

Heterodimere F-Actin Capping Proteine

Dissertation

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

vorgelegt von
Martin H. Glenz
aus Beckum

Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld
Mai 2006

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
1 Einleitung	1
1.1 Actin	1
1.1.1 Monomeres Actin	2
1.1.2 Filamentöses Actin	3
1.1.3 Actin-Polymerisation	4
1.2 Actinbindende Proteine	7
1.2.1 Heterodimere Capping Proteine	8
1.2.2 Funktion	10
1.2.3 Struktur	12
1.2.4 Regulation	14
1.2.4.1 Direkte Regulation	14
1.2.4.2 Indirekte Regulation	15
1.3 Glattmuskeln und Glattmuskelzellen	15
1.3.1 Kontraktion und deren Regulation	17
1.3.2 Cytoskelett	17
1.4 Ziele der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Tiere und Gewebe	21
2.1.2 C ₂ C ₁₂ -Zellen	21
2.1.3 Enzyme und Proteine	21
2.1.4 Antibiotika	22
2.1.5 <i>E. coli</i> -Stämme	22
2.1.6 Plasmide und Vektoren	22
2.1.7 Verwendete Kits	23
2.1.8 Protein-Molekularmassenstandards	23
2.1.9 DNA-Längenstandards	23
2.1.10 Oligonukleotide	23
2.1.11 Plastik- und Glasartikel für die Zellkultur	24

Inhaltsverzeichnis

2.2	Proteinbiochemische Methoden	24
2.2.1	Herstellung von Muskel-Acetonpulver nach Spudich und Watt [184], modifiziert	24
2.2.2	Aufreinigung von Actin aus der Skelettmuskulatur des Schweins . . .	25
2.2.3	Aufreinigung von Actin aus der Glattmuskulatur des Schweins . . .	25
2.2.4	Aufreinigung von α -Actinin aus der Glattmuskulatur des Schweins .	26
2.2.5	Aufreinigung von CapZ aus Muskel-Acetonpulver der Skelettmus- kulatur des Schweins nach Remmert (1999), modifiziert	26
2.2.6	Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	28
2.2.6.1	Expressionskultur	28
2.2.6.2	Präparation von Einschlusskörpern (<i>inclusion bodies</i>) . . .	29
2.2.6.3	Weitere Aufreinigung der rekombinanten Protein über Io- nenaustauschchromatographie	29
2.2.7	Renaturierung	30
2.2.7.1	Renaturierung nach Remmert [1999], modifiziert	30
2.2.7.2	Renaturierung durch Dialyse in alternativem Rückfaltungs- puffer	30
2.2.7.2.1	<i>Fractional factorial protein folding screen</i>	30
2.2.7.2.2	Renaturierung in präparativem Maßstab.	32
2.2.8	Fällung von Proteinen mit verdünnter Trichloressigsäure	32
2.2.9	Proteinbestimmung	32
2.2.9.1	Biuret-Methode	32
2.2.9.2	BCA-Methode	33
2.2.10	Herstellung des Peptidantikörpers CapZ β_2	34
2.2.11	Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	34
2.2.11.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.2.11.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	36
2.2.11.2.1	Isoelektrische Fokussierung	36
2.2.11.2.2	Auftrennung nach Molekularmasse	36
2.2.11.2.3	Silberfärbung und Dokumentation	37
2.2.12	Immunblot	37
2.2.12.1	Elektrotransfer	37
2.2.12.2	Abblocken unspezifischer Bindestellen und Antikörperin- kubation	38
2.2.12.3	Nachweis mit alkalischer Phosphatase	38
2.2.13	Kosedimentation mit F-Actin	39
2.2.14	Fluorometrie	40
2.2.14.1	Capping	40

Inhaltsverzeichnis

2.2.14.2	Capping-Aktivität in verschiedenen Rückfaltungspuffern	41
2.2.14.3	Polymerisation	42
2.2.14.4	Nukleation	42
2.2.15	Quervernetzung mit EDC	43
2.2.16	Analytische Gelfiltration	44
2.2.16.1	Analyse der Rückfaltungsprodukte	44
2.2.16.2	Interaktion der rekombinanten Proteine mit α -Actinin	44
2.3	Zellbiologische Methoden	44
2.3.1	Zellkultur	44
2.3.2	Isolierung von Glattmuskelzellen nach Small und Draeger [174] [47], modifiziert	45
2.3.3	Präparation von Zellkernen	46
2.3.4	Kryoschnitte	46
2.4	Nukleinsäurebiochemische Methoden	47
2.4.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben	47
2.4.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren	48
2.4.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	48
2.4.4	Aufreinigung von DNA	48
2.4.5	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	49
2.4.6	Elektrophorese von Nukleinsäuren	49
2.4.6.1	MOPS-Gelelektrophorese von RNA	49
2.4.6.2	Agarose-Gelelektrophorese	49
2.4.7	Restriktion von DNA	50
2.4.8	Klonierung von DNA	50
2.4.8.1	Dephosphorylierung	50
2.4.9	Ligation	50
2.4.10	Klonierung von PCR-Produkten	51
2.4.11	Reverse Transkription	51
2.4.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.4.12.1	PCR zur cDNA-Amplifikation	52
2.4.12.2	Gradienten-PCR	53
2.4.12.3	One-Step RT-PCR	53
2.5	Mikrobiologische Methoden	54
2.5.1	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	54
2.5.1.1	Herstellung CaCl_2 -kompetenter Zellen	54
2.5.1.2	Transformation	55
2.5.1.3	Blau-Weiss-Selektion	56
2.5.1.4	Colony Blot	56

2.5.2	Glycerinkulturen	57
2.6	Fluoreszenzmikroskopie	57
2.6.1	Indirekte Immunfluoreszenz	58
2.6.2	Markierung mit rhodamingekoppeltem Phalloidin	59
2.6.3	Kontrollfärbungen	60
2.6.4	Photodokumentation	60
3	Ergebnisse	61
3.1	Rekombinantes CapZ	61
3.1.1	Klonierungsstrategie	61
3.1.2	Klonierung der cDNAs	62
3.1.3	Sequenzanalyse der CapZ-cDNAs	65
3.1.4	Analyse des Expressionsverlaufs	65
3.1.5	Aufreinigung rekombinanter Proteine	66
3.1.6	Renaturierung	67
3.1.6.1	Renaturierung durch schnelles Verdünnen	67
3.1.6.2	Renaturierung durch Dialyse	68
3.1.6.3	Analytische Gelfiltration der Rückfaltungsprodukte	69
3.1.6.4	Isoformspezifischen Rückfaltung von Heterodimeren	73
3.1.7	Aktivität der rekombinanten Heterodimere	76
3.1.7.1	Bindung an Glattmuskel-F-Actin	76
3.1.7.2	Capping-Aktivität an Skelettmuskel F-Actin	77
3.1.7.3	Capping-Aktivität an Glattmuskel-F-Actin	81
3.1.7.4	Nukleationsaktivität der rekombinanten Proteine	84
3.1.8	Komplexbildung	86
3.1.8.1	Komplexbildung von nativem CapZ, rekombinanten CapZ-Isoformen und separat renaturierten Untereinheiten mit Glattmuskel-G-Actin	87
3.1.8.2	Komplexbildung von nativem CapZ, rekombinanten CapZ-Isoformen und separat renaturierten Untereinheiten mit α -Actinin aus dem Glattmuskel	88
3.1.8.3	Analytische Gelfiltration zur Interaktion von α -Actinin mit CapZ und dessen Untereinheiten	90
3.2	Das polyklonale CapZ β_2 -Peptidantiserum	93
3.3	Fluoreszenzmikroskopie	94
3.3.1	Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Gesamt-Actin und β -Actin in C ₂ C ₁₂ -Zellen	94

3.3.2	Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ und β -Actin in C ₂ C ₁₂ -Zellen	97
3.3.3	Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation der CapZ β ₂ -Untereinheit und β -Actin in C ₂ C ₁₂ -Zellen	98
3.3.4	Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ, CapZ β ₂ und α -Actinin in C ₂ C ₁₂ -Zellen	101
3.3.5	Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Vinculin, CapZ und CapZ β ₂ in Gewebsschnitten und isolierten Zellen des <i>taenia coli</i>	103
3.3.6	Immunblotanalyse zum Nachweis der CapZ β ₂ -Untereinheit in C ₂ C ₁₂ -Zellkernen	106
3.3.7	Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ, CapZ β ₂ und Actin in Kernen aus Glattmuskel- und C ₂ C ₁₂ -Zellen	106
4	Diskussion	111
4.1	Rekombinantes CapZ	111
4.1.1	Das Expressionssystem	111
4.1.2	Die Renaturierungsstrategie	113
4.1.3	Rekombinantes und natives CapZ	117
4.1.4	Die α -Untereinheit	118
4.1.5	Die β -Untereinheit	121
4.2	CapZ und seine Interaktionspartner	122
4.3	Funktion von CapZ <i>in vivo</i>	123
4.3.1	Lokalisation von CapZ in Myoblasten	125
4.3.2	Lokalisation von CapZ im Glattmuskel	127
4.4	Ausblick	129
5	Anhang	130
5.1	Sequenzen	130
5.1.1	CapZ α ₁ -cDNA	130
5.1.2	CapZ α ₂ -cDNA	130
5.1.3	CapZ β ₁ -cDNA	131
5.1.4	CapZ β ₂ -cDNA	132
5.2	Abkürzungen	133
6	Danksagung	153

Zusammenfassung:

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Isoformen des heterodimeren Capping Proteins hinsichtlich ihrer Funktion und Lokalisation biochemisch untersucht. Bei den heterodimeren Capping Proteinen handelt es sich um eine hochkonservierte Familie actinbindender Proteine, deren Vertreter in allen eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, deren C-terminale Bereiche die Interaktion mit Actin vermitteln. In Vertebraten werden drei α - und drei β -Isoformen exprimiert, wobei das $\alpha_3\beta_3$ -Heterodimer nur in der Spermiencalyx exprimiert wird.

Um die Funktion der Isoformen zu differenzieren, wurden die α_1 - und die α_2 sowie die β_1 - und β_2 -Untereinheit getrennt in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und renaturiert. Die simultane Rückfaltung der in Einschlusskörpern abgelagerten rekombinanten Untereinheiten führte zu vollständig funktionellen heterodimeren Capping Proteinen, wobei diese in verschiedenen Isoformkombinationen renaturiert werden konnten. *In vitro* konnte eine bevorzugte Rückfaltung der Isoformkombinationen $\alpha_1\beta_2$ bzw. $\alpha_2\beta_1$ beobachtet werden. Eine separate Renaturierung war für die einzelnen Untereinheiten durch die Anwendung einer neuen Rückfaltungsmethode erfolgreich. Aus den Bindungseigenschaften bei der Renaturierung wurde ein Modell zur Interaktion von α - und β -Untereinheit im funktionellen Heterodimer abgeleitet. Aktivitätsmessungen bestätigten, dass beide Untereinheiten an der Interaktion mit Actin beteiligt sind. So binden beide an monomeres und polymeres Actin, ohne jedoch die Plusenden der Actinfilamente wie beim Heterodimer vollständig zu blockieren oder die Nukleation in größerem Maße zu beschleunigen. Zur vollständigen Aktivität werden daher beide Untereinheiten benötigt. Aus den gewonnenen Daten wurde ein Modell zur Interaktion der C-Termini beider Untereinheiten mit F-Actin entwickelt. Die Aktivität der einzelnen Isoformen unterscheidet sich nur geringfügig. So ist die Capping- und Nukleationsaktivität der α_1 -Untereinheit stärker als die der α_2 -Untereinheit. Ebenso zeigt die β_2 -Untereinheit eine höhere Aktivität als die β_1 -Untereinheit, wobei im nativen Heterodimer die α -Untereinheit allgemein einen stärkeren Beitrag zur Gesamtaktivität des Proteins leistet als die β -Untereinheit. Interaktionsmessungen der CapZ-Isoformen mit verschiedenen Actinen aus Skelett- und Glattmuskel zeigten keine unterschiedlichen Bindungsaktivitäten in Abhängigkeit vom eingesetzten Actin. Eine Interaktion von Capping Proteinen mit α -Actinin aus der glatten Muskulatur konnte bestätigt werden. Die Bindung erfolgt über die β -Untereinheit des CapZs, vollzieht sich unabhängig von der eingesetzten CapZ-Isoform und scheint in Muskelzellen ein allgemeines Prinzip der Actinfilament-Stabilisierung darzustellen. In Glattmuskelzellen wurde α -Actinin mit CapZ in *dense plaques* und *dense bodies* kolokalisiert, was diese Strukturen als Funktionsanalogue der Z-Scheiben von Skelettmuskelzellen erscheinen lässt.

Verschiedene CapZ-Isoformen werden auch in Glattmuskelzellen exprimiert. CapZ wurde in *dense bodies* und *dense plaques* lokalisiert, die CapZ β_2 -Untereinheit konnte jedoch nur in membranständigen *dense plaques* und in der Peripherie der Kernmembran bzw. im Nukleoplasma nachgewiesen werden. Diese Isoformverteilung bestätigt die Existenz zweier cytoskeletaler Actinfilamentsysteme, deren Funktion zum einen die Kontraktion, zum anderen die Stabilisierung der Zelle ist. Die *dense plaques* lassen sich so dem Membranskelett zuordnen, die *dense bodies* verknüpfen kontraktile Einheiten zu funktionellen Strängen und stellen deren Verbindung zum Cytoskelett her. In myogenen C₂C₁₂-Zellen ist CapZ zusammen mit β -Actin u.a. an der Ausbildung des Leitsaums beteiligt, wobei besonders $\alpha\beta_2$ -Heterodimere in diese Prozesse involviert sind. Auch hier kann von der Existenz zweier cytoskeletaler Actinsysteme ausgegangen werden.

1 Einleitung

1.1 Actin

Die Actine bilden eine Familie cytoplasmatischer, hochkonservierter und multifunktionaler Proteine, die in allen eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Die Multifunktionalität dieser Proteine beruht im Wesentlichen auf drei zentralen Fähigkeiten: (1) der Stimulierung der ATPase-Aktivität des Myosins, einem Motorprotein zahlreicher motiler Prozesse, (2) der reversiblen Polymerisation zu verknüpften Filamenten und (3) der Fähigkeit zum Binden zahlreicher verschiedener Proteine.

Actin aus dem Kaninchenskelettmuskel konnte erstmals von Straub im Jahre 1942 isoliert werden [186], die Isolierung aus Nichtmuskelzellen gelang einige Jahre später Hatano und Oosawa 1966 [69]. Bis heute ist eine Vielzahl weiterer Aufreinigungsverfahren von Actin aus unterschiedlichen Quellen veröffentlicht worden (Sheterline & Sparrow, 1994, [171]). In höheren Eukaryoten sind verschiedene Actinisoformen beschrieben worden, die gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert werden. Sie unterscheiden sich vor allem in ihren biochemischen Eigenschaften und passen sich somit funktionell an die spezifischen Anforderungen bestimmter Gewebe an, wobei sie sich vielmehr in der Art ihrer Bindungspartner als in ihren Polymerisationseigenschaften unterscheiden (Rubenstein, 1990 [154]; Hermann, 1993 [71]). Untersuchungen zur Homologie des Actins aus verschiedenen Zelltypen ergaben, dass sowohl die Sequenzen als auch die biochemischen Eigenschaften hochkonserviert sind und Actin allgemein zu den am stärksten konservierten Proteinen zählt (Vanderkerckhove & Weber, 1978 [197]).

In Mammalia sind sechs verschiedene Actinisoformen identifiziert worden: zwei Herz- bzw. Skelettmuskel- α -Actine, zwei Glattmuskel- α -Actine und zwei Nichtmuskelactine (β - und γ -Actin). Einige Hinweise zur Evolution des Actins lassen vermuten, dass die Entstehung des Proteins eng mit der Entwicklung des eukaryontischen Lebens vor 1,5 - 2 Milliarden Jahren verknüpft ist (Doolittle, 1992 [43]). Die Muskelisoformen entstanden vermutlich durch Genduplikation während der frühen Amphibienentwicklung oder beim Übergang von Amphibien zu Reptilien. Proteinbiochemische Analysen dieser Isoformen ergaben, dass sie sich hauptsächlich in ihren N-terminalen Aminosäuresequenzen (Hightower & Meagher, 1986 [72]) und ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden (Vanderkerckhove & Weber, 1978, [197]).

1.1.1 Monomeres Actin

Actin besteht aus einer Polypeptidkette mit 374 Aminosäuren bei den Nichtmuskel- bzw. 375 Aminosäuren bei den Muskelisofomen und besitzt eine Molekularmasse von 42 kDa. Röntgenkristallographische Untersuchungen von Actin im Komplex mit DNaseI (Kabsch et al., 1990 [86]; Kabsch & Vanderkerckhove, 1992 [87]) oder Actin mit Gelsolin (McLaughlin et al., 1993 [115]) ergaben, dass das Molekül eine annähernd globuläre Struktur mit einer räumlichen Ausdehnung von ca. 5,5 x 5,5 x 3,5 nm aufweist (Abbildung 1.1, Bremer & Aebi, 1992 [15]). Es wird durch einen Spalt, der die hochaffine Bindestelle für ein Nukleotid (ATP oder ADP) und ein divalentes Kation (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) enthält, in die Domäne 1 (AS 1-144 und AS 338-375) und Domäne 2 (AS 145-337) getrennt, wobei die Domäne 1 den C- und N-Terminus beinhaltet (Carlier, 1991 [23]). Zusätzlich besitzt Actin weitere niedrigaffine Bindestellen für mono- und divalente Kationen, die eine Rolle bei der salzinduzierten Monomeraktivierung spielen (K_{Diss} im mikro- bzw. millimolaren Bereich (Zimmerle et al., 1987 [216]; Carlier, 1991 [23]; Dos Remedios & Barren, 1983 [44])). Die beiden Domänen werden durch zwei Stränge der Polypeptidkette zusammengehalten und bilden so ein Gelenk, welches die Bewegungen beider Domänen zueinander ermöglicht. Über Ionenbindungen und Wasserstoffbrücken wird das Molekül stabilisiert, wobei der Verlust von Nukleotid und Kation zur Denaturierung des Actins führt (Bremer & Aebi, 1992 [15]; Holmes & Kabsch, 1991 [75]; Kabsch & Vanderkerckhove, 1992 [87]).

