE. High affinity binding of divalent cation to actin monomer is much stronger than previously reported. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Mar 13;135(2):607-14.
- (81) Gettemans J, De Ville Y, Waelkens E, Vandekerckhove J. The actin-binding properties of the Physarum actin-fragmin complex. Regulation by calcium, phospholipids, and phosphorylation. *J Biol Chem.* 1995 Feb 10;270(6):2644-51.
- (82) Giebing T, Obermann WM, Furst D, D'Haese J. C-terminally deleted fragments of 40-kDa earthworm actin modulator still show gelsolin activities. *FEBS Lett.* 1997 v 10;417(2):191-5.
- (83) Giffard RG, Weeds AG, Spudich JA. Ca²⁺-dependent binding of severin to actin: a one-to-one complex is formed. *J Cell Biol.* 1984 May;98(5):1796-803.
- (84) Glenney JR Jr, Geisler N, Kaulfus P, Weber K. Demonstration of at least two different actin-binding sites in villin, a calcium-regulated modulator of F-actin organization. *J Biol Chem.* 1981 Aug 10;256(15):8156-61.
- (85) Glenney JR Jr, Kaulfus P, Matsudaira P, Weber K. F-actin binding and bundling properties of fimbrin, a major cytoskeletal protein of microvillus core filaments. *J Biol Chem.* 1981 Sep 10;256(17):9283-8.
- (86) Glenney JR Jr, Kaulfus P, Weber K. F actin assembly modulated by villin: Ca⁺⁺-dependent nucleation and capping of the barbed end. *Cell.* 1981 May;24(2):471-80.

- (87) Goldberg A. Carbohydrate metabolism in rats fed carbohydrate-free diets. *J Nutr.* 1971 Jun;101(6):693-7.
- (88) Goldspink G. The proliferation of myofibrils during muscle fibre growth. *J Cell Sci.* 1970 Mar;6(2):593-603.
- (89) Gonsior S, Hinssen H. Exogenous gelsolin binds to sarcomeric thin filaments without severing. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1995;31(3):196-206.
- (90) Govind CK, Atwood HL, Lang F. Sarcomere length increases in developing crustacean muscle. *J Exp Zool.* 1974 Sep;189(3):395-400.
- (91) Govind CK, Atwood HL, Pearce J. Inhibitory axoaxonal and neuromuscular synapses in the crayfish opener muscle: membrane definition and ultrastructure. *J Comp Neurol.* 1995 Jan 16; 351(3):476-88.
- (92) Govind CK, Pearce J, Potter DJ. Neural attrition following limb loss and regeneration in juvenile lobsters. *J Neurobiol.* 1988 Dec;19(8):667-80.
- (93) Govind CK, Pearce J, Wojtowicz JM, Atwood HL. "Strong" and "weak" synaptic differentiation in the crayfish opener muscle: structural correlates. *Synapse.* 1994 Jan;16(1):45-58.
- (94) Govind CK, Pearce J. Differential Reflex Activity Determines Claw and Closer Muscle Asymmetry in Developing Lobsters. *Science.* 1986 Jul 18;233(4761):354-356.
- (95) Govind CK, Pearce J. Growth of inhibitory innervation in a lobster muscle. *J Morphol.* 1989 Feb;199(2):197-205.
- (96) Govind CK, Pearce J. Remodeling of nerves during claw reversal in adult snapping shrimps. *J Comp Neurol.* 1988 Feb 1;268(1):121-30.
- (97) Govind CK, Potter DJ. Development of bilateral asymmetry in sensory innervation to lobster claws. *Brain Res.* 1987 Sep;432(1):131-9.
- (98) Govind CK, She J, Lang F. Lengthening of lobster muscle fibres by two age-dependent mechanisms. *Experientia.* 1977 Jan 15;33(1):35-6.
- (99) Govind CK, Stephens PJ, Eisen JS. Polyneuronal innervation of an adult and embryonic lobster muscle. *J Embryol Exp Morphol.* 1985 Jun;87:13-26.
- (100) Govind CK. Age-remodeling of lobster neuromuscular terminals. *Exp Gerontol.* 1992;27(1):63-74. Review.
- (101) Govind CK. Claw asymmetry in lobsters: case study in developmental neuroethology. *J Neurobiol.* 1992 Dec;23(10):1423-45. Review.

- (102) Gunning P, Hardeman E, Jeffrey P, Weinberger R. Creating intracellular structural domains: spatial segregation of actin and tropomyosin isoforms in neurons. *Bioessays*. 1998 v;20(11):892-900. Review.
- (103) Gunning P, Ponte P, Kedes L, Hickey RJ, Skoultchi AI. Expression of human cardiac actin in mouse L cells: a sarcomeric actin associates with a nmuscle cytoskeleton. *Cell*. 1984 Mar;36(3):709-15.
- (104) Gusev NB, Pritchard K, Hodgkinson JL, Marston SB. Filamin and gelsolin influence Ca(2+)-sensitivity of smooth muscle thin filaments. *J Muscle Res Cell Motil*. 1994 Dec;15(6):672-81.
- (105) Guttman JA, Janmey P, Vogl AW. Gelsolin--evidence for a role in turnover of junction- actin filaments in Sertoli cells. *J Cell Sci*. 2002 Feb 1;115(Pt 3):499-505.
- (106) Guttman JA, Vaid KS, Vogl AW. A re-evaluation of gelsolin at ectoplasmic specializations in sertoli cells: the influence of serum in blocking buffers on staining patterns. *Anat Rec (Hoboken)*. 2007 Mar;290(3):324-9.
- (107) Gyorko S, Palade P. Ca(2+)-dependent negative control mechanism for Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in crayfish muscle. *J Physiol*. 1994 Apr 15;476(2):315-22.
- (108) Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(4):1381-5.
- (109) Hall ZW, Lubit BW, Schwartz JH. Cytoplasmic actin in postsynaptic structures at the neuromuscular junction. *J Cell Biol*. 1981 Sep;90(3):789-92.
- (110) Handel SE, Wang SM, Greaser ML, Schultz E, Bulinski JC, Lessard JL. Skeletal muscle myofibrillogenesis as revealed with a monoclonal antibody to titin in combination with detection of the alpha- and gamma-isoforms of actin. *Dev Biol*. 1989 Mar;132(1):35-44.
- (111) Hanson J, Lowey J. The structure of actin filaments and the origin of the axial periodicity in the I-substance of vertebrate striated muscle *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1964 Oct 27;160:449-60.
- (112) Harden N, Lee J, Loh HY, Ong YM, Tan I, Leung T, Manser E, Lim L. A *Drosophila* homolog of the Rac- and Cdc42-activated serine/threonine kinase PAK is a potential focal adhesion and focal complex protein that colocalizes with dynamic actin structures. *Mol Cell Biol*. 1996 May;16(5):1896-908.

- (113) Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A, Stossel TP. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell*. 1995 Aug 25;82(4):643-53.
- (114) Hartwig JH, Chambers KA, Stossel TP. Association of gelsolin with actin filaments and cell membranes of macrophages and platelets. *J Cell Biol*. 1989 Feb;108(2):467-79.
- (115) Hartwig JH, Kwiatkowski DJ. Actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1991 Feb;3 (1): 87-97. Review.
- (116) Hasegawa T, Takahashi S, Hayashi H, Hata S. Fragmin: a calcium ion sensitive regulatory factor on the formation of actin filaments. *Biochemistry*. 1980 Jun 10;19(12):2677-83.
- (117) Hatano S, Oosawa F. Extraction of an actin-like protein from the plasmodium of a myxomycete and its interaction with myosin A from rabbit striated muscle. *J Cell Physiol*. 68(2) 197-202
- (118) Hayashi T, Hinssen H, Cayer ML, Smith DS. Organization of native and in vitro-reassembled myosin filaments from lobster tonic muscle. *Tissue Cell*. 1981;13(1):35-44.
- (119) Hayes D, Huang M, Zobel CR. Electron microscope observations on thick filaments in striated muscle from the lobster *Homarus americanus*. *J Ultrastruct Res*. 1971 Oct;37(1):17-30.
- (120) Heintzelman MB, Frankel SA, Artavanis-Tsakonas S, Mooseker MS. Cloning of a secretory gelsolin from *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol*. 1993 Apr 5;230(3):709-16.
- (121) Herman IM. Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol*. 1993 Feb;5(1):48-55. Review.
- (122) Hesterkamp T, Weeds AG, Mannherz HG. The actin monomers in the ternary gelsolin: 2 actin complex are in an antiparallel orientation. *Eur J Biochem*. 1993 Dec 1;218(2):507-13.
- (123) Hinssen H, Small JV, Sobieszek A. A Ca²⁺-dependent actin modulator from vertebrate smooth muscle *FEBS Lett*. 1984 Jan 23;166(1):90-5.
- (124) Hinssen H. An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. I. Isolation and purification. *Eur J Cell Biol*. 1981a Feb;23(2):225-33.

- (125) Hinssen H. An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. II. Ca⁺⁺-dependence and other properties. *Eur J Cell Biol.* 1981b Feb;23(2): 234-40.
- (126) Hinssen, H. Engels FE, D´Haese J: Kinetiks of modulator-actin interaction: a comparsion of *Physarum fragmin* with actin modulators from different muscle types. In *The molekular biology of Physarum* (Dove, W ed.) 1986 199-206, Plenum Press, New York
- (127) Hinssen H, Actin modulating proteins. Complex formation and Ca²⁺ dependence of interaction with actin *Fortschr.Zool.*34, 54-63
- (128) Hofmann, A, Noegel AA, Bomblies L, Lottspeich F, Schleicher M, The 100kDa F-Actin capping protein of *Dictiostelium amoebae* is a villin prototyp ("protovillin") *FEBS Lett.* 328, 71-76
- (129) Holmes JM, Whiteley NM, Magnay JL, El Haj A: Comparison of the variable loop regions of myosin heavy chain genes from Antarctic and temperate isopods. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002 Mar;131(3):349-59.
- (130) Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 1990 Sep 6;347(6288):44-9.
- (131) Hooper SL, Thuma JB. Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. *Physiol Rev.* 2005 Jul;85(3):1001-60. Review. Erratum in: *Physiol Rev.* 2005 Oct;85(4):1417.
- (132) Hoyle G. Correlated physiological and ultrastructural studies on specialized muscles. 3b. Fine structure of the power-stroke muscle of the swimming leg of *Portunus sanguilentus*. 1973 *J.Exp.Zool.* 185(1) 97-109
- (133) Hoyle HD, Raff EC. Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are t functionally equivalent. *J Cell Biol.* 1990 Sep;111(3):1009-26.
- (134) Holzer H, Sasse J, Horwitz A, Antin P Pacifici, M *Bibl.Anat* 109-129
- (135) Hu Z, Rohrer GA, Stone RT, Beattie CW. Nebulin (NEB) maps to porcine chromosome (SSC) 15. *Anim Genet.* 1997 Feb;28(1):61-2.
- (136) Huckriede A, Hinssen H, Jockusch BM, Lazarides E. Gelsolin sensitivity of microfilaments as a marker for muscle differentiation. *Eur J Cell Biol.* 1988 Aug;46(3):506-12.
- (137) Huxley HE, Hanson J. The structural basis for contraction mechanism in straited muscle 1959 *AnnNY Acad.Sci.* (28) 81:403-408

- (138) Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164:1356-1366, 1969. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Oct;(403 Suppl):S6-17.
- (139) Jahromi SS, Atwood HL. Correlation of structure, speed of contraction, and total tension in fast and slow abdominal muscle fibers of the lobster (*Homarus americanus*). *1969J Exp Zool.* 171(1) 25-38
- (140) Jahromi SS, Atwood HL. Electrical coupling and growth in lobster muscle fibers. *Can J Zool.* 1971 Jul;47(7):1029-34.
- (141) Jahromi SS, Atwood HL. Structural and contractile properties of lobster leg-muscle fibers. *J Exp Zool.* 1971 Apr;176(4):475-86.
- (142) Jahromi SS, Atwood HL. Tension and structure in crustacean fast and slow muscle fibers. *Experientia.* 1969 Oct 15;25(10):1046.
- (143) Jahromi SS, Atwood HL. Ultrastructural features of crayfish phasic and tonic muscle fibers. *Can J Zool.* 1967 Sep;45(5):601-6.
- (144) Jahromi SS, Charlton MP. Transverse sarcomere splitting. A possible means of longitudinal growth in crab muscles. *J Cell Biol.* 1979 Mar;80(3):736-42.
- (145) Janmey PA, Chaponnier C, Lind SE, Zaner KS, Stossel TP, Yin HL. Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking. *Biochemistry.* 1985 Jul 2;24(14):3714-23.
- (146) Janmey PA, Matsudaira PT. Functional comparison of villin and gelsolin. Effects of Ca²⁺, KCl, and polyphosphoistides. *J Biol Chem.* 1988 v 15;263(32):16738-43.
- (147) Janmey PA, Stossel TP. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature.* 1987 Jan 22-28;325(6102):362-4.
- (148) Jockusch B, Hinssen H, Nonmuscle motility and the actin based cytoskeleton In *Comprehensive Human Physiology* (Greger R & Windhorst, U Eds) V1 pp225-243 Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- (149) Jones LJ, Carballido-Lopez R, Errington J. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell.* 2001 Mar 23;104(6):913-22.
- (150) Kabsch W, Holmes KC. The actin fold. *FASEB J.* 1995 Feb;9(2):167-74. Review.
- (151) Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature.* 1990 Sep 6;347(6288):37-44.