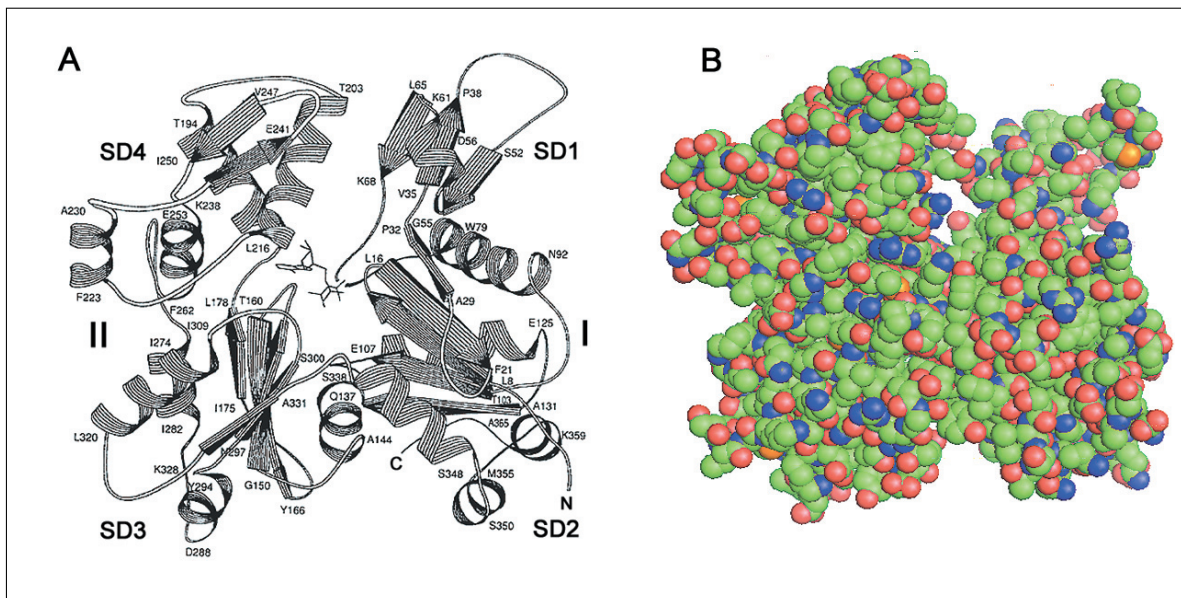


Abbildung 1.1: Struktur des Actins. (A) Die helikalen Bereiche stellen α -Helices, die Pfeile β -Faltblattstrukturen dar. Aminosäuren zu Beginn oder am Ende dieser Strukturen sind mit dem Einbuchstabencode gekennzeichnet. I und II bezeichnen die Domänen 1 und 2, SD die Subdomänen; (B) Das Actinmonomer als Kalottenmodell. Nach Kabsch et al., 1990 [86].

Kinetische Untersuchungen zur Ligandenbindung ergaben, dass *in vivo* die hochaffine Bindestelle für das divalente Kation mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Mg^{2+} besetzt ist, während das Mg^{2+} *in vitro* durch freie Ca^{2+} -Ionen des Puffers verdrängt wird ($K_{Diss} Mg^{2+}$ 10 nM, $K_{Diss} Ca^{2+}$ 2 nM, Gershman et al., 1986 [58]). In Bezug auf die Nukleotidbindung konnte für Actin ohne gebundenes Kation eine hohe ATP-Affinität, die mit einer hohen Freisetzungsrates des Nukleotids gekoppelt war, nachgewiesen werden (Kinosian et al., 1993 [92]).

Die Domänen 1 und 2 werden in Subdomäne 1 und 2 (Domäne 1) und Subdomäne 3 und 4 (Domäne 2) unterteilt. Strukturelle Homologien zwischen Subdomäne 1 und 3 weisen auf die Entstehung dieser Domänen durch Genduplikation hin (Abbildung 1.1).

1.1.2 Filamentöses Actin

Unter physiologischen Bedingungen liegt Actin vornehmlich als Polymer (F-Actin) vor (Oosawa et al., 1959 [127]). Zwei Modelle beschreiben die Struktur des Actinfilaments als: (1) linksdrehende Helix mit einem Umgang von 5,9 nm und einem Rotationswinkel von 168° zwischen zwei benachbarten Actinmolekülen (Korn, 1982 [95]) und als (2) rechtsgängige Doppelhelix mit einem Umgang von 72 nm mit 370 Untereinheiten pro Mikrometer (Abbildung 1.2, Jockusch & Hinssen, 1996 [84]; Steinmetz et al., 1997 [185]; Amann & Pollard, 2001 [2]). Einige Daten deuten darauf hin, dass das zweite Modell der tatsächlichen Struktur des Filaments *in vivo* entspricht (Abbildung 1.2). So ist die Bindung benachbarter Actinmonomere entlang der Doppelhelix stärker als zwischen denen der Einzelhelix (Holmes et al., 1990 [76]; Bremer & Aebi, 1992 [15]). Außerdem wurde ein laterales Gleiten der Polymerstränge der Doppelhelix relativ zueinander nachgewiesen (Bremer et al., 1991 [16]).

Der Durchmesser von Actinfilamenten liegt bei 6 - 10 nm (Milligan et al., 1990 [118]) bei einer maximalen Länge von $7 \mu m$ *in vitro* nach Einstellung des Gleichgewichtszustands (Rickard & Sheterline, 1988 [153]). Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass die Subdomänen 1 und 2 nach außen weisen, während die anderen beiden Subdomänen 3 und 4 zur zentralen Achse orientiert sind. Das Plusende des Filaments wird von den Subdomänen 3 und 4 gebildet (Bremer & Aebi, 1992 [15]).

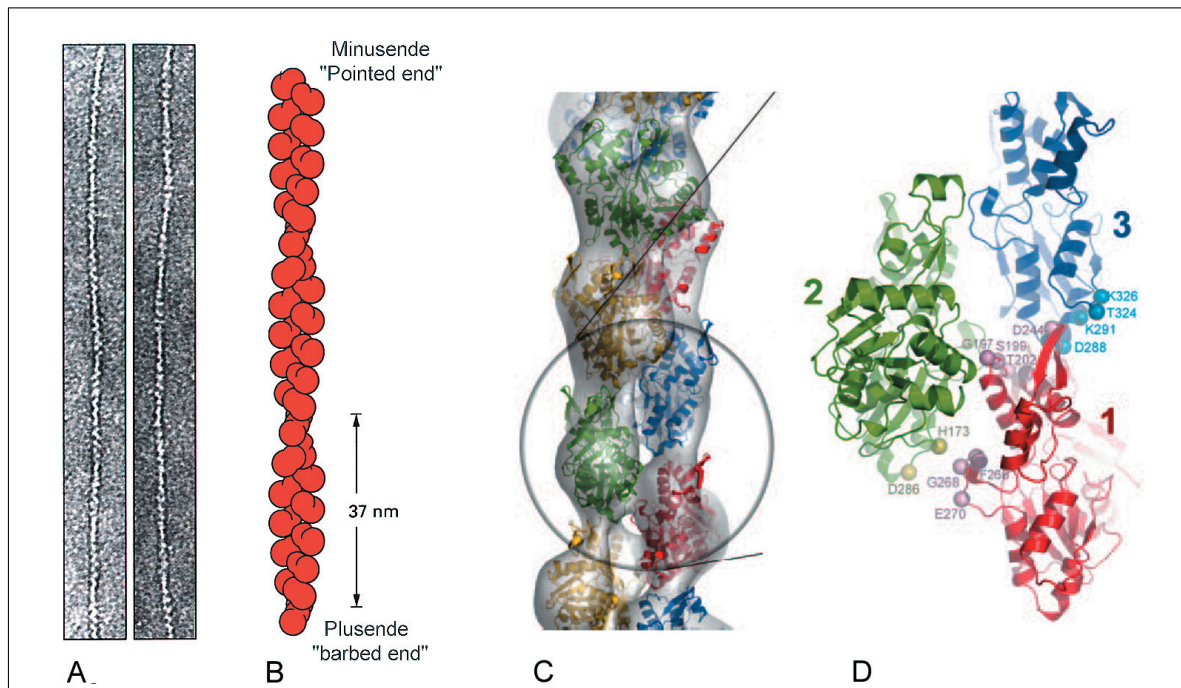


Abbildung 1.2: Struktur des F-Actins. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von zwei Actinfilamenten. (B) Schematische Darstellung eines Actinfilaments. Eine Helixwindung wiederholt sich alle 37 nm. (C) Actinfilament mit vier Untereinheiten pro Protofilament nach Daten von Orlova et al., 2001 [128]. Die einzelnen Actinmoleküle sind farblich hervorgehoben. (D) Detailansicht von drei Protomeren im Filament nach Holmes et al., 2003 [74]. Aminosäurereste, die an der Interaktion der Protomere beteiligt sind, sind mit dem Ein-Buchstaben-Code gekennzeichnet. Abbildung nach Kudryashov et al., 2005 [98] und Alberts et al., 2002 [48], modifiziert.

1.1.3 Actin-Polymerisation

Der Prozess der Actin-Polymerisation kann als mehrstufiger *self assembly*-Mechanismus wie folgt beschrieben werden: (1) Aktivierung durch Bindung von Salzen und Konformationsänderung des Monomers, (2) Formation von Nukleationskeimen und (3) bidirektionales Wachstum des Polymers durch Anlagerung weiterer Monomere (Pollard & Cooper, 1986 [144]; Carlier, 1991 [23]; Dos Remedios & Barden, 1983 [44]).

Der erste Schritt erfolgt durch die Anlagerung von mono- oder divalenten Kationen an Bindestellen mit niedriger Affinität zu ATP/ADP-G-Actin. Es kommt zu einer Konformationsänderung im Protein (Dos Remedios & Barden, 1983 [44]; Carlier, 1991 [23]).

Nach Aktivierung der Monomere kommt es zur Ausbildung von Nukleationskeimen. Diese bestehen aus Actin-Trimeren und bilden die kleinste stabile Einheit (Pollard & Cooper, 1986 [144]). Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend, da es sich um eine energetisch recht ungünstige Reaktion handelt (K_{Diss} 0,1-1 M), die auch die Ursache für die „lag-Phase“ in der Polymerisationskinetik darstellt.

1 Einleitung

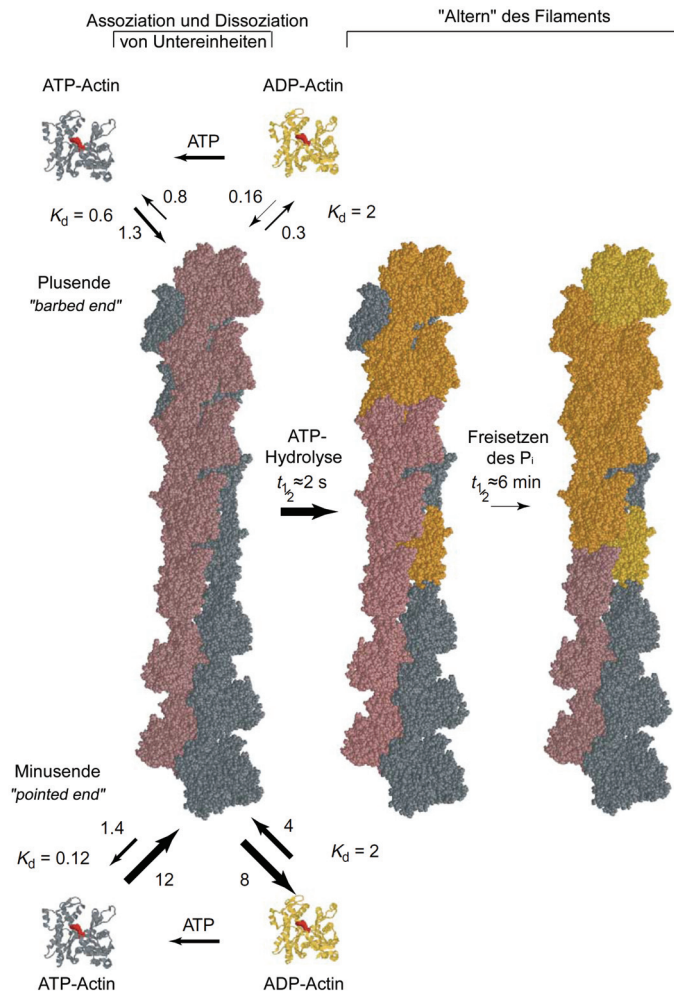


Abbildung 1.3: Haupteigenschaften von Filamentstruktur und Biochemie des Actins. Dargestellt sind drei Actinfilamente (nach Holmes et al., 1990 [76]) in der sog. „space-filling“-Ansicht. Jedes besteht aus 14 Actin-Untereinheiten, wobei jedes Protofilament zur Unterstreichung der helikalen Struktur und des gestaffelten Aufbaus anders gefärbt ist (grau und rosa). Das linke Filament zeigt die Assoziations- ($\mu M^{-1} s^{-1}$) und Dissoziationsraten (s^{-1}) für ATP-Actin (grau) und ADP-Actin (gelb), die mit gebundenem Nukleotid (rot) dargestellt sind. Ebenso ist der Prozess der ATP-Hydrolyse beim mittleren und rechten Filament gezeigt. ATP-Actin hydrolysiert ATP zu ADP- P_i -Actin (goldfarben), worauf das Phosphat langsam vom Actin dissoziiert und ADP-Actin (gelb) zurücklässt. Die Konsequenz aus diesen verschiedenen Bindungskonstanten ist der „Treadmilling“-Effekt, wobei ATP-Actin am Plusende bindet und ADP-Actin das Filament am Minusende verlässt. *In vivo* sind viele andere Proteine an diesen Prozessen und deren Regulation beteiligt. Abbildung nach Pollard, 2003 [143] und Wear & Cooper, 2004 [205], modifiziert.

Die Polymerisationsgeschwindigkeit ist von der Art des gebundenen Nukleotids abhängig. Aktiviertes ATP-G-Actin bildet *in vitro* wesentlich schneller Trimere als ADP-G-Actin (Estes et al., 1992 [49]; Kinosian, 1993 [92]), jedoch wird eine maximale Polymerisationsgeschwindigkeit mit einem Gemisch aus ATP- und ADP-Actin erzielt (Pantaloni et al., 1985 [135]). Außerdem sind die gebildeten Actin-Trimere in Mg^{2+} -haltigen Lösungen stabiler als in Ca^{2+} -haltigen (Maruyama, 1981 [113]; Carlier et al., 1986 [26]; Attri et al.,

1991 [6]).

Die Elongation wird durch Assoziation und Dissoziation von Monomeren an den Filamentenden bestimmt und ist im Vergleich zur Nukleation ein sehr schneller Vorgang (Abbildung 3.1). Sobald die Konzentration von freien Monomeren unter die kritische Konzentration gefallen ist, wird die Elongation beendet und es stellt sich ein dynamischer Gleichgewichtszustand, der sog. *steady state* ein, bei dem die Raten für Assoziation und Dissoziation an den Filamentenden identisch sind. Eine Polymerisation unterhalb der kritischen Konzentration ist nicht möglich. Neben der Konzentration an G-Actin-Monomeren, dem pH-Wert der Lösung und der Temperatur ist die kritische Konzentration von der Art des gebundenen Kations und des Nukleotids sowie dessen Konzentrationen abhängig (Gershman, 1989 [59]; Oosawa, 1983 [126]).

Actinfilamente haben eine strukturelle und funktionelle Polarität, die von Huxley erstmals durch Dekoration mit Myosin-SI-Fragmenten nachgewiesen wurde (Huxley, 1963 [80]). In Anlehnung an die entstandenen Strukturen der so dekorierten Filamente wurden die Enden als „pointed“ und „barbed“ ends bezeichnet (Abbildung 1.2 und 1.3). Wachstumsraten und kritische Konzentrationen sind für beide Enden recht unterschiedlich. Das Plusende („barbed end“) zeichnet sich durch eine geringe Dissoziations- und hohe Assoziationsrate sowie eine geringe kritische Actinkonzentration (ca. $0,1 \mu\text{M}$) aus (Kondo & Ishiwata, 1976 [94]; Wegner, 1976 [208]), während das Minusende („pointed end“) hohe Dissoziations- und geringe Assoziationsraten sowie eine 12 bis 15fach höhere kritische Actinkonzentration aufweist (Amann & Pollard, 2001 [2]). Im *steady state* pendelt sich die kritische Actinkonzentration zwischen den Werten für beide Enden ein, woraus eine Nettoassoziation am Plusende und eine Nettodissoziation am Minusende resultiert.

Außer in den o.g. Eigenschaften differieren die Affinitäten beider Filamentenden zu ATP- und ADP-G-Actin. Das Plusende zeigt eine höhere Affinität zu ATP-G-Actin als das Minusende (Pollard & Cooper, 1986 [144]). Bei dem als *treadmilling* bezeichneten Prozess wird ATP-G-Actin am Plusende in das Filament eingebaut und als ADP-G-Actin am Minusende wieder entlassen. Nach dem Austausch von ADP gegen ATP kann das Actinmonomer erneut assoziieren (Wegner, 1982 [209]). Die ATPase des Actins hydrolysiert das inkorporierte ATP-G-Actin zu ADP- P_i -Actin und weiter zu ADP-Actin + P_i , wobei die Freisetzung des anorganischen Phosphats die Actin-Actin-Interaktion im Filament destabilisiert und somit die Depolymerisation erleichtert (Abbildung 1.3, Carlier, 1991 [23]). Die Aktivität einiger actinbindender Proteine wird durch ihre unterschiedliche Affinität zu ATP- bzw. ADP-Actin reguliert, was wiederum zu einer Modulation der Polymerisation und Depolymerisation führt (Carlier et al., 1993 [24]; Laham et al., 1993 [102], Hayden et al., 1993 [70]; Maciver & Weeds, 1994 [111]).

1.2 Actinbindende Proteine

In eukaryotischen Zellen wird die Organisation der Actinfilamente nicht alleine durch den Wechsel der Ionenbedingungen und Änderung der Verfügbarkeit von Actinmonomeren zeitlich und räumlich koordiniert, sondern wird durch eine Vielzahl von actinbindenden Proteinen (ABPs) moduliert.

Eine Klassifizierung kann durch die Funktion und Wirkungsweise dieser Proteine auf die Actinorganisation erfolgen (Venderkerckhove, 1990 [196]; Hartwig & Kwiatkowski, 1991 [68]; Weeds & Maciver, 1993 [207]; Schleicher et al., 1995 [166], Pollard, 1993 [141], Dos Remedios, 2003 [45]). So wurden allein in den letzten 7 Jahren über 65 weitere actinbindende Proteine entdeckt (Kreis, 1999 [97]). Einige actinbindende Proteine wie z.B. Gelsolin, CapZ oder Profilin sind allerdings multifunktional, was eine Einordnung in eine bestimmte Klasse erschwert (Weeds & Maciver 1993 [207]; Pantaloni & Carlier, 1993 [134]; Carlier & Pantaloni 1997 [25]), so dass im Zuge der strukturellen Aufklärung von Proteinstrukturen eine modifizierte Einordnung nach funktionellen Gruppen diskutiert wird (Van Troys et al., 1999 [195]). Hierbei erfolgt die Einordnung der Proteine nach der räumlichen Struktur ihrer actinbindenden Module, welche die biochemischen Eigenschaften und Bindungseigenschaften determinieren (Pulus et al. 1998 [147]). Die daraus resultierenden Gruppen werden als Proteinfamilien bezeichnet.

APBs können, nach der erstgenannten Klassifizierung (Dos Remedios, 2003 [45]), in sieben Gruppen eingeteilt werden:

- **Monomerbindende Proteine**, z.B. DNase I, Profilin, ADF/Cofilin und β -Thymosine, binden monomeres G-Actin und verhindern so die Polymerisation. Durch die Bindung wird außerdem ein Vorrat an Monomeren angelegt, der bei Bedarf durch entsprechende Stimuli freigesetzt wird und eine schnelle Polymerisation ermöglicht (Sun et al., 1995 [187]; Jockusch & Hinssen, 1996 [84]).
- **Filament-depolymerisierende Proteine** induzieren die Konversion von F- zu G-Actin. Beispiele hierfür sind CapZ und Cofilin.
- **Filamentenden-bindende Proteine** „cappen“ die Enden von Actinfilamenten und verhindern so einen Austausch von Monomeren am *pointed end* (Tropomoduline) oder am *barbed end* (CapZ, Gelsoline etc.).
- **Filament-schneidende Proteine** (z.B. Gelsoline) verkürzen die durchschnittliche Länge von Filamenten durch die Bindung an F-Actin und Zerschneiden des Filaments.

- **Quervernetzende Proteine** enthalten meist zwei Bindestellen für F-Actin und können so die Bildung von Filamentbündeln, verzweigten Filamenten und dreidimensionalen Netzwerken induzieren. Beispiele hierzu sind α -Actinin, Villin, Fimbrin, Spectrin und der Arp2/3-Komplex (Otto, 1994 [130]; Dos Remedios 2003 [45]).
- **Stabilisierende Proteine**, wie z.B. Tropomyosin und Nebulin, binden seitlich am F-Actinfilament und verhindern dadurch seine Depolymerisation.
- **Motorproteine** benutzen das Actinfilament als „Schienenstrang“, an dem sie sich entlang ziehen. Die große Familie der Myosinmotoren gehört zu dieser Gruppe.

Die Modulation von actinbindenden Proteinen geschieht über eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli, wobei einer der wichtigsten der cytosolische Ca^{2+} -Spiegel ist. So aktivieren freie Ca^{2+} -Ionen beispielsweise einige Actin-Modulatoren (Blanchard et al., 1989 [12]), inhibieren aber die Aktivität von Nichtmuskel- α -Actinin.

Saure Phospholipide wie das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) sind Bestandteil einiger Signaltransduktionskaskaden und regulieren die Aktivität von ABPs wie Profilin, Gelsolin und CapZ.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation einzelner ABPs ist z.B. die Phosphorylierung und Dephosphorylierung spezifischer Aminosäurereste sowie andere posttranslationale Modifikationen.

1.2.1 Heterodimere Capping Proteine

Heterodimere F-Actin Capping Proteine (CP) binden Ca^{2+} -unabhängig mit hoher Affinität ($K_d = 0,1 - 5 \text{ nM}$) an die Plusenden von Actinfilamenten und stabilisieren diese, indem sie dort den Austausch von Actinmonomeren verhindern. Außerdem sind sie in der Lage, die Actinpolymerisation zu beschleunigen (Casella et al. 1986 [28]). Ein erstes dimeres Capping Protein wurde von Isenberg et al. 1980 aus *Acanthamoeba castellanii* isoliert [81], worauf es in den folgenden Jahren gelang, Proteine dieser Familie auch aus anderen Organismen und Geweben wie *Dictyostelium discoideum* (Schleicher et al., 1984 [167]), *Saccharomyces cerevisiae* (Armatruda & Cooper, 1992 [3]), *Drosophila melanogaster* (Hopmann et al., 1995 [77]), sowie Neutrophilen (DiNubile et al., 1995 [41]), Erythrozyten (Kuhlman & Fowler, 1997 [99]), Leukozyten (Noel et al., 1996 [123]), der Skelettmuskulatur des Huhns (Casella et al., 1986 [28]) und dem Rinderhirn (Kilimann & Isenberg, 1982 [90]) zu isolieren und zum großen Teil zu charakterisieren. Die weite Verbreitung dieser Proteine deutet darauf hin, dass es sich bei ihnen um allgemeine Elemente des Cytoskeletts handelt. Keine Proteine außerhalb der Familie der Capping Proteine besitzen substantielle Sequenzähnlichkeiten zu den CP.

CapZ (oder auch β -Actinin, Maruyama et al., 1990 [114]) ist in allen eukaryotischen Zellen präsent. Im Skelettmuskel ist es vor allem in den Z-Scheiben lokalisiert und wird dort vermutlich durch die Interaktion mit einigen anderen Proteinen verankert (Littlefield & Fowler, 1998, Übersichtsartikel [109]). Es wird normalerweise aus Hühner- oder Kaninchenskelettmuskeln präpariert, ist aber oft auch unerwünschter Bestandteil von präpariertem G-Actin, wenn dieses nicht zweimal gefiltert wurde (Casella et al., 1986 [28]). In Nichtmuskelzellen ist es vor allem in Bereichen lokalisiert, in denen F-Actinfilamente inserieren. Dazu gehören Lamellipodien und Filopodien, aber auch allgemein Bereiche in Plasmamembrannähe (Schafer et al., 1994 [160]).

In *Drosophila* führt eine herabgesetzte CapZ-Expression zu einem Anstieg des F-Actin-Niveaus, zu einem desorganisierten Actin-Cytoskelett und damit zu einer abnormalen Flugmuskel-Morphologie (Hopmann et al., 1995 [77]; Hopmann & Miller 2003 [78]). Beim Menschen scheint CapZ eine Rolle bei Herzerkrankungen zu spielen (Pyle 2004 [148]).

In Mammalia werden je drei α - und β -Isoformen der jeweiligen Untereinheiten exprimiert. Die α -Isoformen sind die Produkte von drei verschiedenen Genen und werden gewebespezifisch exprimiert. Die α_1 - und α_2 -Isoformen stehen sich phylogenetisch sehr nahe (ca. 85% AS-Sequenzübereinstimmung), während die α_3 -Isoform zu den beiden anderen Isoformen starke Divergenzen aufweist (Hart et al., 1997 [66]). Sie wird ausschließlich in Testes exprimiert (Tanaka et al., 1994 [190]; Miyagawa et al., 2002 [120]; Yoshimura et al., 1999 [214]). In allen untersuchten Vertebratengeweben ist das Verhältnis von α_1 - zu α_2 -Isoform in Erythrozyten am höchsten (17:1), in Endothelzellen am geringsten (0:1).

Bis heute wurden in Mammalia drei CapZ β -Isoformen identifiziert. Alle drei entstehen durch alternatives Spleißen eines Gens (Schafer et al., 1994 [160]; von Bülow et al., 1997 [202]). Auch die β -Isoformen werden gewebsspezifisch exprimiert. So gilt die β_1 -Isoform wegen ihres großen Anteils in den Z-Scheiben des Skelettmuskels als die „Muskelisoform“ und die β_2 -Untereinheit als „Nichtmuskelisoform“, da sie in höheren Anteilen vor allem in der Milz und dem Hirn exprimiert wird. Beide unterscheiden sich lediglich durch eine kurze C-terminale Region (Schafer et al., 1994 [160]).

Die β_3 -Isoform ist eine Komponente der cytoskeletalen Calyx des Spermienkopfes bei Mammalia (von Bülow et al., 1997 [202]) und ist, mit Ausnahme einer N-terminalen 29 AS-Extension, identisch mit der β_2 -Untereinheit. Eine Überexpression der β_2 -Isoform wirkt in Mäusen bis zum 21. Tag nach Geburt letal (Hart & Cooper 1999 [65]). Sie nimmt also eine distinkte Funktion *in vivo* ein und kann die Funktion der β_1 -Isoform trotz ihrer hohen Homologie nicht ersetzen.

Das Gen für die β -Isoformen wurde beim Menschen auf Chromosom 1, Position q36.1 und das der α_2 -Isoform auf Chromosom 7, Position q31.2-31.3 lokalisiert (Barron-Casella et al., 1995 [10]).

Die CapZ-Isoformen werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert.

So ist beispielsweise in der Skelettmuskulatur die CapZ $\alpha_2\beta_1$ -Isoform vorherrschend, während in der Milz die $\alpha_1\beta_2$ -Isoform dominiert (Hart et al., 1997 [66], Schafer et al., 1994 [160]). In Erythrozyten wird fast ausschließlich die $\alpha_1\beta_2$ -Isoform exprimiert (Kuhlman & Fowler 1997 [99]). An vielen anderen Geweben wie z.B. der glatten Muskulatur wurden bisher keine Untersuchungen zum Expressionlevel von CapZ-Isoformen vorgenommen.

1.2.2 Funktion

Die bisher bekannten Funktionen von CapZ sind (1) die Nukleationsförderung von Actin, (2) das „Cappen“ von Actinfilamenten, (3) die Regulation des Actinzusammenschlusses am Plusende von Filamenten, (4) die Unterdrückung der „Annealing“ genannten Anlagerung von Actinmonomeren an den Plusenden (Sept et al., 1999 [169]) und schließlich (5) die korrekte Positionierung von Actinfilamenten in der Z-Scheibe (Schafer et al., 1995 [159]). CapZ hat keinen Einfluss auf die Fragmentation von Filamenten und bindet nicht an deren Minusenden (Casella & Torres, 1994 [29]).

Der bisher bestuntersuchte Vertreter der heterodimeren Capping Proteine ist das CapZ aus der Brustmuskulatur des Huhns (Casella et al., 1986 [28]; Caldwell et al., 1989 [18]). In Skelettmuskeln ist es vor allem in den Z-Scheiben lokalisiert und verankert dort die Plusenden von Actinfilamenten (Casella et al., 1987 [27]). In anderen Zelltypen nimmt CapZ vor allem Einfluss auf das Cytoskelett (Karpova et al., 1995 [88]; Hart et al., 1999 [65]). Interaktionen mit anderen Proteinen, wie z.B. α -Actinin (Papa et al., 1999 [137]), Komponenten des Dynactin-Komplexes (Schafer et al., 1994 [160]), Twinfilin (Palmgren et al., 2002 [133]; Hopmann et al., 2003 [78]), S100B und S100 $_a0$ (Ca²⁺-bindenden Proteinen des Muskels, Ivanenkov et al., 1996 [82]; Kilby et al., 1997 [89]; Wright et al., 2005 [211]), CKIP-1 (Canton et al., 2005 [22]) und V-1 (oder Myotrophin, Taoka et al., 2003 [191]) sind beschrieben. Eine Interaktion von Titin und CapZ in Z-Scheiben der Skelettmuskulatur wurde postuliert (Schafer et al., 1993 [162]).

CapZ kann in der Myofibrillogenese bereits recht früh im quergestreiften Muskel lokalisiert werden (Schafer et al., 1993 [162]). Die periodische Anordnung von CapZ erscheint dort vor der des Actins, jedoch nach der von Titin und Myosin. Wird die Interaktion von CapZ und Actin während der Myofibrillogenese unterbunden, so führt dies zu einer veränderten Assoziation der Actinfilamente im Sarkomer (Schafer et al., 1995 [159]). Es wird vermutet, dass CapZ zunächst in der Z-Scheibe eingebaut wird und dort Actinfilamente durch Bindung an das Capping Protein fixiert bzw. polymerisiert werden. Eine andere Interpretation ist, dass polymerisierende Filamente durch die Blockade des Plusendes an einem weiteren Wachstum gehindert werden. Trotz der starken Bindung von CapZ an die Plusenden der Actinfilamente im quergestreiften Muskel findet ein dynamischer Austausch von Actinmonomeren an beiden Enden *in vivo* statt (Littlefield et al., 2001 [108]).

1 Einleitung

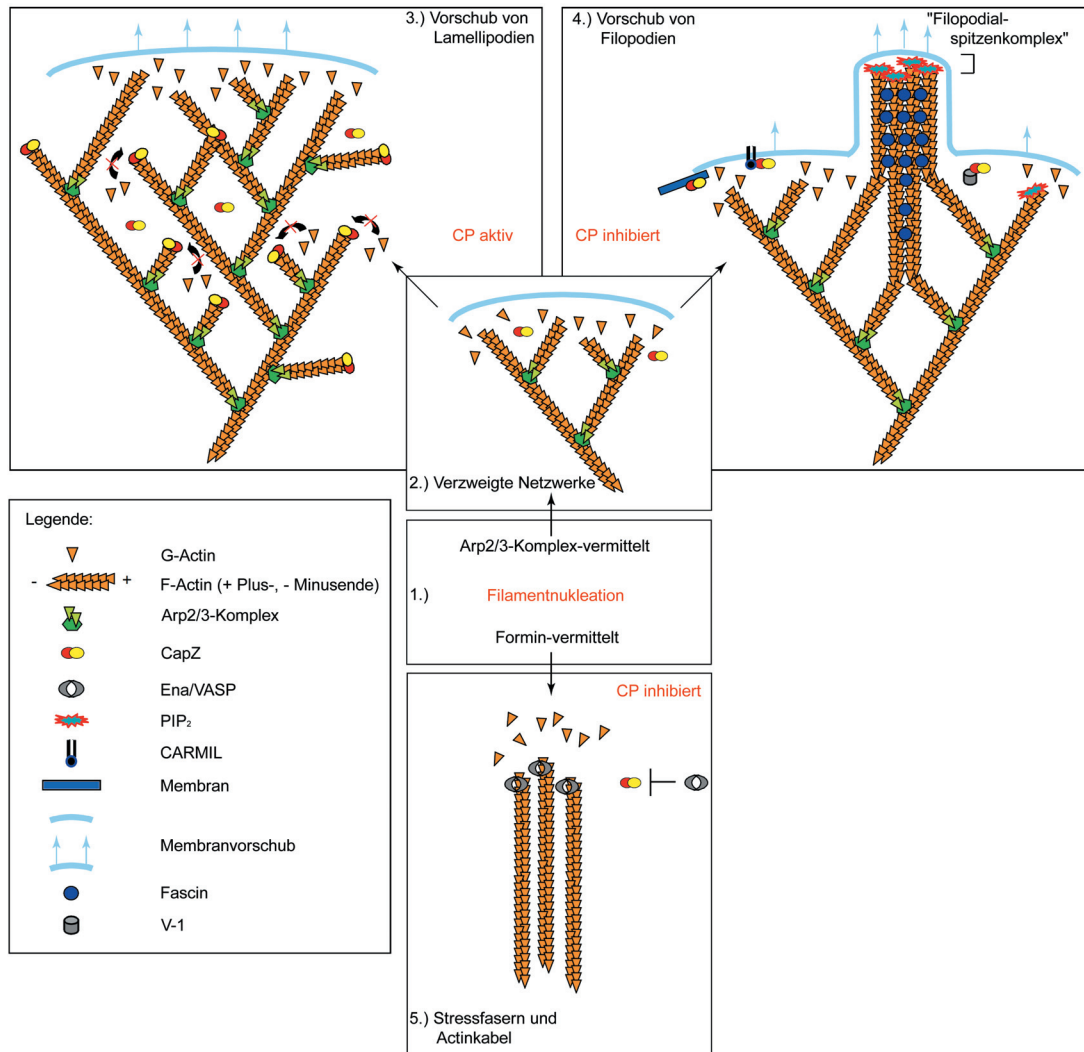


Abbildung 1.4: Modell des Einflusses der Capping-Aktivität von CapZ auf die Generierung verschiedener Actinfilament-Architekturen. (1) Zellen können die Nukleation von Actin durch zwei Hauptmechanismen (Arp2/3- und Formin-vermittelte Nukleation) initiieren. (2) Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes führt zur Bildung von verzweigten Netzwerken. Die Modulation der CapZ-Aktivität kann dann zu einer funktionell und strukturell distinkten Actin-Architektur führen. (3) Bei der Bildung von Lamellipodien führt das Cappen von Filamenten zur Bildung eines stark verzweigten Netzwerks mit kurzen Filamenten. CapZ besetzt die kurzen, „älteren“ Enden des Netzwerks, so dass nur die „neueren“ Filamente in Membrannähe weiter polymerisieren, wobei diese die Membran nach außen drücken. (4) Bei der Ausbildung von Filopodien werden verzweigte Netzwerke, die durch aktivierte Arp2/3-Komplexe gebildet wurden, in Richtung Membran verlängert. Dazu wird die Aktivität von CapZ durch PIP₂, V-1, CARMIL oder Ena/VASP inhibiert und die nun freien Filamentenden werden weiter polymerisiert. Dies führt zu längeren Filamenten, die z.B. durch Fascin quervernetzt oder gebündelt werden. (5) Bei der Bildung von Stressfasern und Actinkabeln wird die Nukleation durch Formine vermittelt, was zur Bildung von parallel orientierten, unverzweigten Filamentbündeln führt. Abbildung nach Wear & Cooper, 2004 [205], modifiziert.

In vielen Zellen konnte CP in der Membranperipherie lokalisiert werden (Wear & Cooper, 2004 [205]). Dort wirkt es bei der Ausbildung von Lamellipodien oder Filopodien mit,

indem es durch Cappen das Wachstum bestimmter Filamente inhibiert, während andere Filamente gerichtet weiterwachsen. Die Inhibierung von CP durch andere Proteine kann außerdem zu einem weiteren Wachstum zuvor gecappter Filamente führen (Abbildung 1.4).

CapZ spielt außerdem eine Rolle bei der Regulation von Natriumkanälen in Leukemia K562-Zellen, welche actininduziert inaktiviert werden. Durch die Zugabe von CapZ wird die Polymerisation von Actinfilamenten an der Plasmamembran inhibiert, was die induzierte Kanalaktivierung verhindert (Shumilina et al., 2003 [172]). CapZ hat allerdings keinen direkten Einfluß auf die Kanalaktivität.

1.2.3 Struktur

Die röntgenkristallografische Struktur von rekombinantem CapZ $\alpha_1\beta_1$ aus dem Huhn konnte von Yamashita et al. im Jahre 2003 aufgeklärt werden [213] und zeigt eine pseudozweifache Rotationssymmetrie des Heterodimers. Beide Untereinheiten haben extrem ähnliche Sekundär- und Tertiärstrukturen, obwohl deren Aminosäuresequenzen keine besonderen Ähnlichkeiten aufweisen (Abbildung 1.4 A und B). In der Proteinstrukturdatenbank *Brookhaven Protein Data Bank (PDB)* finden sich keine Proteine, deren Tertiär- und Quartärstrukturen denen des CapZs gleichen.