- (152) Kaila K, Voipio J, Dependence of intracellular free calcium and tension on membrane potential and intracellular pH in single cray fish musclefibres 1990 Pflügers Arch.426 501-511
- (153) Kehrel J Untersuchungen zur Anzahl der Querbrücken im schnellen abdominalen Extensor des Flusskrebse Orconectes limosus Dissertation, 1982, Universität Münster
- (154) Kan K, Sasaki Y. Smooth muscle gelsolin and a Ca²⁺-sensitive contractile cell model. J Cell Physiol. 1989 Apr;139(1):58-67.
- (155) Kendrick-Jones J, Lehman W, Szent-Gyorgyi AG. Regulation in molluscan muscles. J Mol Biol. 1970 Dec 14;54(2):313-26.
- (156) Khaitlina S, Antropova O, Kuznetsova I, Turoverov K, Collins JH. Correlation between polymerizability and conformation in scallop beta-like actin and rabbit skeletal muscle alpha-actin. Arch Biochem Biophys. 1999 Aug 1;368(1):105-11.
- (157) Khaitlina S, Hinssen H. Ca-dependent binding of actin to gelsolin. FEBS Lett. 2002 Jun 19;521(1-3):14-8.
- (158) Khaitlina S, Hinssen H. Conformational changes in actin induced by its interaction with gelsolin. Biophys J. 1997 Aug;73(2):929-37.
- (159) Khaitlina SY. Functional specificity of actin isoforms. Int Rev Cytol. 2001;202:35-98. Review.
- (160) Kim E, Motoki M, Seguro K, Muhlrud A, Reisler E. Conformational changes in subdomain 2 of G-actin: fluorescence probing by dansyl ethylenediamine attached to Gln-41. Biophys J. 1995 v;69(5):2024-32.
- (161) Kiselar JG, Janmey PA, Almo SC, Chance MR. Visualizing the Ca²⁺-dependent activation of gelsolin by using synchrotron footprinting. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):3942-7. Epub 2003 Mar 24.
- (162) Koepf EK, Burtnick LD. Interaction of plasma gelsolin with tropomyosin. FEBS Lett. 1992 Aug 31;309(1):56-8.
- (163) Kojima H, Ishijima A, Yanagida T. Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro manipulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20;91(26):12962-6.
- (164) Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated

- fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997 Oct 10;278(5336):294-8.
- (165) Koya RC, Fujita H, Shimizu S, Ohtsu M, Takimoto M, Tsujimoto Y, Kuzumaki N. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J Biol Chem*. 2000 May 19;275(20):15343-9.
- (166) Kropf DL, Berge SK, Quatra RS. Free in PMCActin Localization during Fucus Embryogenesis. *Plant Cell*. 1989 Feb;1(2):191-200.
- (167) Krüger, E Untersuchungen zur Diversität und Lokalisation Gelsolin verwandter Proteine des Regenwurms *Lumbricus terrestris* Dissertation, Universität Düsseldorf, 2001
- (168) Kusano H, Shimizu S, Koya RC, Fujita H, Kamada S, Kuzumaki N, Tsujimoto Y. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene*. 2000 Oct 5;19(42):4807-14.
- (169) Kuzumaki N, Tanaka M, Sakai N, Fujita H.[Tumor suppressive function of gelsolin] *Gan To Kagaku Ryoho*. 1997 Sep;24(11):1436-41. Review. Japanese.
- (170) Kwiatkowski DJ, Janmey PA, Mole JE, Yin HL. Isolation and properties of two actin-binding domains in gelsolin. *J Biol Chem*. 1985 Dec 5;260(28):15232-8.
- (171) Kwiatkowski DJ, Mehl R, Izumo S, Nadal-Ginard B, Yin HL. Muscle is the major source of plasma gelsolin. *J Biol Chem*. 1988 Jun 15;263(17):8239-43.
- (172) Kwiatkowski DJ, Stossel TP, Orkin SH, Mole JE, Colten HR, Yin HL. Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature*. 1986 Oct 2-8;323(6087):455-8.
- (173) Kwiatkowski DJ. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Feb;11(1):103-8. Review.
- (174) Kwiatkowski DJ. Predominant induction of gelsolin and actin-binding protein during myeloid differentiation. *J Biol Chem*. 1988 Sep 25;263(27):13857-62.
- (175) Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 1984 Dec;10(3-4):203-9.
- (176) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

- (177) LaFramboise WA, Griffis B, Bonner P, Warren W, Scalise D, Guthrie RD, Cooper RL. Muscle type-specific myosin isoforms in crustacean muscles. *J Exp Zool.* 2000 Jan 1;286(1):36-48.
- (178) Lang F, Ogowski MM, Costello WJ, Hill R, Roehrig B, Kent K, Sellers J. Neurotrophic influence on lobster skeletal muscle. *Science.* 1980 Jan 18;207(4428):325-7.
- (179) Lang F, Sutterlin A, Prosser CL. Electrical and mechanical properties of the closer muscle of the Alaskan king crab *Paralithodes camtschatica*. *Comp Biochem Physiol.* 1970 Feb 15;32(4):615-28.
- (180) Langer M, Giebing T, D'Haese J. Purification and functional characterization of an 85-kDa gelsolin from the ascidians *Microcosmus sulcatus* and *Phallusia mammilata*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1998 Apr;119(4):697-704.
- (181) Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med.* 1992 May 14;326(20):1335-41. Review.
- (182) Lehman W, Hatch V, Korman V, Rosol M, Thomas L, Maytum R, Geeves MA, Van Eyk JE, Tobacman LS, Craig R. Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments. *J Mol Biol.* 2000 Sep 22;302(3):593-606.
- (183) Lehman W, Szent-Gyorgyi AG. Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom. *J Gen Physiol.* 1975 Jul;66(1):1-30.
- (184) Lena JY, Legrand C, Faivre-Sarrailh C, Sarlieve LL, Ferraz C, Rabie A. High gelsolin content of developing oligodendrocytes. *Int J Dev Neurosci.* 1994 Aug;12(5):375-86.
- (185) Littlefield R, Fowler VM. Defining actin filament length in striated muscle: rulers and caps or dynamic stability *Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.* 1998 14, 487-525
- (186) Lind SE, Janmey PA. Human plasma gelsolin binds to fibronectin. *J Biol Chem.* 1984 v 10;259(21):13262-6.
- (187) Locker RH, Wild DJ. A comparative study of high molecular weight proteins in various types of muscle across the animal kingdom. *J Biochem (Tokyo).* 1986 May;99(5):1473-84.