Die Struktur des CapZs ähnelt einem Pilz: der Stiel setzt sich aus den N-terminalen Regionen beider Untereinheiten zusammen, die in einem Sechs-Helix-Bündel organisiert sind (drei Helices von jeder Untereinheit, Abbildung 1.5 A und B). Der Hut enthält ein zehnstängiges antiparallel verlaufendes β -Faltblatt, wobei an der Bildung dieser Struktur jede Untereinheit mit je fünf Strängen beteiligt ist. Zwei α -Helices, gebildet von den C-terminalen Enden jeder Untereinheit, ragen aus der hutähnlichen Struktur heraus. Der C-Terminus der β -Untereinheit besteht aus einer amphipathischen α -Helix mit vierfachem Umgang, die aus dem Protein hervorsticht. Der C-Terminus der α -Untereinheit enthält ebenfalls eine α -Helix, die in der röntgenkristallographisch ermittelten Struktur über einen apparenten hydrophoben Kontakt auf der Oberfläche des Proteins aufliegt (Abbildung 1.5 A bis D). Ein Homologiemodell von CapZ aus Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), welches auf der Struktur vom Hühnchen-CapZ basiert, zeigt ähnliche Strukturen (Kim et al., 2004 [91]).

Eine Möglichkeit, den Funktionsmechanismus von CapZ zu erklären, stellt das „Tentakel-Modell“ dar (Abbildung 1.5 F). Die zweifache Rotationssymmetrie und die experimentell bestätigte Annahme, dass jedes CapZ-Molekül zwei Actinmonomere bindet, führt zu den folgenden Annahmen: (1) Die C-terminalen Bereiche beider Untereinheiten binden an Actin, und (2) diese Bereiche sind in Lösung flexibel und mobil, sodass sie wie Tentakel die Plusenden des Actinfilaments „einfangen“ und festhalten. Das Tentakel-Modell wurde in

Struktur-Funktionsanalysen mit bakteriell exprimierten mutierten Proteinen untersucht (Kim et al., 2004 [91]; Wear et al., 2003 [204]). Auf der Basis von F-Actin-Bindungsassays bestätigte sich, dass die C-terminalen Regionen (ca. 30 Aminosäuren) beider Untereinheiten für die vollständige Actinbindung notwendig sind und dass die Entfernung der beiden Tentakel zu einem kompletten Verlust der Bindungsaktivität führt.

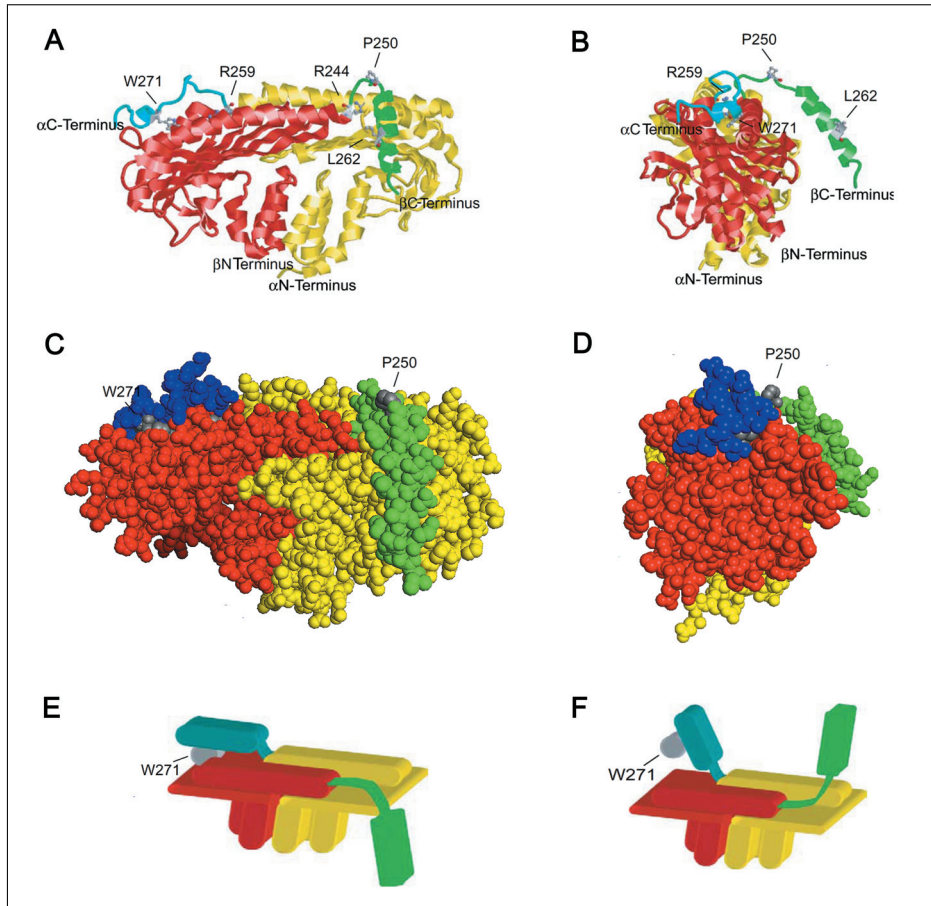


Abbildung 1.5: Dreidimensionale Struktur von CapZ. (A) bis (D) Röntgenkristallstruktur von Huhn-CapZ $\alpha_1\beta_1$. Die α -Untereinheit (gelb) mit dem C-terminalen Tentakel (blau, Arg259-Ala286) und die β -Untereinheit mit dem C-terminalen Tentakel (grün, Arg244-Asn277) sind mit den Positionen von verschiedenen wichtigen strukturellen Bindungen und in Mutationsstudien veränderten Aminosäuren gezeigt (grau, Kugel-Stab-Ansicht). In (B) und (D) wurde die Struktur um 90° in die Papierebene gedreht, um die Position des β -C-Terminus in Relation zum Gesamtprotein zu zeigen. (A) und (B) „ribbon“- (C) und (D) „spacefill“-Darstellung. (E) und (F) zeigen schematische Ansichten des Heterodimers, wobei (E) den röntgenkristallographischen Daten und (F) der vorhergesagten Struktur nach dem Tentakel-Modell entspricht. Die beiden N-Termini stehen in (F) nach außen vom Körper des Proteins ab und könnten so durch Bindung an F-Actin die Capping-Aktivität gewährleisten. Nach Wear & Cooper, 2004 [205], modifiziert. (A) bis (D) wurden mit PyMol und dem Koordinatensatz 1IZN.pdb erstellt.

Der Verlust der 28 C-terminalen Aminosäuren der α -Untereinheit führt zu einer 5.000fach reduzierten Capping-Aktivität, der Verlust der C-terminalen 34 Aminosäuren der β -

Untereinheit reduzierte die Capping-Aktivität um den Faktor 300. Werden einzelne konservierte Aminosäuren in diesen Bereichen ausgetauscht, verringert sich die Aktivität des CapZ zwischen 10 und 150fach (Kim et al., 2004 [91]; Wear et al., 2003 [204]). Exprimiert man diese 28 bzw. 34 funktionellen Aminosäuren als GST-Fusionsproteine in Bakterien, so zeigen diese geringe Capping-Aktivitäten, die vergleichbar denen von Deletionsmutanten sind.

Die hydrophoben Seiten der amphiphatischen α -Helices kommen als mögliche Actinbindestellen in Frage (Wear et al., 2004 [205], Wear & Cooper, 2004 [206]), da ähnliche Strukturen auch in anderen Proteinen wie Gelsolin und Vitamin-D-Bindeprotein die Actin-Bindung vermitteln (McLaughlin et al., 1993; Otterbein et al., 2002 [129]). Diese hydrophoben Reste sind in allen heterodimeren Capping Proteinen hochkonserviert.

1.2.4 Regulation

1.2.4.1 Direkte Regulation

Verschiedene Moleküle haben einen Einfluss auf die Capping-Aktivität von CapZ; dies kann durch direktes Binden dieser Moleküle an CapZ oder durch die Bindung an die Actinfilamentenden unter Verdrängung von CapZ geschehen. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂), V-1 und CARMIL binden direkt an CapZ und inhibieren die Bindung an F-Actin.

PIP₂ inhibiert CapZ *in vitro* schnell und reversibel, wobei das Protein die Filamentenden verlässt und die Filamente depolymerisieren (Cooper et al., 1999 [37]).

V-1 (Myotrophin), ein kleines 12kDa-Protein, das eine potentielle Rolle bei der Neuronalentwicklung spielt, bindet CapZ *in vitro* mit einer moderaten Affinität ($K_{Diss.} = 0,12 \mu\text{M}$) und einer Stöchiometrie von 1:1 (Taoka et al., 2003 [191]). Es inhibiert die Interaktion von CapZ mit F-Actin in Abhängigkeit von der V-1-Dosis *in vitro*, wobei der Beweis einer Interaktion *in vivo* noch aussteht (Modell in Abbildung 1.4 (4)).

CARMIL-Proteine wurden in allen Metazoen gefunden, bestehen aus ca. 1050-1450 Aminosäuren und binden u.a. CapZ, Arp2/3 und Myosin I (Jung et al., 2001 [85]). Die molare Stöchiometrie von CapZ:CARMIL ist 1:1 und die zellulären Konzentrationen beider Proteine von $1 \mu\text{M}$ weisen auf eine Komplexbildung *in vivo* hin (Remmert et al., 2004 [151]). Interessanterweise bindet es sowohl ein Capping Protein, als auch einen Nukleator (Arp2/3) und einen Motor (Myosin I). Durch die Bindung von CARMIL (aus *Acanthamoeba*) an CapZ verlässt dieses die Actinfilamentenden und ist nicht mehr in der Lage, F-Actin zu binden (Modell in Abbildung 1.4 (4)) (Urano et al., 2006 [194]).

CapZIP (CapZ interacting protein) wurde erst kürzlich als CapZ-bindendes Protein identifiziert (Eyers et al., 2005 [51]). Es wurde in Immun- und Muskelzellen als Substrat sog.

stressaktivierter Proteinkinasen (SAPKs) identifiziert. Wird CapZIP z.B. durch SAPK4/p38 δ oder andere Kinasen an Serin-108 phosphoryliert, so dissoziiert es von CapZ. Welche Rolle die Interaktion von CapZIP mit CapZ *in vivo* spielt, ist noch nicht geklärt.

CKIP-1, ein Protein, das Domänenhomologien zu Pleckstrin aufweist, bindet ebenfalls an CapZ *in vitro* (Canton et al., 2005 [22]). Es ist in die Regulation der Zellmorphologie und des Actincytoskeletts involviert und inhibiert in Verbindung mit der Proteinkinase CK2 die Aktivität von CapZ am Plusende von Actinfilamenten. Außerdem findet eine Phosphorylierung der CapZ α -Untereinheit an Ser9 durch CK2 *in vitro* statt. Diese Phosphorylierungsform der CapZ α -Untereinheit wurde auch *in vivo* nachgewiesen, allerdings ist die Funktion dieser Modifikation noch nicht geklärt.

1.2.4.2 Indirekte Regulation

CapZ kann auch indirekt über andere Proteine reguliert werden, welche die Plusenden von Actinfilamenten besetzen (Abbildung 1.4 (5)). Eine der ersten Studien zur indirekten Regulation beschreibt einen Mechanismus, bei dem GTP γ S-aktiviertes Cdc42 die Polymerisation von CapZ-gecappten Actinfilamenten induziert (Huang et al., 1999 [79]). Die physiologische Relevanz dieser Interaktion ist noch nicht geklärt, jedoch scheinen im Allgemeinen Proteine der Formin-Superfamilie bei dieser Art der Regulation eine große Rolle zu spielen. Formine sind große, autoinhibitorische (Li et al., 2003 [106]) Multidomänenproteine, die durch die Formin-Homologiedomänen FH1 und FH2 charakterisiert sind (Wallar et al., 2003 [203], Evangelista et al., 2003 [50]; Pollard, 2004 [142]). Sie haben nukleationsfördernde Eigenschaften und polymerisieren Actinfilamente von Monomeren zu einzelnen unverzweigten Filamenten, die an ihren Plus- und Minusenden wachsen (Pruyene et al., 2002 [146]; Sagot et al., 2002 [157]), indem sie Actindimere und -trimere stabilisieren (Pring et al., 2003 [145]).

1.3 Glattmuskeln und Glattmuskelzellen

Die Glattmuskulatur stellt ein Gewebe dar, das in fast jedem Organ des Körpers zu finden ist. Es ist die Hauptkomponente der Wände von Hohlorganen wie der Gallenblase, des Dickdarms, des Magens, der Plazenta, der Aorta, der Capsula von Milz, Nieren und Hoden usw.. Einige Glattmuskeln haben die Form von Kordeln oder Bändern, die normalerweise eine strikte Ausrichtung haben und in denen die Glattmuskelzellen annähernd parallel zur Längsachse ausgerichtet sind. Einige Beispiele sind der *Taenia* des Darms, der *Expansor secundariorum* des Vogelflügels oder Muskeln des Peritoneums. Meistens liegt die Glattmuskulatur jedoch in flächiger Form vor, wobei mehrere Lagen dieser Flächen

die Wände der Hohlorgane auskleiden.

Glattmuskelzellen (smooth muscle cells, „SMCs“) stellen eine recht ursprüngliche Form von Muskelzellen dar. Die prinzipielle Funktion dieser Zellen ist die Kontraktion. Die Größe von SMCs ist im Vergleich zu vielen anderen Zelltypen sehr gering. Zellen des *taenia coli* aus dem Meerschweinchen besitzen beispielsweise ein Zellvolumen von nur ca. $3500 \mu\text{m}^3$ und darunter, wobei die Zellgrößen zwischen verschiedenen tierischen Spezies nicht sonderlich differieren. Im Relation zu den geringen Zellvolumina ist die Zelloberfläche mit ca. $5000 \mu\text{m}^2$ sehr groß. Das Verhältnis von Volumen zur Oberfläche entspricht dem von humanen Erythrozyten (Linderkamp & Meiselmann, 1982 [107]). Es wurde errechnet, dass 1 Gramm *taenia coli* annähernd 1 m^2 Zellmembranen enthält. Ein Grund für die große Membranoberfläche ist die Ausbildung von Caveolae, flaschenförmigen Einstülpungen der Membran. Ihre Dichte liegt bei 20 - 35 pro μm^2 und sie liegen in bänderförmigen Bereichen orientiert vor. Zwischen diesen Caveolae liegen sog. *dense bands* bzw. *dense plaques* auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Diese sind 30 - 40 nm dick und auf ihrer inneren Oberfläche von Bündeln aus Actin- und Intermediärfilamenten durchdrungen. Mindestens die Hälfte der Plasmamembranoberfläche wird von diesen *dense plaques* eingenommen. Ihren Namen verdanken sie ihrem sehr dunklen Erscheinungsbild in der Lichtmikroskopie.

Eine andere Besonderheit der Zellmembran stellen spezialisierte Zellverbindungen dar, wovon zwei bisher recht gut verstanden sind: die „gap junctions“ oder „Nexi“ und die „attachment plaques“. Erstere bestehen aus Connexonen, die über die Bildung eines hydrophoben Kanals die Cytoplasmen zweier Glattmuskelzellen verbinden, die zweitgenannten kuppeln zwei benachbarte Zellen in Bereichen der *dense bands* über eine extrazellulären 40 - 60 nm breiten Spalte mechanisch zusammen.

Des Weiteren besitzen Glattmuskelzellen eine hohe cytoplasmatische Volumenfraktion an Myofilamenten (Mosse et al., 1985, 1986 [122] [121]), eine geringe Proliferationsrate (Campbell et al., 1988 [20]) und synthetisieren nur geringe Mengen von Matrixproteinen (Ang et al., 1990 [4]; Merrilees et al., 1990 [117]). Werden SMCs in Monozellkultur gehalten, so verändert sich deren Phenotyp und die cytoskeletale Proteinzusammensetzung im Vergleich zu „nativen“ Zellen dramatisch: Nach wenigen Tagen dedifferenzieren diese Zellen unter Verlust großer Teile ihres kontraktile Apparats zu Fibroblasten, flachen ab und verlieren generell filamentöses Material, welches durch Cisternen des rauhen ER, freie Ribosomen und Teile des Golgi-Apparats ersetzt wird (Chamley-Campbell et al., 1979 [33]; Chamley et al., 1975 [31]; Chamley et al., 1977 [32], Palmberg & Zhyberg, 1986 [131]; Campbell & Campbell 1987 [19]; etc.) Allerdings kann durch Ko-Kultur mit einer konfluenten Einzelschicht aus Endothelzellen die spontane Phänotypveränderung von SMCs verzögert werden (Chamley et al., 1974 [30]; Chamley-Campbell & Campbell 1981 [34]). Ein möglicher Grund ist die Sezernierung eines Heparin-ähnlichen Glycosaminoglykans

mit einer Molekularmasse von 12 kDa durch die Endothelzellen, welches die beobachtete Veränderung des Phänotyps von Glattmuskelzellen inhibiert (Chamley-Campbell & Campbell, 1981 [34]; Campbell & Campbell, 1984 [21]).

1.3.1 Kontraktion und deren Regulation

Die Kontraktion von Glattmuskelzellen beruht im Wesentlichen auf den gleichen molekularen Mechanismen wie die von Skelettmuskelzellen. SMCs enthalten einen kontraktilem Apparat, dessen Funktionalität auf einer Actin-Myosin-Interaktion beruht, sich aber strukturell und z.T. auch funktionell von dem der Skelettmuskelzellen unterscheidet. Auf ultrastrukturellem Level zeigen Glattmuskelzellen nicht die hochgeordnete, sarkomerische Struktur, die namensgebend für die quergestreifte Muskulatur ist. Small et al. konnten 1998 zeigen, dass Glattmuskelzellen zwei verschiedene Actinkompartimente enthalten, die in der Zelle überwiegend kolokalisieren (Small & Gimona 1998 [179]). Bei diesen handelt es sich um kontraktile und cytoskeletale Elemente, die jeweils eine eigene Zusammensetzung von Actinen und ABPs besitzen (North et al., 1994 [125]; Small et al., 1995 [176]; Small & Gimona, 1998 [179]). Beide können mit den heute zur Verfügung stehenden ultrastrukturellen Techniken morphologisch kaum unterschieden werden. Die kontraktile Elemente enthalten vor allem Glattmuskel-Actin und Glattmuskel-Myosin, der cytoskeletale Apparat hingegen Nichtmuskel- β -Actin und Intermediärfilamente (North et al., 1994 a und b [124] [125]; Small, 1995 [176]).

Die Kontraktion von Glattmuskelzellen wird hauptsächlich durch die Phosphorylierung von Myosin durch die Ca^{2+} -aktivierte Calmodulin-MLC-Kinase reguliert, es sind jedoch weitere Mechanismen über die Regulation durch Caldesmon und Calponin bekannt (Sobue et al., 1981 [181]; Frid et al., 1992 [55]; Takahashi et al., 1986 [189]; Gimona et al., 1990 [61]). Außerdem wird ein Mechanismus angenommen, der über die Regulation der dünnen Filamente eine Feinabstimmung der Kontraktion bewirkt. Dünne Glattmuskelfilamente enthalten kein Troponin, allerdings wurden dort verschiedene Glattmuskel-Tropomyosine nachgewiesen.

1.3.2 Cytoskelett

Das Cytoskelett von Glattmuskelzellen enthält zwei Hauptkomponenten: (1) ein Komplement aus Actinfilamenten, das die cytoplasmatischen *dense bodies* in gleichmäßigen Intervallen durch longitudinal verlaufende Fibrillen verbindet, und (2) ein Netzwerk von Intermediärfilamenten (bestehend aus Desmin bzw. Filamin), das mit cytoskeletalem Actin kolokalisiert ist (Abbildung 1.6). Die Actinfilamente des kontraktilem Apparates sind

mutmaßlich über cytoplasmatische *dense bodies* mit dem Cytoskelett und über longitudinal verlaufende, rippenartige Anordnungen von *dense plaques* mit dem Membranskelett verbunden, welches mit der extrazellulären Matrix in Verbindung steht (Small & Gimona 1998 [179]).

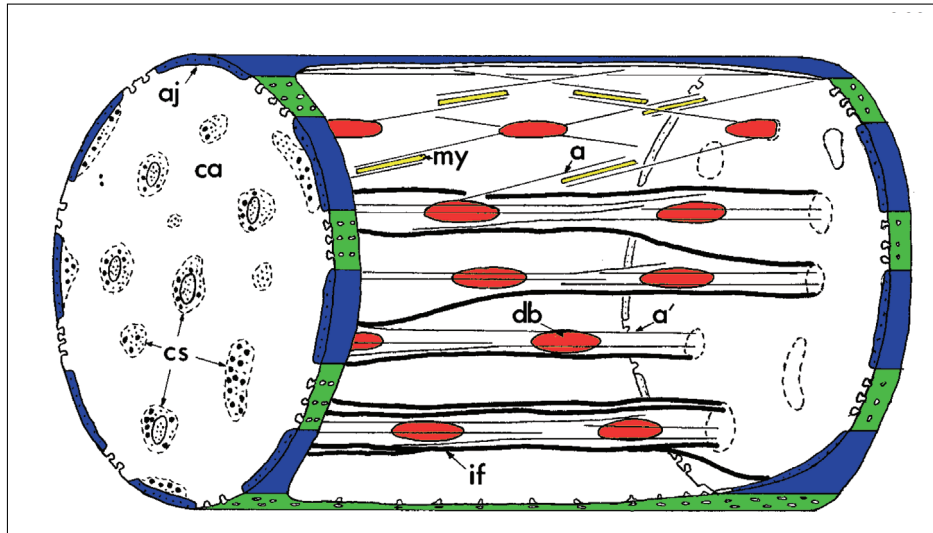


Abbildung 1.6: Das Cytoskelett der Glattmuskelzelle. Im Querschnitt sind nur Komponenten des Cytoskeletts eingezeichnet. Große Punkte repräsentieren Intermediärfilamente und kleine Punkte Filamente von cytoplasmatischem β -Actin. *Dense bodies* sind mit einer durchgezogenen Linie, Cytoskelett-domänen mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. An der Zellmembran wechseln *adherens junctions* (blau), die cytoskeletales Actin enthalten, mit Caveolae-reichen Domänen (grün) ab. Im Längsschnitt umschließen die Intermediärfilamente (dicke Linien, if) Kanäle, die *dense bodies* und cytoplasmatisches β -Actin enthalten (dünne Linien, a'). Die cytoplasmatischen β -Actinfilamente führen durch die *dense bodies* hindurch, während die Actinfilamente des kontraktiven Apparats Verankerungspunkte auf den *dense bodies* und an der Peripherie der *adherens junctions* zu haben scheinen. ca, Regionen mit kontraktile Elementen; cs, Cytoskelett; my, Myosinfilamente (gelb). Schematische Darstellung nach North et al., 1994 [124], modifiziert.

Dense bodies sind ovale, elektronendichte Strukturen mit einem Durchmesser von rund 100 nm, die relativ homogen in der Zelle verteilt sind (Draeger et al., 1990 [46]; Fay et al., 1983 [52]; Small, 1985 [175]). Eine einzelne Glattmuskelzelle besitzt ca. 3000 *dense bodies* (Draeger et al., 1989 [47]). In ihnen ist α -Actinin lokalisiert (Small et al., 1992 [178]), so wie die β -Actin-Isoform. Daher werden sie zur Cytoskelett-Domäne der Glattmuskulatur gezählt (Bagby, 1983 [7]). Sie liegen neben den Intermediärfilamenten vor und sind longitudinal durch das cytoplasmatische Actin in einem Abstand von ca. 2 μ m verbunden (North et al., 1994 [124]). *Dense plaques* vermitteln vermutlich die Bindung des Membranskeletts an die Membran und die extrazelluläre Matrix. Sie enthalten u.a. Vinculin (Small 1985 [175], Talin (Burrige & Conell 1983 [17]; Volberg et al., 1986 [201]), Metavinculin (Geiger, 1985 [56], Siciliano & Craig 1982 [173]) und extrazelluläres Fibronectin (Kurusu et al., 1987 [100]).

SMCs enthalten typischerweise eine Mischung von Glattmuskel- (α - und γ -) und Nichtmuskelactin (β - und γ -Actin). Der Gehalt der einzelnen Actine ist vom jeweiligen partiellen Muskeltyp abhängig, wobei die cytoplasmatischen Actine einen Anteil von 10% - 30% am Gesamtactinkomplement besitzen. Da Actinfilamente eine Polarität besitzen, wurden diese zur Untersuchung ihrer Orientierung in SMCs von Bond & Somlyo 1982 mit dem Myosin-Fragment S-1 dekoriert. Das daraus resultierende Pfeilspitzenmuster zeigte, dass sie mit ihren Plus-Enden in Richtung *dense bodies* und *dense plaques* verlaufen (Bond & Somlyo 1982 [13], Tsukita et al., 1983 [192]).

Im Glattmuskel des Hühnermagens wurde eine relativ einfache Actin-Isoformverteilung gefunden: α -Glattmuskelactin wurde dort nicht nachgewiesen und der Gehalt von cytoplasmatischen γ -Actin war äußerst gering (Vanderkerckhove & Weber, 1978 [197]). Die dominierenden Isoformen sind γ -Glattmuskel- und β -Nichtmuskelactin, deren Sequenzunterschiede hauptsächlich in sieben Substitutionen der 16 N-terminalen Aminosäuren liegen (Vanderkerckhove & Weber, 1981 [198]).

Cytoplasmatisches β -Actin ist in *dense bodies*, *dense plaques* und in Kanälen, die kongruent mit Bereichen von Intermediärfilamenten vorliegen, lokalisiert (North et al., 1994 [124]). Allgemein stimmt die Lokalisation mit der von Filamin überein, mit der Ausnahme, dass Filamin nicht in *dense bodies* lokalisiert ist (Small et al., 1986 [177]). In diesen Strukturen ist Actin mit α -Actinin quervernetzt. Im *taenia coli* aus dem Meerschweinchen wurde β -Actin zusammen mit Desmin in cytoplasmatischen Fibrillen nachgewiesen. Glattmuskel- γ -Actin konnten in cytoplasmatischen *dense bodies* nicht nachgewiesen werden, ist aber ansonsten in der gesamten Zelle in longitudinalen Filamenten präsent. Lehman et al. konnten 1987 zwei verschiedene Typen von dünnen Filamenten aus Hühnermägen isolieren, deren Proteinzusammensetzung in Hinblick auf Proteine (z.B. Filamin und Caldesmon) variierte, die den Intermediärfilamentensystem zugeordnet werden ([105]). Auch diese Erkenntnisse deuten auf die Trennung des Cytoskeletts in zwei verschiedene Systeme hin.

1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der biochemischen Charakterisierung und Lokalisation von CapZ-Isoformen. CapZ ist als heterodimeres F-Actin Capping Protein in allen eukaryontischen Zellen vertreten. In den meisten Zellen höherer Vertebraten werden zudem verschiedene Isoformen in distinkter Weise exprimiert. Um der Frage nachzugehen, ob und inwieweit sich diese Isoformen hinsichtlich ihrer Aktivität unterscheiden, wurden die Untereinheiten α_1 , α_2 , β_1 und β_2 getrennt in *E. coli* exprimiert. Vergleichende biochemische Untersuchungen zwischen nativen und rekombinanten Heterodimeren sollten klären, ob die Renaturierung erfolgreich war. Anschließend wurden Untersuchungen zur differentiellen Actin-Bindung der Heterodimere bzw. der einzelnen Untereinheiten mit unterschiedlichen Isoformzusammensetzungen durchgeführt, um der Frage nach der Funktionalität der Isoformen und der einzelnen Untereinheiten nachzugehen. Außerdem sollte überprüft werden, ob CapZ-Isoformen in differenter Weise mit verschiedenen Actinen aus Glatt- und Skelettmuskulatur interagieren.

Des Weiteren sollten die Actinbindestellen der Heterodimere und der einzelnen Untereinheiten hinsichtlich ihrer Interaktion mit G- und F-Actin durch Kosedimentations- und Quervernetzungsversuche charakterisiert werden.

Da nativ isolierte CapZ-Heterodimere meist ein Gemisch mit distinkten Anteilen verschiedener Isoformen beinhalten, sollte mit einem speziellen Renaturierungsansatz überprüft werden, in welcher Isoformzusammensetzung sich rekombinante Heterodimere *in vitro* rückfalten, wenn man den jeweiligen Untereinheiten verschiedene Rückfaltungspartner anbietet.

Die Interaktion von heterodimeren Capping Proteinen mit α -Actinin sollte hinsichtlich der Beteiligung verschiedener CapZ-Isoformen überprüft werden. Außerdem sollte untersucht werden, an welche CapZ-Untereinheiten das α -Actinin bindet.

Die Lokalisation von CapZ und der CapZ β_2 -Untereinheit in myogenen C₂C₁₂- und Glattmuskulenzellen sowie die Kolokalisation mit Vinculin, α -Actinin und β -Actin sollte Aufschluß über eine mögliche CapZ-isoformspezifische Verteilung dieser Proteine in den genannten Zellen geben. Die Lokalisation von CapZ und der CapZ β_2 -Isoform in Glattmuskulenzellen war dabei von besonderer Bedeutung, sollte sie doch zusätzliche Hinweise auf die Existenz zweier actinhaltiger Cytoskelettsysteme in diesen Zellen geben. Zur Überprüfung einer möglichen α -Actinin - CapZ - Interaktion *in vivo* und der Beteiligung von CapZ beim Vorantrieb des Leitsaums von Fibroblasten wurden immunocytochemische Lokalisationsstudien an C₂C₁₂-Zellen durchgeführt. Dabei sollte auch eine mögliche isoformspezifische Beteiligung von CapZ an diesen Prozessen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Gewebe

- Meerschweinchen: Zoohandel
- Milz, Skelett- und Glattmuskel vom Hausschwein (*sus scrofa*): Schlachthof Gausepohl, Harsewinkel

2.1.2 C₂C₁₂-Zellen

Die myogene C₂C₁₂-Zelllinie wurde freundlicherweise von der AG Biochemische Zellbiologie zur Verfügung gestellt. Sie ist ein Subklon der C₂-Linie, die von Yaffe und Saxel im Jahre 1977 [212] aus Zellen der Oberschenkelmuskulatur einer C3H-Maus gewonnen wurde. Diese Zellen sind einkernige Skelettmuskelvorläuferzellen, welche unter geeigneten Bedingungen zu syncytialen Myotuben differenzieren, die kontraktionsfähig sind.

2.1.3 Enzyme und Proteine

Enzym/Protein	Hersteller
Alkalische Phosphatase (aus dem Kalbsdarm)	Roche
Expand Reverse Transcriptase	Roche
T4-Ligase	Roche
RNase-Inhibitor	Roche
Taq DNA Polymerase	Roche
Expand High Fidelity PCR System	Roche
Restriktionsendonukleasen	Roche

2.1.4 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitslösung
Ampicillin	200 mg/ml in H ₂ O	100-200 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O	25 µg/ml
Chloramphenicol	12,5 mg/ml in Methanol	12,5 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml

2.1.5 *E. coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
XL10-Gold	<i>RecA1, EndA1, GyrA96, Thi1, HsdR17, SupE44, RelA1, Lac[F'proABlacI^qZΔM15 Tn10(TeT^r)]</i>	Sambrock et al. 1989 [158]
M15[pRep4]	<i>Nal^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁻</i>	Villarejo et al. 1974 [199]
SG13009[pRep4]	<i>Nal^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁻</i>	Gottesman et al. 1981 [63]
Bl21(DE3)CodonPlus RIPL	<i>B, F⁻, ompT, hsdS(f_B⁻m_B⁻) dcm⁺, Tet^r, galλ(DE3) endA, Hte[argU, proL, Cam^r] [argU, ileY, leuW, Strep/Spec^r]</i>	Jerpseth et al. 1998 [83]

2.1.6 Plasmide und Vektoren

Vektor/Plasmid	Art des Vektors/Plasmids	Hersteller/Quelle
pET-3d	Expressionsvektor	Novagen
pQE60	Expressionsvektor	Qiagen
pRep4	Repressorplamid	Qiagen
pPCR-Script Amp SK(+)	Klonierungsvektor	Stratagene
pUC18	Kontrollplasmid	Stratagene

2.1.7 Verwendete Kits

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
High Pure RNA Tissue Kit	Reinigung von Gesamt-RNA	Roche
Oligotex mRNA Mini Kit	Aufreinigung von mRNA	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Qiagen
PCR-Script SK(+) Amp Cloning Kit	Zwischenklonierung von PCR-Produkten	Stratagene
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmidpräparation	Qiagen
MinElute Gel Extraction Kit	Extraktion von DNA aus Gelen	Qiagen
OneStep RT-PCR Kit	Umschreiben von RNA in DNA	Qiagen
Silberfärbungskit	Silberfärbung von PAA-Gelen	Roth

2.1.8 Protein-Molekularmassenstandards

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Molekularmassenstandards verwendet. Der sog. HMW (*high molecular weight*) wurde von der Firma Sigma bezogen und deckte einen Bereich von 29 kDa bis 205 kDa ab.

Der andere Marker wurde aus gereinigten, laboreigenen Proteinen zusammengesetzt und enthielt folgende Proteine: CapZ α_1 - Untereinheit (36 kDa), Actin (42 kDa), Rinderse-
rumalbumin (BSA, 67 kDa), Gelsolin (81 kDa), α -Actinin (100 kDa), Vinculin (117 kDa),
Metavinculin (125 kDa), die schwere Kette des Myosins (MHC, 205 kDa) und Filamin
(280 kDa).

2.1.9 DNA-Längenstandards

Als DNA-Längenstandard wurde die 100bp-DNA-Leiter (Extended 100bp-DNA-Ladder) der Firma Roth verwendet.

2.1.10 Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der Tabelle angegebenen Oligonukleotide verwendet. Die Sequenzen wurden, mit Ausnahme der Oligo-dT₁₅-Oligonukleotide und der Random-Hexamere, anhand von Homologien in cDNA-Sequenzen der CapZ-Untereinheiten verschiedener Mammalia erstellt und die Oligonukleotide von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

2 Material und Methoden

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Annealingtemp.	Linker
CapZ α_1 -fw	ACC ATG GCC GAC TTC GAG	59,0°C	NcoI
CapZ α_1 -rev	GGT GAA GCT TAA GCA TTC TGC ATT TCT TTG	65,0°C	HindIII
CapZ α_2 -fw	ATT ACC ATG GCG GAT TTG GAA GAG	56,0°C	NcoI
CapZ α_2 -rev	TTA AAG ATC TAA AAT GAT CCG GTC ATG CATT	56,0°C	BglII
CapZ β_1 -fw	ACC ATG GGC GAT CAG CAG CT	61,4°C	NcoI
CapZ β_1 -rev	AAG CTT TTA GTT ATC AGG CTG GAT GTA GAT C	64,0°C	HindIII
CapZ β_2 -fw	GCC ATG GGT GAC CAG CAG CT	63,5°C	NcoI
CapZ β_2 -rev	TAT AAA GCT TGT GGG AAG CAG AGG CTT TTA	64,0°C	HindIII
Oligo-dT ₁₅	Oligo(dT ₁₅)	-	-
Random-Hex	Oligo(dN ₆)	-	-

2.1.11 Plastik- und Glasartikel für die Zellkultur

Alle in der Zellkultur verwendeten Plastik- und Glasartikel wurden steril bezogen bzw. vor Gebrauch durch Autoklavieren, Hitzesterilisation oder UV-Bestrahlung ü/N sterilisiert.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Herstellung von Muskel-Acetonpulver nach Spudich und Watt [184], modifiziert

Für die Präparation wurde schlachtfrisches Skelettmuskelgewebe des Schweines verwendet. Ca. 1kg Muskel wurde von Fett und Sehnen befreit, kleingeschnitten und im Fleischwolf weiter zerkleinert. Das entstandene Hack wurde mit 3 Vol. kaltem Myosinextraktionspuffer (300 mM KCl, 3 mM ATP, 15 mM EDTA, 150 mM Phosphatpuffer, pH 6.5) versetzt und 10 min im Kühlraum bei 4°C gerührt. Der Muskelbrei wurde anschließend für 40 min bei 5.000g (GS-3, Sorvall) zentrifugiert, das Pellet erneut in 2 Vol. Extraktionspuffer resuspendiert, homogenisiert und nochmals für 20 min bei 5.000g zentrifugiert. Die Pellets

wurden in 8 Vol. deionisiertem H₂O resuspendiert, 5 min im Kühlraum gerührt und durch Gaze gefiltert. Der Rückstand wurde in 8 Vol. 0,4% NaHCO₃ aufgenommen, 15 min im Kühlraum gerührt und durch Gaze gefiltert. Der Rückstand wurde erneut in 8 Vol. 0,4% NaHCO₃ aufgenommen, 5 min gerührt und durch Gaze gefiltert. Zum weiteren Einengen wurde der Rückstand 5 min bei 5.000g (GS-3, Sorvall) zentrifugiert. Diese Schritte wurden einmal mit 8 Vol H₂O und zweimal mit je 4 Vol. Aceton wiederholt. Der letzte verbliebene Rückstand wurde manuell zerkleinert und in 5 Vol. Aceton p.a. aufgenommen, 10 min gerührt und durch Gaze gefiltert. Das Acetonpulver wurde zur Trocknung ü/N auf Filterpapier bei RT unter den Laborabzug gelegt und dann bis zur Verwendung bei -30°C gelagert.