- (188) LoRusso SM, Imanaka-Yoshida K, Shuman H, Sanger JM, Sanger JW. Incorporation of fluorescently labeled contractile proteins into freshly isolated living adult cardiac myocytes. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1992;21(2):111-22.
- (189) Lu M, Witke W, Kwiatkowski DJ, Kosik KS. Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice. *J Cell Biol*. 1997 Sep 22;138(6):1279-87.
- (190) Lubit BW, Schwartz JH. An antiactin antibody that distinguishes between cytoplasmic and skeletal muscle actins. *J Cell Biol*. 1980 Sep;86(3):891-7.
- (191) Lück A, D'Haese J, Hinssen H. A gelsolin- protein from lobster muscle: cloning, sequence analysis and expression. *Biochem J*. 1995 Feb 1;305 (Pt 3) 767-75.
- (192) Lynn RW, Taylor EW. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry*. 1971 Dec 7;10(25):4617-24.
- (193) Maciver SK, Ternent D, McLaughlin PJ. Domain 2 of gelsolin binds directly to tropomyosin. *FEBS Lett*. 2000 May 4;473(1):71-5.
- (194) Maekawa S, Sakai H. Inhibition of actin regulatory activity of the 74-kDa protein from bovine adrenal medulla (adseverin) by some phospholipids. *J Biol Chem*. 1990 Jul 5;265(19):10940-2.
- (195) Magnay JL, Holmes JM, Neil DM, El Haj AJ. Temperature-dependent developmental variation in lobster muscle myosin heavy chain isoforms. *Gene*. 2003 Oct 16;316:119-2
- (196) Margossian SS, Lowey S. Substructure of the myosin molecule. IV. Interactions of myosin and its subfragments with adenosine triphosphate and F-actin. *J Mol Biol*. 1973 Mar 5;74(3):313-30.
- (197) Margossian SS, Lowey S.:Substructure of the myosin molecule. 3. Preparation of single-headed derivatives of myosin. *J Mol Biol*. 1973 Mar 5;74(3) :301-11.
- (198) Maruyama K, Morimoto K, Kijima Y, Sobue K, Kakiuchi S. Calcium-dependent interaction of actin filaments with actin binding protein in the presence of calmodulin and caldesmon. *J Biochem (Tokyo)*. 1985 May;97(5):1517-20.
- (199) Matsudaira P, Jakes R, Walker JE. A gelsolin-like Ca²⁺-dependent actin-binding domain in villin. *Nature*. 1985 May 16-22;315(6016):248-50.
- (200) Matsudaira P, Mandelkow E, Renner W, Hesterberg LK, Weber K. Role of fimbrin and villin in determining the interfilament distances of actin bundles. *Nature*. 1983 Jan 20;301(5897):209-14.

- (201) Maximov AV, Vedernikova EA, Hinssen H, Khaitlina SY, Negulyaev YA. Ca-dependent regulation of Na⁺-selective channels via actin cytoskeleton modification in leukemia cells. *FEBS Lett.* 1997 Jul 21;412(1):94-6.
- (202) McGough AM, Staiger CJ, Min JK, Simonetti KD. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett.* 2003 Sep 25;552(2-3):75-81. Review.
- (203) McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature.* 1993 Aug 19;364(6439):685-92.
- (204) McPherson PS, Campbell KP. Characterization of the major brain form of the ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem.* 1993 Sep 15;268(26):19785-90.
- (205) Medler S, Lilley T, Mykles DL. Fiber polymorphism in skeletal muscles of the American lobster, *Homarus americanus*: continuum between slow-twitch (S1) and slow-tonic (S2) fibers. *J Exp Biol.* 2004 Jul;207(Pt 16):2755-67.
- (206) Medler S, Mykles DL. Analysis of myofibrillar proteins and transcripts in adult skeletal muscles of the American lobster *Homarus americanus*: variable expression of myosins, actin and troponins in fast, slow-twitch and slow-tonic fibres. *J Exp Biol.* 2003 Oct;206(Pt 20):3557-67.
- (207) Meerschaert K, De Corte V, De Ville Y, Vandekerckhove J, Gettemans J. Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatidic acid. *EMBO J.* 1998 Oct 15;17(20):5923-32.
- (208) Miller CJ, Cheung P, White P, Reisler E. Actin's view of actomyosin interface. *Biophys J.* 1995 Apr;68(4 Suppl):50S-54S.
- (209) Miller L, Phillips M, Reisler E. Polymerization of G-actin by myosin subfragment 1. *J Biol Chem.* 1988 Feb 5;263(4):1996-2002.
- (210) Millward DJ, Garlick PJ, Nnanyelugo DO, Waterlow JC. The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochem J.* 1976 Apr 15;156(1):185-8.
- (211) Millward DJ, Nnanyelugo DO, Bates P, Heard CR. Muscle and liver protein metabolism in rats treated with glucocorticoids. *Proc Nutr Soc.* 1976 May;35(1):47A.

- (212) Millward DJ. Protein turnover in skeletal muscle. I. The measurement of rates of synthesis and catabolism of skeletal muscle protein using $(^{14}\text{C})\text{Na}_2\text{CO}_3$ to label protein. *Clin Sci*. 1970 v;39(5):577-90.
- (213) Millward DJ. Protein turnover in skeletal muscle. II. The effect of starvation and a protein-free diet on the synthesis and catabolism of skeletal muscle proteins in comparison to liver. *Clin Sci*. 1970 v;39(5):591-603.
- (214) Moncman CL, Wang K. Targeted disruption of nebulin protein expression alters cardiac myofibril assembly and function. *Exp Cell Res*. 2002 Feb 15;273(2):204-18.
- (215) Muhlrad A, Cheung P, Phan BC, Miller C, Reisler E. Dynamic properties of actin. Structural changes induced by beryllium fluoride. *J Biol Chem*. 1994 Apr 22;269(16):11852-8.
- (216) Mykles DL, Medler S, Koenders A, Cooper R. Myofibrillar protein isoform expression is correlated with synaptic efficacy in slow fibres of the claw and leg opener muscles of crayfish and lobster. *J Exp Biol*. 2002 Feb;205 (Pt 4):513-22.
- (217) Mykles DL, Skinner DM. Four Ca^{2+} -dependent proteinase activities isolated from crustacean muscle differ in size, net charge, and sensitivity to Ca^{2+} and inhibitors. *J Biol Chem*. 1986 Jul 25;261(21):9865-71.
- (218) Mykles DL. Heterogeneity of myofibrillar proteins in lobster fast and slow muscles: variants of troponin, paramyosin, and myosin light chains comprise four distinct protein assemblages. *J Exp Zool*. 1985 Apr;234(1):23-32.
- (219) Mykles DL. High-molecular-weight serine proteinase from lobster muscle that degrades myofibrillar proteins. *J Exp Zool*. 1989 Jun;250(3):244-52.
- (220) Mykles DL. Histochemical and biochemical characterization of two slow fiber types in decapod crustacean muscles. *J Exp Zool*. 1988 Mar;245(3):232-43.
- (221) Mykles DL. Crustacean muscle plasticity: molecular mechanisms determining mass and contractile properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1997 Jul;117(3):367-78. Review.
- (222) Naib-Majani W, Osborn M, Weber K, Wohlfarth-Bottermann KE, Hinssen H, Stockem W. Immunocytochemistry of the acellular slime mould *Physarum polycephalum*. I. Preparation, morphology, and reliability of results concerning cytoplasmic actomyosin patterns in sandwiched plasmodia. *J Cell Sci*. 1983 Mar;60:13-28.