2.2.2 Aufreinigung von Actin aus der Skelettmuskulatur des Schweins

Actin aus der Skelettmuskulatur des Schweins wurde nach der Methode von Spudich und Watt (1971) aus Aceton-getrocknetem Muskelpulver hergestellt. Ca. 4 g Acetonpulver wurden mit 50 Vol. 5xG-Puffer versetzt und bei 2°C unter Rühren für 40 min extrahiert. Der Muskelbrei wurde 1 h im 45.94-Rotor bei 35.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckmann UZ), der Überstand mit 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die KCl-Konzentration auf 600 mM erhöht und die Lösung sofort für 3 h bei 35.000 rpm und 20°C zentrifugiert. Die entstandenen Sedimente wurden in wenig 5xG-Puffer aufgenommen, mit einem Dounce-Homogenisator resuspendiert und 2 Tage bei 2°C gegen 20 Vol. 5xG-Puffer unter mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert. Das Dialysat wurde für 1 h bei 35.000 rpm klarzentrifugiert und auf eine G-150 Gel-filtrationssäule, welche zuvor mit 2xG-Puffer äquilibriert wurde, appliziert. Die G-Actin enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, durch Ultrafiltration auf ca. 5 mg/ml ankonzentriert (Amicon Rührzelle) und auf Eis gelagert. Das so gewonnene Actin wurde innerhalb von 2 Wochen verwendet.

Pyren-Actin wurde nach dem Verfahren von Kouyama und Mihashi [96] mit N-(1-pyrenyl) Iodoacetamid markiert, lyophilisiert und bei -80°C gelagert. Es wurde mir freundlicherweise von der AG Biochemische Zellbiologie zur Verfügung gestellt. Vor der Verwendung wurde das Pyren-Actin in 2xG-Puffer aufgenommen und im Rotor 80.4 bei 40.000 rpm klarzentrifugiert.

2.2.3 Aufreinigung von Actin aus der Glattmuskulatur des Schweins

Actin aus der glatten Muskulatur des Schweinemagens wurde aus Aceton-getrockneten Muskelpulver isoliert. Die Herstellung des Glattmuskel-Pulvers erfolgte nach der Methode von Spudich und Watt, 1971 (s. 2.2.1).

4 g Pulver wurden mit 50 Vol. kaltem 5xG-Puffer versetzt, mit einem Ultraturrax homogenisiert und für 1 h bei 2°C unter Rühren extrahiert. Der Muskelbrei wurde im Rotor 45.94 für 2 h bei 2°C und 37.000 rpm zentrifugiert, der Überstand auf ca. 30 ml ankonzentriert und erneut für 2 h bei 2°C und 37.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 2x-G-Puffer äquilibrierte G-150-Gelfiltrationssäule appliziert und die G-Actin-haltigen Fraktionen (10ml) durch SDS-PAGE identifiziert. G-Actin-haltige Fraktionen wurden vereinigt, auf 40 ml ankonzentriert (Amicon Rührzelle), mit 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ und 5 mM EGTA versetzt und für 2 h bei RT inkubiert. Die Lösung wurde für 3 h bei 37.000 rpm und 2°C zentrifugiert, die Sedimente in wenig 5x-G-Puffer aufgenommen und mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Die Actin-Lösung wurde für 2 Tage bei 2°C gegen 20 Vol. 5x-G-Puffer dialysiert und für 2 h bei 37.000 rpm klarzentrifugiert. Der Actin-haltige Überstand wurde auf Eis gelagert und innerhalb von 2 Wochen verwendet.

2.2.4 Aufreinigung von α -Actinin aus der Glattmuskulatur des Schweins

Die Aufreinigung von α -Actinin aus der glatten Muskulatur des Schweinemagens wurde nach der Methode von Feramisco und Burrige [54] durchgeführt. Das gereinigte α -Actinin wurde aliquotiert und lyophilisiert bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Immunblotanalytische Untersuchungen des präparierten Proteins auf eine Kontamination durch Actin ergaben keinen detektierbaren Actin-Gehalt.

2.2.5 Aufreinigung von CapZ aus Muskel-Acetonpulver der Skelettmuskulatur des Schweins nach Remmert (1999), modifiziert

50g Acetonpulver wurden mit 20 Vol. kaltem G-Puffer (0,2 mM ATP, 0,2 mM CaCl₂, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM NaN₃, 2 mM Tris pH 8,0, Proteaseinhibitorenmix (0,1 μ M Pepstatin A, 0,1 μ M Leupeptin, 0,1 mM Benzamidin und 0,1 mM PMSF)) im Kühlraum für 1 h unter Rühren extrahiert und 10 min bei +4°C bei 4.200g zentrifugiert (Ausschwingrotor, Beckmann Kühlzentrifuge). Das Pellet wurde in G-Puffer aufgenommen, nochmals für 15 min unter Rühren im Kühlraum extrahiert und zentrifugiert. Es folgten 3 Extraktionsschritte unter Rühren bei 2°C mit KCl-Puffer (1 M KCl, 0,1 mM EGTA, Proteaseinhibitorenmix) im Kühlraum (1 h, zweimal 30 min) mit anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4.200g (Ausschwingrotor, Beckmann Kühlzentrifuge, 2°C). Das letzte Pellet wurde in 15 Vol. KJ-Extraktionspuffer (600 mM KJ, 5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM NaN₃, 20 mM Na₂S₂O₃, Proteaseinhibitorenmix) resuspendiert, mit dem UltraTurrax zweimal je 1 min mit voller Leistung auf Eis homogenisiert und im

Kühlraum 30 min unter Rühren extrahiert. Zusätzlich wurde das Homogenat alle 5 min für je 1 min mit dem UltraTurrax auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 min bei 15.000rpm bei +2°C zentrifugiert (R16, Beckmann UZ), der Überstand auf Eis gelagert und das Pellet erneut mit 7,5 Vol. KJ-Extraktionspuffer homogenisiert. Das Vorgehen bei dieser Extraktion folgte analog zur ersten Extraktion. Der Überstand nach der letzten Zentrifugation wurde mit dem ersten vereinigt, 4 h gegen 4 Vol. kaltes, deionisiertes H₂O im Kühlraum dialysiert und anschließend ü/N gegen 4 Vol. Säulenpuffer A (50 mM KCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM NaN₃, 10 mM Tris, 0,1 mM PMSF, pH 8.0) dialysiert. Am nächsten Morgen wurde das Dialysat 1 h bei 15.000 rpm (R16, Beckmann UZ) zentrifugiert und der Überstand mit 200 ml/h auf eine DEAE-Sepharose Cl6B Anionenaustauschersäule aufgetragen. Nach Applikation der Probe wurde die Säule mit 2 Vol. Säulenpuffer A gewaschen und die gebundenen Proteine mit einem KCl-Gradienten von 50 - 400 mM KCl bei 125 ml/h über 16 h eluiert. Ausgewählte Fraktionen (20 ml/Fraktion) wurden in der SDS-PAGE auf den Gehalt von CapZ untersucht.

CapZ-haltige Fraktionen wurden vereinigt und fraktioniert mit (NH₄)₂SO₄ gefällt. Im ersten Schritt wurde langsam unter Rühren kristallines Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 45% zugesetzt und das entstandene Präzipitat bei 15.000 rpm (R16, Beckmann UZ) für 20 min abgetrennt. Der Überstand wurde im zweiten Schritt bis zu einer Sättigung von 75% mit Ammoniumsulfat versetzt und abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in Säulenpuffer A aufgenommen, 30 min klarzentrifugiert und mit 20 ml/h auf eine Gelfiltrationssäule (S200, Sephacryl) aufgetragen. Die Trennung erfolgte mit 20 ml/h über einen Zeitraum von ca. 16 h. Die Fraktionen (6 ml) wurden in einer SDS-PAGE auf ihren CapZ-Gehalt untersucht, CapZ-haltige Fraktionen vereinigt und mit 2 ml/min auf eine DMAE-Anionenaustauschersäule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 2 Vol. DMAE-Säulenpuffer A (50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 mM Imidazol, pH 7,2) erfolgte die Elution mit einem linearen KCl-Gradienten von 50 - 400 mM und einer Flußrate von 2 ml/min. CapZ-haltige Fraktionen (1,5 ml) wurden durch eine SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und auf >1 mg/ml ankonzentriert. Das CapZ wurde entweder sofort verwendet und bis zu einer Woche auf Eis gelagert oder mit Ammoniumsulfat bis zu einer 80%igen Sättigung versetzt, im Kühlraum abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 20 min, 15.000rpm) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.6 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

2.2.6.1 Expressionskultur

Zur Expression rekombinanter Proteine in präparativem Maßstab wurde 1 ml einer Glycerinkultur zu 200 ml antibiotikahaltigem LB-Medium gegeben und ü/N bei 37°C geschüttelt. Die Art und Konzentration der Antibiotika richtete sich nach den eingesetzten *E. coli*-Stämmen:

Stamm	Vektor	Antibiotika
M15[pRep4] pQE60 CapZ α_2	pQE60	Kanamycin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$
M15[pRep4] pQE60 CapZ β_2	pQE60	Kanamycin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Bl21(DE3) CodonPlus RIPL pET-3d CapZ α_1	pET-3d	Chloramphenicol, 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Bl21(DE3) CodonPlus RIPL pET-3d CapZ β_1	pET-3d	Chloramphenicol, 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Anschließend wurden 1800 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium (Antibiotikazusatz nur bei den M15-Stämmen) mit der ü/N-Kultur versetzt und in einem Fermenter (bestehend aus 2l-BlueCap-Flasche, Gaswaschflaschenaufsatz mit Keramikfritte und elektrischer Luftpumpe, Luftfiltern sowie Thermometer und Inkubatorschrank) bis zu einer o.D.₆₀₀ von 0.5 - 0.8 unter mäßigem Rühren angezogen. Nach Erreichen der gewünschten o.D. wurde die Expression durch Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM eingeleitet. Nach 4 - 5 h erfolgte die Ernte durch Herunterkühlen der Bakteriensuspension auf Eis und anschließender Zentrifugation (20 min, 4.500rpm, 2°C, Ausschwingrotor, Beckmann Kühlzentrifuge). Die Bakteriensedimente wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Zur Analyse des Expressionsverlaufs wurden kurz vor und je 1 h nach der Induktion 1 ml-Proben entnommen, die Bakterien durch kurze Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge (1 min, 15.000rpm) gesammelt und das Medium verworfen. Das Pellet wurde in Aufschlusspuffer (5,7% SDS, 14% Glycerin, 1 M β -Mercaptoethanol, 0,05% Bromphenolblau, 90 mM Tris, pH 6,8) resuspendiert und die Bakterien durch 10minütiges Schütteln bei 37°C lysiert, 7 min gekocht und 15 min bei 4°C und 15.000rpm in der Eppifuge zentrifugiert. Der Überstand enthielt die bakteriellen Proteine und konnte in der SDS-PAGE analysiert werden.

2.2.6.2 Präparation von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*)

Die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine wurden auf Grund hoher Expressionsraten in *inclusion bodies* abgelagert und konnten über die selektive Anreicherung dieser Einschlusskörper aufgereinigt werden.

Die Sedimente der 2l - Expressionskultur wurde in 200 ml *Low Salt Buffer 1* (1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0,2 mM DTT, 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 7,5) aufgenommen, homogenisiert und die Bakterien durch Ultraschall lysiert (5 x 1 min mit Pausen von je 1 min auf Eis bei 18 microns). Anschließend wurde die Suspension für 20 min bei 15.000 rpm und 2°C (R16, Beckmann UZ) zentrifugiert, der Überstand nach Probenentnahme verworfen und das Sediment in 200 ml *Low Salt Buffer 2* (wie LSB 1, nur 0,1% Triton X-100) resuspendiert. Nach erneuter Ultraschallbehandlung und Zentrifugation wurde das Pellet in 200 ml *Low Salt Buffer 3* (wie LSB 1, jedoch ohne Triton X-100) aufgenommen, wie oben beschrieben mit Ultraschall homogenisiert und zentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 ml Denaturierungspuffer 1 (8 M Harnstoff, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0,2 mM DTT, 20 mM Imidazol, pH 7,5) aufgenommen und unter Schütteln 10 min bei RT denaturiert. Anschließend wurde die Harnstoffkonzentration durch Zugabe von Denaturierungspuffer 2 (wie Denaturierungspuffer 1, jedoch ohne Harnstoff) auf 6 M reduziert. Ungelöstes Protein, Lipide u.ä. wurden durch Zentrifugation für 1 h bei 35.000rpm (Rotor 45.94, Beckmann UZ) abgetrennt und der Überstand nach Probenentnahme auf Eis gelagert.

2.2.6.3 Weitere Aufreinigung der rekombinanten Protein über Ionenaustauschchromatographie

Zur weiteren Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden die harnstoffdenaturierten Proteine auf eine Ionenaustauschersäule (CI-6B) mit 200 ml/h appliziert und mit einem linearen KCl-Gradienten von 50 - 400 mM KCl mit 100 ml/h eluiert. Als Säulenpuffer wurde der Denaturierungspuffer 3 (wie Denaturierungspuffer 1, jedoch 6 M Harnstoff und 50 bzw. 400 mM KCl) eingesetzt. Fraktionen von je 7 ml wurden gesammelt und nach TCA-Fällung in der SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die CapZ-Untereinheiten enthielten, wurden vereinigt und entweder bis zu einer Woche auf Eis gelagert, oder bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch verwahrt.

Zur Vermeidung von unerwünschten posttranslationalen Modifikationen der rekombinanten Proteine durch Abbauprodukte des Harnstoffs wurde 1l einer 9M Harnstofflösung angesetzt und diese mit je 5 g Anionen-/ Kationenaustauscher (Dowex) für 30 min bei RT gerührt. Nach dem Abnutschen der Ionenaustauschermatrix wurde die Lösung zum

Ansetzen der anderen harnstoffhaltigen Lösungen verwendet. Harnstofflösungen wurden generell bei +4°C gelagert und nach dem Ansetzen nicht länger als 1 Woche verwendet.

2.2.7 Renaturierung

2.2.7.1 Renaturierung nach Remmert [1999], modifiziert

Die Renaturierung wurde durch schnelles Verdünnen in temperierten Rückfaltungspuffer (5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 20% Glycerin, 100 mM Tris, pH 7,4; 14°C) und anschließender 24stündiger Inkubation durchgeführt. Dazu wurden die mit Harnstoff denaturierten Proteine in dem Maße zugegeben, daß eine Protein-Endkonzentration von 15-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und eine Harnstoff-Endkonzentration von maximal 80 μM vorlagen. Nach erfolgter Renaturierung wurde die Proteinlösung über einen hydrophoben Glasfaserfilter abgenutscht, um falsch gefaltete und stark hydrophobe Proteine zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung entgast und auf eine Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose, fast flow) mit 200 ml/h aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Q-Puffer A (0,2 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 0,2 mM DTT, 3 mM NaN_3 , 10 mM Imidazol, pH 7,0) erfolgte die Elution mit Q-Puffer B (wie Q-Puffer A, jedoch mit 600 mM KCl). Das Eluat wurde in einer Amicon-Rührzelle bis zu einem Endvolumen von 4-5 ml ankonzentriert, kurz klarzentrifugiert (30 min, 40.000 rpm, Rotor 80.4, Beckmann UZ) und mit 0,6 ml/min auf eine Superdex 200 - Säule (1,6 x 60 cm), die zuvor mit Superdex-Puffer (50 mM KCl, 0,2 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 0,2 mM DTT, 3 mM NaN_3 , 10 mM Imidazol, pH 7,5) äquilibriert wurde, appliziert. Die Fraktionen (0,5 ml) wurden in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert und Fraktionen mit gleichen Anteilen von α - und β -Untereinheiten gesammelt. Nach Zugabe der Proteinaseinhibitoren PMSF und Leupeptin wurde das renaturierte Protein entweder sofort verwendet und bis zu 3 Tage auf Eis gelagert oder bis zu einer Sättigung von 80% mit Ammoniumsulfat versetzt, in der Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert (20 min, volle Umdrehungszahl, 4°C) und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.7.2 Renaturierung durch Dialyse in alternativem Rückfaltungspuffer

2.2.7.2.1 *Fractional factorial protein folding screen* (nach Box et al., 1978).

Zur Renaturierung einzelner Untereinheiten wurde über einen sog. *fractional factorial protein folding screen* ein alternativer Rückfaltungsweg gesucht. Dazu wurden je 100 μl Proteinlösung (1 mg/ml, in Denaturierungspuffer 3), die gleiche Anteile der denaturierten Untereinheiten rCapZ α_2 und rCapZ β_1 enthielt, zu 1,9 ml der in der Tabelle angegebenen, auf 14°C temperierten Puffer gegeben. Die Konzentrationen der Puffersubstanzen lagen

2 Material und Methoden

in allen Puffern bei 55 mM. Außerdem wurde zu jedem Puffer 2 mM DTT zugesetzt. Nach Zugabe der Proteinlösung enthielt ein Ansatz also 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein sowie zusätzlich 300 mM Urea, ca. 6 mM KCl sowie 50 μM EGTA.

#	Puffer	Salz	PEG	Harnstoff	Kation/Chelator	Additive
1	Tris pH 8,2	264 mM NaCl 11 mM KCl	0,055%	0 mM	1,1 mM EDTA	-
2	MES pH 6,5	10,56 mM NaCl 0,44 mM KCl	-	550 mM	2,2 mM MgCl_2 2,2 mM CaCl_2	-
3	MES pH 6,5	10,56 mM NaCl 0,44 mM KCl	0,055%	550 mM	1,1 mM EDTA	440 mM Glucose 550 mM L-Arginin
4	Tris pH 8,2	264 mM NaCl 11 mM KCl	-	0 mM	2,2 mM MgCl_2 2,2 mM CaCl_2	440 mM Glucose 550 mM L-Arginin
5	MES pH 6,5	264 mM NaCl 11 mM KCl	-	0 mM	2,2 mM MgCl_2 2,2 mM CaCl_2	440 mM Glucose
6	Tris pH 8,2	10,56 mM NaCl 0,44 mM KCl	0,055%	550 mM	1,1 mM EGTA	440 mM Glucose
7	Tris pH 8,2	10,56 mM NaCl 0,44 mM KCl	-	550 mM	2,2 mM MgCl_2 2,2 mM CaCl_2	550 mM L-Arginin
8	MES pH 6,5	264 mM NaCl 11 mM KCl	0,055%	0 mM	1,1 mM EDTA	550 mM L-Arginin
9	MES pH 6,5	264 mM NaCl 11 mM KCl	0,055%	550 mM	2,2 mM MgCl_2 2,2 mM CaCl_2	440 mM Glucose
10	Tris pH 8,2	10,56 mM NaCl 0,44 mM KCl	-	0 mM	1,1 mM EDTA	440 mM Glucose
11	Tris pH 8,2	10,56 mM NaCl 0,44 mM KCl	0,055%	0 mM	2,2 mM MgCl_2 2,2 mM CaCl_2	550 mM L-Arginin
12	MES pH 6,5	264 mM NaCl 11 mM KCl	-	550 mM	1,1 mM EDTA	550 mM L-Arginin
13	Tris pH 8,2	264 mM NaCl 11 mM KCl	-	550 mM	1,1 mM EDTA	-
14	MES pH 6,5	10,56 mM NaCl 0,44 mM KCl	0,055%	0 mM	2,2 mM MgCl_2 2,2 mM CaCl_2	-
15	MES pH 6,5	10,56 mM NaCl 0,44 mM KCl	-	0 mM	1,1 mM EGTA	440 mM Glucose 550 mM L-Arginin
16	Tris pH 8,2	264 mM NaCl 11 mM KCl	0,055%	550 mM	2,2 mM MgCl_2 2,2 mM CaCl_2	440 mM Glucose 550 mM L-Arginin

Die proteinhaltigen Puffer wurden für 4 h bei 14°C inkubiert und ü/N gegen 150 Vol. 2xG-Puffer dialysiert. Nach Zentrifugation der Lösungen (20 min, Eppendorf Zentrifuge, 4°C, 13.000 rpm) wurde der Rückfaltungserfolg durch einen F-Actin-Depolymerisationsansatz (s. 2.2.14.1) gemessen. Der Puffer, in dem die höchste Menge an aktivem Protein rückgefaltet wurde, wurde weiter optimiert, indem nach demselben Schema die Faktoren „pH-Wert“ (pH 6,5 - pH 8,2) und „Detergenzien“ (3 mM L-Lauroylsarcosin, 0,05% Tween20, 5 mM CHAPS, 20% Glycerin) in zwei weiteren Screens eruiert wurden. Der aus diesen Screens mit den besten Rückfaltungsbedingungen hervorgegangene Puffer enthielt 264 mM NaCl, 11 mM KCl, 2,2 mM MgCl_2 , 2,2 mM CaCl_2 , 440 mM Glucose, 20% Glycerin, 0,05% Tween20, 1 mM DTT, 2 mM PMSF und 55 mM Tris pH 7,3.