- (223) Nave R, Weber K. A myofibrillar protein of insect muscle to vertebrate titin connects Z band and A band: purification and molecular characterization of invertebrate mini-titin. *J Cell Sci.* 1990 Apr;95 (Pt 4):535-44.
- (224) Nodes BR, Shackelford JE, Lebherz HG. Synthesis and secretion of serum gelsolin by smooth muscle tissue. *J Biol Chem.* 1987 Apr 15;262(11):5422-7.
- (225) Nyakern-Meazza M, Narayan K, Schutt CE, Lindberg U. Tropomyosin and gelsolin cooperate in controlling the microfilament system. *J Biol Chem.* 2002 Aug 9;277(32):28774-9.
- (226) Ogonowski MM, Lang F, Govind CK, Histochemistry of lobster claw closer muscles during development *J.Exp.Zool.* 1980 213: 359-367
- (227) Ohtsuka Y, Nakae H, Abe H, Obinata T. Functional characteristics and the complete primary structure of ascidian gelsolin. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Apr 2;1383(2):219-31.
- (228) Oja SS. Studies on protein metabolism in developing rat brain. *Ann Acad Sci Fenn A.* 1967;131:7-81.
- (229) Oosawa F, Fujime S, Ishiwata S, Mihashi K, Dynamic property of F-actin and thin filament *Cold Spring Harbor Symp. (1972) Quant. Biol.*37, 277-285
- (230) Oota S, Saitou N. Phylogenetic relationship of muscle tissues deduced from superimposition of gene trees. *Mol Biol Evol.* 1999 Jun;16(6):856-67.
- (231) Otey CA, Kalski MH, Bulinski JC. Immunolocalization of muscle and nmuscle isoforms of actin in myogenic cells and adult skeletal muscle. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1988;9(4):337-48.
- (232) Pardo JV, Pittenger MF, Craig SW. Subcellular sorting of isoactins: selective association of gamma actin with skeletal muscle mitochondria. *Cell.* 1983 Apr;32(4):1093-103.
- (233) Pette D, Staron RS, Cellular and molecular diversities of mammalian muscle fibres *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990 116:1-76
- (234) Pollard TD, Cooper JA. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:987-1035.
- (235) Pollard TD. Actin. *Curr Opin Cell Biol.* 1990 Feb;2(1):33-40. Review.
- (236) Pollard TD. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2007;36:451-77. Review.
- (237) Pollard TD Actin and actin-binding proteins Bd1 1992 Oxford university press

- (238) Pope B, Weeds AG. Binding of pig plasma gelsolin to F-actin and partial fractionation into calcium-dependent and calcium-independent forms. *Eur J Biochem.* 1986 v 17;161(1):85-93.
- (239) Pope BJ, Gooch JT, Weeds AG. Probing the effects of calcium on gelsolin. *Biochemistry.* 1997 Dec 16;36(50):15848-55.
- (240) Potter JD, Sheng Z, Pan BS, Zhao J. A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. *J Biol Chem.* 1995 Feb 10;270(6):2557-62.
- (241) Remmert K, Hinssen H, Molluscan adductor muscle contains a 50kDa gelsolin related calcium-dependent actin severin protein *Eur.J.Cell Biol.*69 (suppl.42) 1996 160
- (242) Remmert K, Actin modulierende Proteine des Muskels 1999 Dissertation, Universität Bielefeld
- (243) Reult C, Blondin L, Fattoum A, Ternent D, Maciver SK, Raynaud F, Benyamin Y, Roustan C. Binding of gelsolin domain 2 to actin. An actin interface distinct from that of gelsolin domain 1 and from ADF/cofilin. *Eur J Biochem.* 2001 Dec;268(23):6165-75.
- (244) Rich SA, Estes JE. Detection of conformational changes in actin by proteolytic digestion: evidence for a new mimeric species. *J Mol Biol.* 1976 Jul 15;104(4):777-92.
- (245) Rios E, Brum G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature.* 1987 Feb 19-25; 325 (6106) 717-20.
- (246) Roma EL, Stolinski C, Hughes-Jones NC. An antiglobulin reagent labelled with colloidal gold for use in electron microscopy. *Immunochemistry.* 1974 Aug;11(8):521-2.
- (247) Romeis, 1989: B. Romeis: *Mikroskopische Technik (Neubearbeiten).* München, Wien, Baltimore Urban & Schwarzenberg, München, Wien, 1989.
- (248) Rouayrenc JF, Fattoum A, Gabrion J, Audemard E, Kassab R. Muscle gelsolin: isolation from heart tissue and characterization as an integral myofibrillar protein. *FEBS Lett.* 1984 Feb 13;167(1):52-8.
- (249) Royuela M, Fraile B, Paniagua R. Nebulin-like protein in the earthworm *Eisenia foetida*. *Immunochemical electron microscopic study and western*

- blot analysis of several muscle cell types. *Eur J Cell Biol.* 1997 Jul;73(3):276-80.
- (250) Rubenstein PA, Spudich JA. Actin microheterogeneity in chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Jan;74(1):120-3.
- (251) Rubenstein PA. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays.* 1990 Jul;12(7):309-15. Review.
- (252) Sanger JW, Sanger JM Fishing out proteins that bind to Titin *J.Cell.Biol* 2001 154 21-24
- (253) Sakurai T, Ohmi K, Kurokawa H, mura Y. Distribution of a gelsolin-like 74,000 mol. wt protein in neural and endocrine tissues. *Neuroscience.* 1990;38(3):743-56.
- (254) Scheer U, Hinssen H, Franke WW, Jockusch BM. Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell.* 1984 v;39(1):111-22.
- (255) Schiaffi S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev.* 1996 Apr;76(2):371-423. Review.
- (256) Schleicher M, Andre B, Andreoli C, Eichinger L, Haugwitz M, Hofmann A, Karakesisoglou J, Stockelhuber M, Noegel AA. Structure/Function studies on the cytoskeletal proteins in *Dictyostelium amoeba* as a paradigm 1995 *FEBS.Letter* 369 (1) 38-42
- (257) Schneider MF. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:463-84. Review..
- (258) Scholz A, Hinssen H. Biphasic pattern of gelsolin expression and variations in gelsolin-actin interactions during myogenesis. *Exp Cell Res.* 1995 Aug;219(2):384-91.
- (259) Selden LA, Gershman LC, Estes JE. A kinetic comparison between Mg-actin and Ca-actin. *J Muscle Res Cell Motil.* 1986 Jun;7(3):215-24.
- (260) Selden LA, Kisian HJ, Newman J, Lincoln B, Hurwitz C, Gershman LC, Estes JE. Severing of F-actin by the ami-terminal half of gelsolin suggests internal cooperativity in gelsolin. *Biophys J.* 1998 Dec;75(6):3092-100.
- (261) Sheterline P, Clayton J, Sparrow J. Actin. *Protein Profile.* 1995;2(1):1-103. Review.
- (262) Sheterline P, Sparrow JC. Actin. *Protein Profile.* 1994;1(1):1-121. Review.