2.2.7.2.2 Renaturierung in präparativem Maßstab. Zur Renaturierung von rCapZ-Heterodimeren und separaten rCapZ-Untereinheiten in präparativem Maßstab wurden zu 100 ml Rückfaltungspuffer, 5 ml Proteinlösung (1,5 - 4 mg/ml rekombinante Proteine in Denaturierungspuffer 3) gegeben, 6 h bei 14°C inkubiert und ü/N gegen 5l 2xG-Puffer dialysiert. Nach Ankonzentrierung in einer Amicon-Rührzelle auf <5ml wurde die Lösung kurz klarzentrifugiert (20 min bei 2°C im Rotor 80.4, 40.000 rpm, Beckmann UZ) und mit 0,6 ml/min auf eine mit Superdex-Puffer äquilibrierte Superdex 16/60-Säule aufgetragen. Die Fraktionen (1,5 ml) wurden mittels SDS-PAGE analysiert und Fraktionen mit gleichen Anteilen von α - und β -Untereinheit, oder, bei separater Rückfaltung, mit monomeren Proteinen gesammelt. Je nach Proteingehalt wurden die Proteinpools auf 1 mg/ml in einer Amicon-Rührzelle ankonzentriert oder sofort weiterverarbeitet. Nach Zugabe von 1 mM PMSF und 0,1 μ M Leupeptin wurde die renaturierten Proteine entweder sofort verwendet und bis zu 3 Tage auf Eis gelagert oder bis zu einer Sättigung von 80% mit Ammoniumsulfat versetzt, in der Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert (20 min, volle Umdrehungszahl, 2°C) und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.8 Fällung von Proteinen mit verdünnter Trichloressigsäure

Um SDS-Proben von Proteinen und Proteingemischen aus hochmolaren Harnstofflösungen herzustellen, wurden diese mit verdünnter Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 10%iger TCA versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben in der Tischzentrifuge bei maximaler Drehzahl für 10 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets zweimal mit je 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die Sedimente wurden mit 200 μ l 1xSDS-Probenpuffer versetzt, mit einem Eppendorf-Homogenisator homogenisiert und 10 min bei 95°C inkubiert. Kurz vor dem Auftragen der SDS-Proben wurden sie für 15 min bei voller Drehzahl in der Tischzentrifuge klarzentrifugiert.

Zur Proteinbestimmung nach Biuret wurden die mit Ethanol gewaschenen Sedimente mit 500 μ l 9%iger NaOH versetzt, für 10 min unter Schütteln bei RT inkubiert und standardgemäß weiter verarbeitet.

2.2.9 Proteinbestimmung

2.2.9.1 Biuret-Methode

Zur standardmäßigen Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen wurde die Biuret-Methode angewandt. Sie beruht auf der Bildung von violetten Komplexen von

Cu^{2+} -Ionen der Biuret-Reagenz mit Peptidbindungen der Proteine. Diese Komplexe lassen sich im Spektralphotometer bei 550 nm nachweisen.

Lösungen:

- **Biuret-Lösung A:** 173 g/l Natriumcitrat, 100 g/l Natriumcarbonat und 17,3 g/l Kupfersulfat in H_2O .
- **Biuret-Lösung B:** 9% (w/v) NaOH
- **Proteinstandard:** BSA- oder G-Actin-Lösung

Durchführung:

Zu 300 μl Probe wurden 300 μl Biuret-Lösung B und 30 μl Biuret-Lösung A gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Als photometrischer Nullwert wurde eine Probe mit H_2O anstelle der Proteinlösung mitgeführt. Beide Lösungen wurden in Mikroküvetten überführt und deren Extinktion im Photometer bei 550 nm gemessen. Die Proteinkonzentration konnte anhand eines Konversionsfaktors, der zuvor mit Hilfe einer Lösung mit bekannter Proteinkonzentration ermittelt wurde, errechnet werden.

2.2.9.2 BCA-Methode

Zur Proteinbestimmung kleiner Volumina und niedriger Proteinkonzentrationen wurde die BCA-Methode angewandt. Bicinchoninsäure bildet in alkalischer Lösung einen violetten Komplex mit Cu^+ -Ionen aus, welche zuvor durch Reduktion der im Ansatz enthaltenen Cu^{2+} -Ionen an Peptidbindungen der Proteine entstanden ist. Der Farbkomplex kann im Photometer bei 562 nm gemessen werden [180].

Lösungen:

- **Lösung A:** Bicinchoninsäurelösung (Fluka)
- **Lösung B:** 4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
- **Proteinstandard:** 1 mg/ml BSA

Durchführung:

50 μl Proteinlösung wurden mit 1 ml Nachweisreagenz (50 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurden die Proben im Spektralphotometer gegen einen mitgeführten Nullwert (1 ml Nachweisreagenz + 50 μl H_2O) bei 562 nm gemessen. Der Konversionsfaktor wurde ähnlich dem der Biuretmethode ermittelt.

2.2.10 Herstellung des Peptidantikörpers CapZ β_2

Der in dieser Arbeit verwendete Peptidantikörper wurde von der Firma Pineda Antikörper (Berlin) in Kaninchen hergestellt. Dazu wurde von der Firma ein Peptid synthetisiert, dessen Sequenz identisch mit dem C-Terminus der nativen CapZ β_2 -Untereinheit ist. Die beiden β -Isoformen unterscheiden sich ausschließlich in ihren C-terminalen Bereichen (s. Einleitung). Das Peptid bestand aus 16 Aminosäuren und hatte die Sequenz „Val - Gln - Thr - Phe - Ala - Asp - Lys - Ser - Lys - Gln - Glu - Ala - Leu - Lys - Asn - Asp“. Die Kaninchenserum wurden über Immunblotanalysen auf ihre Kreuzreaktivität mit Proteinen aus Glattmuskel und Milz (alle aus *sus scrofa*) sowie in Reinproteinproben und Proben rekombinanter Proteine getestet. Das reaktivste Serum mit den geringsten Kreuzreaktionen war das des 150. Immunisierungstages und wurde in allen weiteren immunologischen Versuchen eingesetzt. Eine Aufreinigung erwies sich wegen der äußerst geringen Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen aus verschiedenen Geweben des Schweins als unnötig.

2.2.11 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Um Proteine und Proteingemische aufzutrennen oder zu charakterisieren, bedient man sich häufig der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei wird das unterschiedliche Wanderungsverhalten von geladenen Molekülen im elektrischen Feld ausgenutzt.

2.2.11.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Die Trennmatrix wird durch die Polymerisation von Acrylamid mit dem quervernetzenden N,N'-Methylenbisacrylamid erzeugt. Durch die Variierung der relativen Konzentrationen der beiden Monomere zueinander können die Porengröße des Gels und damit die Trenneigenschaften beeinflusst werden. Die Polymerisation wird mit dem Radikalbildner Ammoniumpersulfat induziert und durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) katalysiert. Gele, die in Abwesenheit von SDS polymerisiert wurden, zeigten deutlich bessere Trenneigenschaften.

Die SDS-PAGE wurde in Flachbettgelen (75 x 110 x 1 mm) unter Verwendung von Sammelgel (5% Acrylamid) und Trenngel (12,5% bzw. 15% Acrylamid) durchgeführt. Das Sammelgel wurde ca. 20 min vor der Durchführung der Elektrophorese auf das Trenngel gegossen. Zur Erzeugung von Probestaschen wurde in das noch nicht polymerisierte Obergel ein Teflonkamm eingesetzt, der nach dessen Polymerisation gezogen wurde.

Probenvorbereitung:

Proteinlösungen für die SDS-PAGE wurden mit 1/4 Vol. 5xSDS-Probenpuffer versetzt und 5 - 10 min gekocht. In einigen Fällen wurden die Proben vor dem Auftragen 15 - 20 min in der Tischzentrifuge bei voller Umdrehungszahl zentrifugiert, um nicht gelöste Aggregate zu sedimentieren. Die Überstände wurden dann in der SDS-PAGE aufgetragen.

Elektrophorese:

Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte über ca. 2 h bei 20 - 30 mA/Gel und einer Maximalspannung von 250 V in Elektrodenpuffer. Nach Austritt der Bromphenolblau-bande aus der unteren Gelkante wurde der Lauf beendet und die Glasplatten entfernt. Das Gel wurde entweder direkt gefärbt oder zum sog. Blotting weiter verwendet.

Färbung:

Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel in Coomassie-Blue Färbelösung gegeben, für 1 min bei 900 Watt im Mikrowellenofen erhitzt und unter leichtem Schütteln für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt, das Gel kurz mit demin. H₂O gewaschen und mit Entfärbelösung versetzt. Nach einminütigem Erhitzen im Mikrowellenofen bei 900 Watt und dem Hinzufügen eines Stück Zellstoffs wurde das Gel unter leichter Agitation so lange entfärbt, bis sich die blau gefärbten, proteinhaltigen Banden deutlich vom durchscheinenden Hintergrund abhoben. Zur weiteren Reduzierung des Hintergrunds wurden die Gele ü/N in demineralisiertem H₂O geschüttelt, in feuchtem Zustand am Flachbettscanner gescannt und zur Konservierung zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet.

Lösungen 15%-Gele

15% Acrylamid
0,1% Bisacrylamid
0,1% SDS
370 mM Tris, pH 8,7
0,03% APS
0,03% TEMED

5xSDS-Probenpuffer

10% SDS
50 mM DTT
20% Glycerin
20 mM EDTA
0,05% Bromphenolblau
320 mM Tris, pH 6,86

Elektrodenpuffer

25 mM Tris-Glycin,
0,1% SDS
pH 8,35

Coomassie-Blue Färbelösung

10% Essigsäure
25% Isopropanol
0,5% Coomassie Brilliant blue R-250 (Serva)

Entfärbelösung

10% Essigsäure
10% Isopropanol

2.2.11.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.2.11.2.1 Isoelektrische Fokussierung Die isoelektrische Fokussierung (IEF) stellt ein Verfahren dar, bei dem Moleküle aufgrund ihrer Nettoladung aufgetrennt werden können. Die Nettoladung eines Proteins ist die Summe aller positiven und negativen Ladungen an den Aminosäureseitenketten. Dreidimensionale Konformation, Phosphorylierung, Acetylierung und andere posttranslationale Modifikationen beeinflussen dabei zusätzlich den Ladungszustand. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins ist derjenige pH-Wert, bei dem seine Nettoladung Null und damit die elektrophoretische Beweglichkeit ebenfalls Null ist. In einem pH-Gradienten wandert ein Protein also so weit, bis es eine Position im Gel erreicht, an der der pH-Wert seinem pI entspricht.

Die isoelektrische Fokussierung wurde in einem *Multiphor II Isoelectric Focusing System* der Firma Amersham Biosciences durchgeführt.

Alle Proteinproben für die zweidimensionale Gelelektrophorese, mit Ausnahme der in Harnstoff befindlichen CapZ-Untereinheiten, wurden $\frac{1}{N}$ gegen 100 Vol. 10 mM Imidazol, pH 7,0 und 0,5 mM PMSF dialysiert und lyophilisiert.

Die lyophilisierten Proben wurden mit 320 μ l Reswelling Buffer (Amersham; 8 M Harnstoff, 0,5% CHAPS, 20 mM DTT, 0,5% (v/v) IPG Puffer) versetzt, kurz anzentrifugiert und zu den IPG-Streifen (IPG DryStrips, 18 cm, pH 3-10, Amersham Biosciences) in ein Keramikscheibchen gegeben. Zu den bereits denaturierten Proteinen wurden 0,5% CHAPS, 20 mM DTT und 0,5% (v/v) IPG Puffer gegeben, die Lösung kurz anzentrifugiert und 320 μ l in der isoelektrischen Fokussierung eingesetzt. Der Streifen wurde mit 1 ml Mineralöl (DryStrip Cover Fluid) überschichtet und bei 20°C und 30 V/Strip für 10 h inkubiert. Die isoelektrische Fokussierung wurde bei 20°C und 0,05 mA/Strip unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1 h bei 200 V
- 1 h bei 500 V
- 2 h bei einem linearen Gradienten von 500 V - 8.000 V
- 2 h bei 8.000 V

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Streifen in Parafilm eingeschlagen und bis zum Beginn der zweiten Elektrophorese bei -80°C gelagert.

2.2.11.2.2 Auftrennung nach Molekularmasse Nach erfolgter isoelektrischer Fokussierung wurden die IPG-Streifen für 12 min in 50 ml Äquilibriumspuffer A (6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 2% (w/v) DTE und 50 mM Tris, pH 8,4) und anschließend für 5 min in 50 ml Äquilibriumspuffer B (6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 2,5 % (w/v) Iodacetamid, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau und 50

mM Tris, pH 6,8) bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Streifen wurden mittig zerschnitten, auf die Oberkante von 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen ohne Obergele transferiert und mit auf 50°C erwärmter Agaroselösung (1% Agarose in SDS-Laufpuffer) luftblasenfrei eingegossen. Die Elektrophorese wurde wie in 2.2.11.1 beschrieben durchgeführt und nach Austritt der Bromphenolblau-Banden aus dem Gel beendet.

2.2.11.2.3 Silberfärbung und Dokumentation Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Glasplatten entfernt und die Gele mit dem Silberfärbungskit der Firma Roth nach Angaben des Herstellers gefärbt. Im Anschluß wurden die Gele über einen Flachbettscanner gescannt und zur Konservierung zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet.

2.2.12 Immunblot

Um Proteine über spezifische Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen nachzuweisen, wurde die Methode des Immunblottings angewandt. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteine bzw. Proteingemische auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Darstellung einer spezifischen Bindung eines Antikörpers an das nachzuweisende Protein erfolgte mittels eines gegen den ersten Antikörper gerichteten, enzymgekoppelten Zweitantikörper. Über den enzymvermittelten Umsatz eines Substrats in ein nachweisbares Produkt konnte das entsprechende Protein nachgewiesen werden.

2.2.12.1 Elektrotransfer

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine für immunologische Nachweisreaktionen zugänglich zu machen, wurden diese aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Ein solches Verfahren stellt das Elektroblothing dar. Bei diesem wandern die Proteine im elektrischen Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung aus dem Gel auf die Membran, wo sie gebunden werden (nach Khyse-Anderson [101]).

Auf die Anode eines Elektroblothers mit Graphitelektroden wurde folgendes „Sandwich“ aufgeschichtet:

- 2 Filterpapiere in Lösung A (300 mM Tris, 20% Methanol) getränkt
- 1 Filterpapier in Lösung B (30 mM Tris, 20% Methanol) getränkt
- 1 Nitrocellulosemembran in ddH₂O getränkt
- 1 Polyacrylamidgel ohne Obergel
- 3 Filterpapiere in Lösung C (25 mM Tris, 40 mM Aminohexanonsäure, 20% Methanol) getränkt
- Kathode des Elektroblothers

Der Aufbau wurde mit einer Metallplatte und einem mit Eis gefüllten 5l-Becherglas beschwert und der Transfer bei 150 mA und einer Maximalspannung von 30 V über 2 h eingeleitet.

Zur Überprüfung des erfolgten Transfers wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau-Lösung (0,3% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure, 3% Sulfosalicylsäure) inkubiert. Proteinhaltige Banden färbten sich dabei rot an. Zum Entfärben wurde die Membran in H₂O überführt und mit einigen Tropfen 2M Tris versetzt.

2.2.12.2 Abblocken unspezifischer Bindestellen und Antikörperinkubation

Um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern wurde die Nitrocellulose für mindestens 1 h in 3%iger Gelatine-TTBS bei RT oder ü/N bei +4°C inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden bei RT unter leichter Agitation durchgeführt. Die Membran wurde für 5 min mit 0,5% Gelatine-TTBS gewaschen und mit dem ersten Antikörper in 0,5% Gelatine-TTBS für 2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,5% Gelatine-TTBS für je 10 min wurde die Nitrocellulose mit dem Zweitantikörper in 0,5% Gelatine-TTBS für 1 h inkubiert und anschließend dreimal mit 0,5% Gelatine-TTBS für je 10 min gewaschen. Abschließend wurde die Membran mit alkalischem Phosphatase-Puffer versetzt und der Blot entwickelt.

Verwendete Lösungen:

- **TTBS:** 500 mM NaCl, 0,05 % Tween20, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
- **Blocking-Solution:** 3% Fischgelatine (Serva) in TTBS
- **Waschlösung:** 0,5% Fischgelatine in TTBS
- **Phosphatase-Puffer:** 50 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 9,5
- **Primärantikörper:** p-a CapZ-Serum, Serum 1.2 (pab prod Herbertshausen),
affinitätsgereinigt, 1:150;
p-a CapZ/β₂, 150. Immunisierungstag
(Pineda Antikörper, Berlin), 1:2500
- **Sekundärantikörper:** goat-anti-rabbit IgG, alkalische Phosphatase-gekoppelt,
1:2000

2.2.12.3 Nachweis mit alkalischer Phosphatase

Um die Bindung des ersten Antikörpers an das entsprechende Protein nachzuweisen, kann über die Bindung des Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörpers eine lokal begrenzte En-

zymreaktion mit NBT und BCIP erzielt werden, wobei die beiden Substratanaloga zu einem unlöslichen violetten Niederschlag umgesetzt werden.

Lösungen:

- **NBT-Lösung:** 30 mg NBT (Nitroblue Tetrazoliumchlorid) in 1 ml 70% Dimethylformamid
- **BCIP-Lösung:** 15 mg BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat-p-Toluidinsalz) in 1 ml Dimethylformamid

Die in Phosphatase-Puffer umgepufferte Nitrozellulosemembran wurde mit frisch ange-setzter Entwicklerlösung (10 ml Phosphatase-Puffer, 0,1 ml NBT- und 0,1 ml BCIP-Lösung) versetzt und unter Schütteln bei RT bis zum Erscheinen der Proteinbanden inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Nitrozellulose in H₂O mit einigen Tropfen Essigsäure überführt und anschließend mit H₂O gewaschen. Zur Dokumentation wurden die Blots auf einem Flachbettscanner im Durchlicht gescannt.

2.2.13 Kosedimentation mit F-Actin

Die Kosedimentation stellt eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen dar. Dabei wird das veränderte Sedimentationsverhalten einzelner Komponenten in Proteingemischen ausgenutzt, wenn Komplexe im Reaktionsansatz gebildet werden. Diese Komplexe können durch Ultrazentrifugation von freien Proteinen getrennt und beide Fraktionen in der SDS-PAGE analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde die Kosedimentation eingesetzt, um die Interaktion der rekombinanten CapZ-Heterodimere und einzeln renaturierter Untereinheiten mit F-Actin zu untersuchen. F-Actin läßt sich in Gravitationsfeldern von 100.000 g in 30 min sedimentieren.

Um die Interaktion der o.g. Proteine mit F-Actin zu untersuchen, wurden die Proteine zunächst gegen 50 Vol. APB (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 mM ATP und 10 mM Imidazol, pH 7,5) ü/N bei 2°C dialysiert und für 1 h bei 50.000 rpm (Rotor 80.4, 2°C) in der UZ zentrifugiert. G-Actin wurde in Konzentrationen von 1,5 mg/ml durch Zugabe von Actin-Polymerisations-Puffer (APB, 10fach konzentriert: 10 mM ATP, 100 mM Imidazol, pH 7,4) und 100 mM KCl sowie 2 mM MgCl₂ für 30 min bei RT polymerisiert. Im Anschluß wurde die F-Actin-Lösung auf Eis dreimal für je 5 s mit Ultraschall behandelt, 0,5 mg F-Actin entnommen, die zu untersuchenden Proteine zugesetzt und 1 h bei RT inkubiert. Die Ultraschallbehandlung sollte zum Bruch langer F-Actinfilamente und damit zur Erzeugung vieler Filamentenden führen. Nach Zentrifugation (1 h, 50.000 rpm,

2°C, Rotor 80.4, Beckmann UZ) wurden unmittelbar der Überstand und das Sediment getrennt, zu SDS-Proben verarbeitet und in der SDS-PAGE bzw. im Immunblot analysiert. Als Kontrollen wurden die einzelnen Proteine getrennt voneinander mitgeführt.

Kosedimentationsansatz:

0,5 mg/ml F-Actin (24 μ M) in 2xG-Puffer

1 mM ATP

100 mM KCl

2 mM MgCl₂

10 mM Imidazol, pH 7,4

Proteine im molaren Verhältnis Protein:G-Actin = 1:50

2.2.14 Fluorometrie

Proteine können an reaktiven Sulfhydrylgruppen mit dem Fluoreszenzfarbstoff N-(1-Pyrenyl)iodacetamid markiert werden [210]. Werden diese Proteine mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm angeregt, so emittiert der Farbstoff Licht einer Wellenlänge von 407 nm, welches im Spektralfluorometer erfaßt werden kann.

Die Markierung von α -Actin aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens erfolgt über die reaktive Thiolgruppe von Cys374. Wird das so markierte G-Actin (Pyren-G-Actin) zur Polymerisation gebracht, resultiert aus der Konformationsänderung des Monomers beim Einbau in das Polymer eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals um den Faktor 22 [96]. Kontinuierliche Messungen der Fluoreszenzintensität geben Aufschluß über die Kinetik der Actinpolymerisation.

In dieser Arbeit wurde die Fluorometrie eingesetzt, um die Capping- und Nukleationsaktivität der verschiedenen rekombinanten CapZ-Heterodimere und der separat rückgefalteten Untereinheiten zu analysieren. Außerdem wurde sie bei der Suche nach einem alternativen Rückfaltungspuffer zur Renaturierung der in *E. coli* exprimierten Proteine eingesetzt.

Die Messungen wurden an einem Spektralfluorometer (Shimadzu 5001) bei 25°C durchgeführt, welches mit der PC-Software RF-5001 (Version 2.0, Shimadzu) angesteuert wurde.

2.2.14.1 Capping

Das Blockieren von Actinfilamentenden läßt sich über einen Depolymerisationsansatz nachweisen. Dazu werden vorpolymerisierte Actinfilamente mit dem zu untersuchenden Protein inkubiert. Beim Verdünnen der Lösung unter die kritische Actinkonzentration depolymerisieren nicht gecappte Filamente sehr schnell. Wird eines der Enden gecappt,

so verlangsamt sich die Depolymerisationsrate. CapZ besetzt das Plus-Ende der Actinfilamente, das unter den hier gewählten Bedingungen ungecappt eine hohe Depolymerisationsrate aufweist.

Reaktionsansatz:

0,4 mg/ml G-Actin (mit 20%-Anteil Pyren-Actin) in 2xG-Puffer
1 mM ATP
100 mM KCl
2 mM MgCl₂
10 mM Imidazol, pH 7,4
Proteine (in 2xG-Puffer) im molaren Verhältnis Effektor:Actin = 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100
2xG-Puffer zum Verdünnen des Ansatzes

Durchführung:

Das Programm bestand aus Intervallmessungen von 10 s mit einer Gesamtmesszeit von maximal 30 min. Die Excitationsspaltbreite wurde auf 5 nm, die Emissionsspaltbreite auf 10 nm festgelegt. Die oben genannten Komponenten wurden unter Auslassung des zu untersuchenden Proteins 60 min vorinkubiert. Aus dieser F-Actin-Lösung wurden je 80 µg Protein entnommen und mit dem Effektorprotein für 2 h bei 25°C vorinkubiert. Aus diesem Capping-Mix wurden je 20 µg F-Actin entnommen und 40fach mit auf 25°C vortemperiertem 2xG-Puffer (1950 µl) versetzt (Endkonzentration 10 µg/ml bzw. 0,24 µM F-Actin). Unmittelbar nach dem Verdünnen mit G-Puffer wurde die Messung gestartet, als Kontrolle diente ein F-Actin-Ansatz ohne Zusatz von Effektoren.

2.2.14.2 Capping-Aktivität in verschiedenen Rückfaltungspuffern

Zur Messung der Capping-Aktivität der potentiell rückgefalteten rekombinanten Proteine wurden ebenfalls Cappingversuche durchgeführt. Ein Ansatz enthielt folgende Komponenten:

Reaktionsansatz F-Actin:

0,4 mg/ml F-Actin (mit 20% Pyren-Actin) in 2xG-Puffer
1 mM ATP
100 mM KCl
2 mM MgCl₂
10 mM Imidazol, pH 7,4
Effektoren in verschiedenen Rückfaltungspuffern mit Konzentrationen von 50 µg/ml (97,5 µg im Gesamtansatz)

Durchführung:

Es wurden je 1900 μl der verschiedenen, proteinhaltigen Rückfaltungspuffer (s. 2.2.7.2.1) in Quarzküvetten überführt und im Spektralfluorometer auf 25°C vortemperiert. Nach 2 min wurden 50 μl einer F-Actin-Lösung (Endkonzentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20% Pyren-Actin, 1 h bei RT polymerisiert) zugegeben und die Messung sofort gestartet. Das Programm bestand aus Intervallmessungen in 10 s-Abständen mit einer Gesamtmesszeit von 30 min. Die Spaltbreiten wurden auf 5 nm Excitations- und 10 nm Emissionsspalt festgelegt. Als Kontrolle diente eine Depolymerisation von F-Actin ohne Zusatz von Effektoren (1950 μl 2xG-Puffer).

2.2.14.3 Polymerisation

Zur Abschätzung des Polymerisationsverhaltens von Glattmuskelactin im Vergleich zum Skelettmuskelactin wurden fluorometrische Polymerisationsversuche durchgeführt. Dabei wurde Actin und Pyren-Actin in den gleichen Konzentrationen wie in den Cappingversuchen eingesetzt und durch Zugabe von 100 mM KCl und 2 mM MgCl_2 polymerisiert.

Polymerisationsansatz:

0,4 mg/ml Skelettmuskel- oder Glattmuskel-G-Actin (mit 20 % Pyren-Actin) in 2xG-Puffer
1 mM ATP
100 mM KCl
2 mM MgCl_2
10 mM Imidazol, pH 7,4

Durchführung:

Es wurden Intervallmessungen in 10 s-Abständen mit einer Gesamtmesszeit von 30 min durchgeführt. Die Spaltbreiten wurden auf 5 nm Excitations- und 10 nm Emissionsspalt festgelegt. Der Reaktionsansatz bestand aus den o.g. Komponenten unter Auslassung von KCl und MgCl_2 und wurde in einer 2 ml-Küvette im Fluorometer auf 25°C vortemperiert. Nach 2 min wurde die Polymerisation durch Zugabe von KCl und MgCl_2 induziert und die Messung unmittelbar gestartet.

2.2.14.4 Nukleation

Die Geschwindigkeit der Polymerisation von Actin ist u.a. konzentrationsabhängig. So polymerisiert G-Actin in niedrigen Konzentrationen sehr langsam, was im fluorometri-

schen Nukleationsassay als schwacher Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden kann. Durch Zugabe von nukleationsfördernden Proteinen wird die Polymerisation stark beschleunigt und so die Fluoreszenzintensität verstärkt. Steigung und Endpunkt der Fluoreszenzkurve lassen so Rückschlüsse auf die Aktivität des eingesetzten Effektors zu.

Reaktionsansatz:

0,3 mg/ml G-Actin ($7\mu\text{M}$) (mit 20%-Anteil Pyren-Actin) in 2xG-Puffer

1 mM ATP

100 mM KCl

2 mM MgCl_2

10 mM Imidazol, pH 7,4

Proteine (in 2xG-Puffer) im molaren Verhältnis Effektor:Actin = 1:20, 1:50 bzw. 1:100

Durchführung: Die Messungen wurden in Intervallen von 10 s mit einer Gesamtmesszeit von 30 min durchgeführt. Die Spaltbreiten wurden auf 10 nm Excitations- und 15 nm Emissionsspalt festgelegt. Alle Komponenten mit Ausnahme von KCl und MgCl_2 wurden vorgelegt. Mit Zugaben von KCl und MgCl_2 wurden Polymerisation und Messung gestartet. Als Kontrolle wurde eine Actinpolymerisation ohne Zusatz von Effektoren durchgeführt.

2.2.15 Quervernetzung mit EDC

EDC wurde in dieser Arbeit zur Quervernetzung der rekombinanten Proteine und einzelner Untereinheiten mit Glattmuskel-G-Actin bzw. Glattmuskel- α -Actinin benutzt. Alle proteinhaltigen Lösungen mit Ausnahme des Actins wurden \ddot{u}/N gegen 50 Volumen EGTA-haltiger PBS (0,137 M 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 mit 0,5 mM EGTA) bei 2°C dialysiert und für 30 min im Rotor 80.4 bei 40.000 rpm zentrifugiert, um Präzipitate zu entfernen. Die Proteine wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 (α -Actinin) bzw. 1:2 (einzeln rückgefaltete Untereinheiten mit G-Actin) bis 1:4 (renaturierte Heterodimere mit G-Actin) gemischt, mit EGTA-PBS auf ein Endvolumen von $300\ \mu\text{l}$ aufgefüllt und 20 mM EDC zugesetzt. Vom Zeitpunkt $t_{0\text{min}}$ bis $t_{60\text{min}}$ nach Zugabe des EDC wurden in 10- bzw. 20minütigen Abständen Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 5x SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Proben wurden in der SDS-PAGE und im Immunblot analysiert. Als Kontrollen wurden die eingesetzten Proteine einzeln quervernetzt und analysiert. Die Versuche wurden bei RT durchgeführt.

2.2.16 Analytische Gelfiltration

2.2.16.1 Analyse der Rückfaltungsprodukte

Zur Bestimmung der Molekularmasse von Proteinen und zur Überprüfung der korrekten Faltung der rekombinanten Heteromere bzw. einzelnen Untereinheiten nach der Renaturierung wurde die Methode der Gelfiltration eingesetzt.

Die Trennung wurde mit zwei in Tandem geschalteten Gelfiltrationssäulen (Superdex200 HR, Pharmacia, 10 x 300 mm) an einem Pharmacia FPLC-Anlage mit Flussraten von 0,5 ml/min und 100-500 μ g Protein durchgeführt. Durch die Anordnung der Säulen sowie die geringe Flussrate sollte eine besonders gute Trennleistung erzielt werden.

Geeicht wurden die Säulen durch ein Substanzgemisch mit bekannten Molekularmassen (natives CapZ, Actin, α -Actinin und ATP). Die Detektion der gelfiltrierte Substanzen erfolgte durch UV-Adsorption bei 280 nm.

Das Säulentandem wurde vor der Applikation der zu untersuchenden Proben mit 4 Vol. Superdex-Puffer (50 mM KCl, 0,2 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 0,2 mM DTT, 3 mM NaN₃, 10 mM Imidazol, pH 7,5) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min äquilibriert und der Lauf nach Applikation der Probe in Superdex-Puffer durchgeführt.

2.2.16.2 Interaktion der rekombinanten Proteine mit α -Actinin

Zur Analyse einer möglichen Interaktion der rekombinanten Heterodimere, nativem CapZ bzw. den separat renaturierten CapZ-Untereinheiten mit Glattmuskel- α -Actinin wurden ebenfalls analytische Gelfiltrationene durchgeführt. Dazu wurden die Proteine ü/N gegen 50 Vol. Gelfiltrationspuffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05% Tween20, 0,5 mM PMSF, 1 mM NaN₃ und 50 mM Tris, pH 7,6) dialysiert und 30 min bei 40.000 rpm im Rotor 80.4 bei 2°C klarzentrifugiert. Die Überstände wurden im selben Puffer im molaren Verhältnis 1:6 bei RT für 2 h inkubiert und auf zwei in Tandem geschalteten Gelfiltrationssäulen (Superdex200 HR, Pharmacia, 10 x 300 mm) an einem Pharmacia FPLC-Anlage mit Flussraten von 0,4 ml/min appliziert. Die Detektion erfolgte durch UV-Adsorption bei 280 nm.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

Die C₂C₁₂-Zellen wurden in 75 ccm - Flaschen (Corning) bei 37°C und 10% CO₂ im Inkubator kultiviert. Als Basalmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM,

Gibco BRL) mit 10% fötalem Rinderserum (FCS, PAA Laboratories GmbH) und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Penicillin sowie 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin. Beim Erreichen einer 60 - 70%igen Konfluenz wurde das Medium abgezogen und die Zellen durch Zugabe von Trypsin (2,5 mg/ml, 5 mM EDTA in PBS) von den Kulturflaschenböden abgelöst. Nach Zugabe von DMEM mit o.g. Zusätzen wurde die Zellsuspension durch vorsichtiges mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert und in neue Kulturflaschen transferiert. Für immunocytochemische Untersuchungen wurden die Zellen auf mit Chromschwefelsäure gereinigte Deckgläschen ausgesät und, je nach Zelldichte, \ddot{u}/N oder bis zu 2 Tagen kultiviert.

Zur Isolierung von Zellkernen wurden 5 Kulturschalen (Durchmesser 150 mm) bis zu einer 70 - 80%igen Konfluenz angezogen und nach Abziehen des Nährmediums durch Abschaben mit einem Zellschaber geerntet. Nach Zugabe von insgesamt 10 ml kalter PBS wurde die Zellsuspension durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren homogenisiert, 5 min bei 1500 rpm und 2°C im Ausschwingrotor (Beckmann Kühlzentrifuge) zentrifugiert und das Sediment in wenigen ml kalter PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendierung in kalter PBS wurde die Suspension bis zur weiteren Verwendung (maximal \ddot{u}/N) auf Eis gelagert.

2.3.2 Isolierung von Glattmuskelzellen nach Small und Draeger [174] [47], modifiziert

Frisch präparierte Muskelstückchen aus der glatten Muskulatur des Schweinemagens bzw. *taenia coli* aus Meerschweinchen wurden mit kalter PBS gereinigt und mit Bindfäden auf kleine Holzstücke aufgespannt. Diese wurden \ddot{u}/N bei 2°C in Solution I (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,1 mM Na_2PO_4 , 0,4 mM KH_2PO_4 , 4 mM NaHCO_3 , 2 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 5,5 mM Glucose, 10 mM PIPES, pH 6,1) mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin und 0,1 mg/ml Verapamil unter leichtem Rühren inkubiert. Die Muskelstücke wurden in Abständen von wenigen Stunden durch Anziehen der Bindfäden expandiert. Am nächsten Morgen wurden die aufgespannten Muskelstreifen entnommen und in auf 37°C temperierte Verdauungslösung (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM NaHCO_3 , 2 mM MgCl_2 , 5,5 mM Glucose, 0,1 mg/ml Verapamil, 1 mg/ml Collagenase Typ V (Sigma), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ E64 (trans-Epoxyssinyl-L-Leucylamido(4-Guanidino)-Butan, Sigma), 5 mM PIPES, pH 6,1) überführt und für 90 min. unter leichter Agitation bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Streifen dreimal für 10 min mit eiskalter Solution I (ohne MgCl_2 , + 0,5 mM DTT) gewaschen, mit einer Rasierklinge zerkleinert, mittels kleiner Pinzetten zerfasert und mit verschiedenen Pasteurpipetten mit kleiner werdenden Öffnungsweiten auf- und abpipettiert. Um größere Gewebereste zu entfernen wurde die Suspension durch Glaswolle filtriert und 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge). Das Sediment wurde in Solution I resuspendiert und auf runde Deckgläschen zentrifugiert. Diese

konnten nun für immunocytochemische Untersuchungen weiterverwendet werden.

2.3.3 Präparation von Zellkernen

Zur Präparation von Zellkernen wurden isolierte Zellen (C₂C₁₂-Zellen und Glattmuskelzellen aus dem Magenmuskel des Schweins sowie aus dem *taenia coli* des Meerschweinchens) mit kalter PBS gewaschen (s. o.) und durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge) pelletiert. Das Sediment wurde in hypotonischem Lysispuffer (1 mM CaCl₂, 10 mM Tris, pH 7,5) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mechanisch im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und das Lysat auf 3 