- (263) Silverman, H., Costello, W. J. and Mykles, D. L. (1987). Morphological fiber type correlates of physiological and biochemical properties in crustacean muscle. *Am. Zool.* 27,1011 -1019.
- (264) Smith DS. The organization and function of the sarcoplasmic reticulum and T-system of muscle cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 1966;16:107-42. Review.
- (265) Spudich JA, Watt S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem.* 1971 Aug 10;246(15):4866-71.
- (266) Stella MC, Schauerte H, Straub KL, Leptin M. Identification of secreted and cytosolic gelsolin in *Drosophila*. *J Cell Biol.* 1994 May;125(3):607-16.
- (267) Stossel TP, Chaponnier C, Ezzell RM, Hartwig JH, Janmey PA, Kwiatkowski DJ, Lind SE, Smith DB, Southwick FS, Yin HL, et al. Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu Rev Cell Biol.* 1985;1:353-402. Review.
- (268) Straub KL, Stella MC, Leptin M. The gelsolin- flightless I protein is required for actin distribution during cellularisation in *Drosophila*. *J Cell Sci.* 1996 Jan;109 (Pt 1):263-70.
- (269) Straub F , *Actin Studies Med.Inst.Szeged*, 2:3-15, 1945
- (270) Strzelecka-Golaszewska H, Hinssen H, Sobieszek A. Influence of an actin-modulating protein from smooth muscle on actin-myosin interaction. *FEBS Lett.* 1984 v 19;177(2):209-16.
- (271) Strzelecka-Golaszewska H. Divalent cations, nucleotides, and actin structure. *Results Probl Cell Differ.* 2001;32:23-41. Review.
- (272) Sun HQ, Yamamoto M, Mejilla M, Yin HL. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem.* 1999 v 19;274(47):33179-82.
- (273) Takekura H, Franzini-Armstrong C, The structure of Ca²⁺-release units in arthropod body muscle indicates an indirect mechanism for excitation-coupling contraction *Biophys J* 2002 2742-2753 Vol83 No5
- (274) Tanaka J, Kira M, Sobue K. Gelsolin is localized in neuronal growth cones. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993 Dec 17;76(2):268-71.
- (275) Tanaka J, Sobue K. Localization and characterization of gelsolin in nervous tissues: gelsolin is specifically enriched in myelin-forming cells. *J Neurosci.* 1994 Mar;14(3 Pt 1):1038-52.

- (276) Teubner A, Sobek-Klocke I, Hinssen H, Eichenlaub-Ritter U. Distribution of gelsolin in mouse ovary. *Cell Tissue Res.* 1994 Jun;276(3):535-44.
- (277) Thorstensson R, Utter G, Fagraeus A, Hartwig JH, Yin HL, Stossel TP. Distribution of actin, myosin, actin-binding protein and gelsolin in cultured lymphoid cells. *Exp Cell Res.* 1982 Aug;140(2):395-400.
- (278) T'Jampens D, Meerschaert K, Constantin B, Bailey J, Cook LJ, De Corte V, De Mol H, Goethals M, Van Damme J, Vandekerckhove J, Gettemans J. Molecular cloning, over-expression, developmental regulation and immunolocalization of fragmin P, a gelsolin-actin-binding protein from *Physarum polycephalum* plasmodia. 1997 *J. Cell Sci* 110 1215-26
- (279) Tuominen EK, Holopainen JM, Chen J, Prestwich GD, Bachiller PR, Kinnunen PK, Janmey PA. Fluorescent phosphoistide derivatives reveal specific binding of gelsolin and other actin regulatory proteins to mixed lipid bilayers. *Eur J Biochem.* 1999 Jul;263(1):85-92.
- (280) Valentin-Ranc C, Carlier MF. Evidence for the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin. Binding of the lambda isomers of beta gamma-bidentate CrATP to actin. *J Biol Chem.* 1989 Dec 15;264(35):20871-80.
- (281) Van Troys M, Vandekerckhove J, Ampe C. Structural modules in actin-binding proteins: towards a new classification. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jan 11;1448(3):323-48. Review.
- (282) Vandekerckhove J, Weber K. Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J. Mol. Biol.* 179(3) 391-413
- (283) Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. 1978 *J. Mol Biol.* 126: 783-802
- (284) Vandekerckhove J. Actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1990 Feb;2(1):41-50. Review.
- (285) Vasconcellos CA, Lind SE. Coordinated inhibition of actin-induced platelet aggregation by plasma gelsolin and vitamin D-binding protein. *Blood.* 1993 Dec 15;82(12):3648-57.

- (286) Vouyiouklis DA, Brophy PJ. A vel gelsolin isoform expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *J Neurochem.* 1997 Sep;69(3):995-1005.
- (287) Watanabe K, Kitaura T, Yamaguchi M. Crayfish myosin has Ca²⁺-dependent regulation in actomyosin. *J Biochem (Tokyo).* 1982 v;92(5):1635-41.
- (288) Waterlow JC, Golden MH, Garlick PJ. Protein turnover in man measured with ¹⁵N: comparison of end products and dose regimes. *Am J Physiol.* 1978 Aug;235(2):E165-74.
- (289) Way M, Gooch J, Pope B, Weeds AG. Expression of human plasma gelsolin in *Escherichia coli* and dissection of actin binding sites by segmental deletion mutagenesis. *J Cell Biol.* 1989 Aug;109(2):593-605.
- (290) Way M, Pope B, Weeds AG. Are the conserved sequences in segment 1 of gelsolin important for binding actin? *J Cell Biol.* 1992 Mar;116(5):1135-43.
- (291) Way M, Pope B, Weeds AG. Evidence for functional homology in the F-actin binding domains of gelsolin and alpha-actinin: implications for the requirements of severing and capping. *J Cell Biol.* 1992 v;119(4):835-42.
- (292) Way M, Weeds A. Nucleotide sequence of pig plasma gelsolin. Comparison of protein sequence with human gelsolin and other actin-severing proteins shows strong homologies and evidence for large internal repeats. *J Mol Biol.* 1988 Oct 20;203(4):1127-33.
- (293) Weeds A, Maciver S. F-actin capping proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 Feb;5(1):63-9. Review.
- (294) Weeds AG, Harris H, Gratzer W, Gooch J. Interactions of pig plasma gelsolin with G-actin. *Eur J Biochem.* 1986 v 17;161(1):77-84.
- (295) Wegner A. Head to tail polymerization of actin. 1976 *J.Mol.Biol.*108(1) 139-50
- (296) Wegner A. Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *J Mol Biol.* 1982 v 15;161(4):607-15.
- (297) West JM, Higuchi H, Ishijima A, Yanagida T. Modification of the bi-directional sliding movement of actin filaments along native thick filaments isolated from a clam. *J Muscle Res Cell Motil.* 1996 Dec;17(6):637-46.
- (298) West, J. M. (1997). Ultrastructural and contractile activation properties of crustacean muscle fibers over the moult cycle. *Comp. Biochem. Physiol. B* 117,333 -345.

- (299) Witke W, Sharpe AH, Hartwig JH, Azuma T, Stossel TP, Kwiatkowski DJ. Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. *Cell*. 1995 Apr 7;81(1):41-51.
- (300) Witt CC, Burkard C, Labeit D, McNabb M, Wu Y, Granzier H, Labeit S, Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-Disc structure in vivo *EMBO J* 2006 25(16) 3843-55
- (301) Xian W, Janmey PA. Dissecting the gelsolin-polyphosphoisitide interaction and engineering of a polyphosphoisitide-sensitive gelsolin C-terminal half protein. *J Mol Biol*. 2002 Sep 27;322(4):755-71.
- (302) Yamamoto K, Pardee JD, Reidler J, Stryer L, Spudich JA. Mechanism of interaction of Dictyostelium severin with actin filaments. *J Cell Biol*. 1982 Dec;95(3):711-9.
- (303) Yin HL, Hartwig JH. The structure of the macrophage actin skeleton. *J Cell Sci Suppl*. 1988;9:169-84. Review.
- (304) Yin HL, Hartwig JH, Maryama K, Stossel TP Calcium control of actin filament length:effect on macrophage gelsolin on actin polymerisation *J.Biol Chem* 1981 274 32529-32530
- (305) Yin HL, Nolida K, Janmey PA. Identification of a polyphosphoisitide-modulated domain in gelsolin which binds to the sides of actin filaments. *J Cell Biol*. 1988 Mar;106(3):805-12.
- (306) Yin HL, Janmey PA, Schleicher M. Severin is a gelsolin prototype. *FEBS Lett*. 1990 May 7;264(1):78-80.
- (307) Yin HL, Stossel TP. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature*. 1979 Oct 18;281(5732):583-6.
- (308) Yin HL, Stull JT. Proteins that regulate dynamic actin remodeling in response to membrane signaling minireview series. *J Biol Chem*. 1999 v 12;274(46):32529-30. Review.
- (309) Yin HL. Gelsolin: calcium- and polyphosphoisitide-regulated actin-modulating protein. *Bioessays*. 1987 Oct;7(4):176-9. Review.
- (310) Yu X, Mykles DL. Cloning of a muscle-specific calpain from the American lobster *Homarus americanus*: expression associated with muscle atrophy and restoration during moulting. *J Exp Biol*. 2003 Feb;206(Pt 3):561-75.

Danksagung:

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Biochemische Zellbiologie“ an der Universität Bielefeld im Labor von Herrn *Prof.Dr.Hinssen* durchgeführt. Ich möchte mich nicht nur für die Überlassung und die Bereitstellung des Themas bedanken, sondern auch für die unermüdliche Bereitschaft die Ergebnisse meiner Arbeit zu diskutieren.

Bei Herrn *Prof.Dr.Bartolomaeus* von der Freien Universität Berlin möchte ich mich sehr herzlich für Bereitschaft zur Übernahme des Coreferates bedanken. Sein permantes Interesse und die durch Ihn vermittelte Euphorie halfen mir immer den Wissenschaftsalltag mit neuem Tatendrang zu begehen.

Bei Frau *Nadine Küpper* möchte ich mich nicht nur für die vielen Messungen am MALDI-MS bedanken, sondern auch für die vielen wertvollen Gespräche und Momente abseits der Biologie.

Herrn *Dr. Peter Heimann* (Lehrstuhl Entwicklungsbiologie) und Frau *Dr.Wiebke Hachmann* (Fakultät für Physik) danke ich für die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen rund um die Elektronenmikroskopie.

Ferner möchte ich mich bei Herrn *Prof. Reinhold* (Lehrstuhl Evolution) für die Nutzung der Ultramikrotomiegeräte und *PD.Dr. Schmitt-Rhaeser* (Naturhistorisches Museum, Hamburg) für die Publikation meiner ultrastrukturellen Aufnahmen danken.

Der BAH-Helgoland danke ich für meine unentgeltlichen Gastwissenschaftleraufenthalte sowie für die Bereitstellung der Zoea-Larven.

Herrn *Birgen Rothe* möchte ich für die freundliche Hilfe am cLSM danken, Herrn *Dr.Hoffrogge* (TechFak) danke ich für die Messungen am ESI-MS.

Bei Herrn *Jörg Radloff* möchte ich besonders bedanken. Er stand und steht mir in jeder Situation und Verfassung zur Seite.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und meinen außeruniversitären Freunden, besonder Frau *Aysel Alici* und Herrn *Michael Gorny* ein herzliches „Danke“.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester *Silvia*. Sie haben mich in jeglich erdenkbaren Situationen unterstützt und diese Arbeit getragen.

Anhang:

1. Sequenzvergleich von Gelsolin:

Human	mvvehpeflk	agkepglqi	rvekfdllvpv	pnllygdfft	gdayvilktv	qlrngnlqyd	lhywlgnecs	qdesgaaaif	tvqlddylng
Chimp	mvvehpeflk	agkepglqi	rvekfdllvpv	pnllygdfft	gdayvilktv	qlrngnlqyd	lhywlgnecs	qdesgaaaif	tvqlddylng
Pig	mvvehpeflk	agkepglqi	rvekfdllvpv	ppnllygdfft	gdayvilktv	qlrngnlqyd	lhywlgnecs	qdesgaaaif	tvqlddylng
Horse	mvvehpeflk	agkepglqi	rvekfdllvpv	ppnllygdfft	gdayvilktv	qlrngilqyd	lhywlgnecs	qdesgaaaif	tvqlddylng
Mouse	mvvehpeflk	agkepglqi	rvekfdllvpv	ppnllygdfft	gdayvilktv	qlrngnlqyd	lhywlgnecs	qdesgaaaif	tvqlddylng
Rat	mvvehpeflk	agkepglqi	rvekfdllvpv	ppnllygdfft	gdayvilktv	qlrngnlqyd	lhywlgnecs	qdesgaaaif	tvqlddylng
Chick	mvvehpeflk	agkepglqi	riekfdllvpv	ppnllygdfft	gdayvilkti	qlrsgnlqyd	lhwlgdcs	qdesrgaaaif	tvqmdddlqg
Zebfi	mvfhkefqn	agkepglqi	riekmdlklv	pkqlhgnfft	gdayvvlfts	paps---yn	vhmwlgnecs	qdesgaaaif	amqlddhlqg
Lobs	mvpafeg	agavegltiw	rienfevvpv	pkelygqfyq	gdayvilytr	dv-ngnlswd	lhwlgsets	qdeagtaaik	tvelddqlqg
Celeg	gtsldpalae	igkknngllvw	rinkfvlepv	pevdhgvfyi	gdayial--y	qkydgc--wd	vhfwlgknas	tdeigvaaik	tveiddslqg
Anabl									

--ravqhrev	qffesatflg	yfksglkykk	ggvasgfkvh	vpn-evvvqr	-lfqvkgrv	vratevpvsw	esfnngdcfi	ldlgnnihqw
--ravqhrev	qffesatflg	yfksglkykk	ggvasgfkvh	vpn-evvvqr	-lfqvkgrv	vratevpvsw	esfnngdcfi	ldlgnnihqw
--ravqhrev	qffesatflg	yfksglkykk	ggvasgfkvh	vpn-evavqr	-lfqvkgrv	vratevpvsw	esfnrgdcfi	ldlgndiyqw
--ravqhrev	qffesatflg	yfksglkykk	ggvasgfkvh	vpn-evvvqr	-llqvkgrrv	vratevpvsw	esfnngdcfi	ldlgnniyqw
--ravqhrev	qffesstfsg	yfksglkykk	ggvasgfkvh	vpn-evvvqr	-lfqvkgrv	vratevpvsw	dsfnngdcfi	ldlgnniyqw
--ravqhrev	qffesstfqq	yfksglkykk	ggvasgfkvh	vpn-evvvqr	-lfqvkgrv	vratevpvsw	dsfnngdcfi	ldlgnniyqw
--kavqhrev	qghesstflg	yfksgikyka	ggvasgfrhv	vpn-evtvqr	-llqvkgrrt	vratevpvsw	esfntgdcfi	ldlgsnilyqw
--apvqhrev	qnnestvflg	yfktgikykg	ggvssgnhv	vsn-emntkr	-vlhikgrra	iratevnmvsw	asfnhgdcfi	ldlgkdiyqw
--vpvqhrev	eghetslfls	rfkkgvrylk	ggvasgfhhv	dpd-apypar	-lfhvkgrrn	irirqvevgv	gsmnkgdcfi	ldcgsqvayay
--iptqhrei	qnyesplfls	yfpdgiryvs	ggyesgyrrhv	ddqfknwkp	-lfhckgkrrn	vrctevecev	nslnlgdvfi	ldlgkdlvww

cgsnsnrver	lkatqvskgi	r-----dners	grarvhvse-	-e----gtepe	amlqv-lgpk	palpagtedt	akedaanrk-	---lak---
cgsnsnrver	lkatqvskgi	r-----dners	grarvhvse-	-e----gaepe	amlqv-lgpk	palpagtedt	akedaanrk-	---lak---
cgsnsnrver	lkatqvskgi	r-----dners	grahvhvse-	-e----daepa	gmlqv-lgpk	ptlpegtedt	vkedaanrk-	---lak---
cgsksnrfer	lkatqvskgi	r-----dners	gravsvfe-	-e----gaepe	amlqv-lgpk	ptlpeatedt	vkedaanrk-	---lak---
cgsksnkfer	lkatqvskgi	r-----dners	gravhvse-	-e----ggepe	amlqv-lgpk	palpegtedt	akedaanr-	---lak---
cgsksnkfer	lkatqvskgi	r-----dners	gravhvse-	-e----gsepe	amlqv-lgpk	pdlpqggedt	akedaanr-	---lak---
cgsnsnrqer	lkatvllakgi	r-----dnekn	grakvfse-	-e----gaere	emlv-lgpk	pslpqgasdd	tkttanrk-	---lak---
cgsksnrfer	lkasevigi	r-----dnern	gratlhive-	-d----gsepd	vfsv-lgpk	psipegsdd	etttrnqk-	---kas---
mgpssrkmdr	lkaiqaanpv	r-----addha	gkakvidid-	-etasgseag	esspg-lgpg	spddvadedt	gvddsafers	evnvt---
mppesgrler	ikgmarakni	a-----dherm	gipkvhildd	vewndstfiv	syfgg-vssv	rkvskgkddd	dnywkrkteq	itllwkvdsas

2. Exemplarische MALDI Messungen:

Spectrum Analysis Report

Date: 08/30/2007 Time: 22:49

FileName: \\Sambalms-work\IAG_Hinssen\31.08.07\210_A81\1SRRef\data111r

Sequence data:

Intensity Coverage: 76.0 % (104975 cnts)
Sequence Coverage MS/MS: 0.0%

Sequence Coverage MS: 35.1%
pl (isoelectric point): 4.8

310	MVPAFEGAGA	VEGLTIWRIE	NFEVVPYPKE	KYGFYQGD	YIVLYTRDYN	GKSSMDLHFV	LGSETSQDEA	GTAAIKIVEL	DDOLGGVFC
320	110	110	120	130	140	150	160	170	180
330	HREVEGHETS	LFLSRFKKV	RYLKGVAASG	FHHVDDAPY	PARLFHVKGR	RNIRIROVEV	GVGSMNKGDG	FLLDCGSCVY	AYMGPSRRKM
340	190	200	210	220	230	240	250	260	270
350	DLRKAICAAAN	FVRADDHAGK	AKVIVIDEIA	SGSEAGESSP	GLGGGSPDDV	ADEDTGVDD	AFERSEVNVV	TLHHIFEDG	GVIQINMIGE
360	280	290	300	310	320	330	340	350	360
370	KPLLQSMDS	GDCFLLDITGV	GVVWIGSGS	SKKEKVKSM	LAAGYMEKKG	YPTYINVORV	VEKAEPAVFK	AYFKTWREPO	EIQIGLRVFT
380	390	400	410	420	430	440	450	460	470
390	QROMSAVSAT	ETDFVYSLH	AEKRRLLQGN	AGPAFALCPI	MVLARNLGP	LRTLKLEPVD	ESTHOPFFGG	DSYVLKYIYE	VNGNERYILY
400	410	420	430	440	450	460	470	480	490
410	FWQGCASSQD	EKASSAIHTV	RLDNELCGKA	VQVNVVQGYE	PAHFLRIFKG	RHVIFLGGKA	SGFKNVHDHD	TYVDGCTLFL	RVRGTCDFTD
420	500	510	520	530	540	550	560	570	580
430	RAIQOTEVAG	SLNSDDVPVL	ETPGKIVLMI	GKGASEEKA	MGEKVVVELVS	PGRDMVTVAE	GEEDDDDFWGG	LGGKGDYOTA	RDLDRPLLYP
440	640	650	660	670	680	690	700	710	720
450	RLFHCITISPA	GCLRNVEMSD	FAOEDLNEDD	VHVLDSCDEV	VVWVGGQSD	QEKEKAFITMA	ENYIKTDPIE	RILLDAIVILR	INQOGEPAAF
460	730	740	750	760	770	780	790	800	810
470	TSIFPAUNPD	MWQKGLVSYD	DMKAQVPEIN	AAVE					

Display Parameter:

Parentmass: 1000.000
MH+ (avg): 1.008
Number of Peaks: 49
Not assigned Peaks: 49

Mass Error: 998.992
Threshold (a.l.): 0.000
Above Threshold: 49

MH+ (mono): 1.008
Tolerance (Da): 1.000
Assigned Peaks: 0

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	806.296	2337.184	2	810.396	3079.290	3	856.553	911.430	4	870.578	2774.730
5	880.528	1281.463	6	884.520	562.186	7	912.523	1685.878	8	941.565	2818.097
9	955.608	4507.640	10	985.455	4614.566	11	1001.659	1054.004	12	1126.647	1798.163
13	1187.648	1842.094	14	1198.668	1033.528	15	1203.645	1513.492	16	1221.989	509.166
17	1240.653	705.225	18	1243.224	2744.487	19	1256.693	11185.718	20	1257.771	22879.951
21	1308.781	536.745	22	1326.793	661.600	23	1334.795	400.836	24	1415.857	24755.066
25	1454.874	768.423	26	1488.847	691.831	27	1503.865	2632.579	28	1559.906	6638.951
29	1564.831	763.481	30	1566.825	2087.345	31	1582.823	1544.691	32	1629.228	515.260
33	1643.855	16494.972	34	1763.053	2108.963	35	1791.016	389.411	36	1941.095	276.164
37	1950.074	1446.045	38	2003.223	381.878	39	2010.083	381.788	40	2225.290	1231.516
41	2239.301	416.578	42	2246.328	397.635	43	2253.226	269.779	44	2269.219	583.559
45	2384.169	248.968	46	2423.376	247.254	47	2488.455	191.689	48	2914.766	149.243
49	2962.661	1062.581									

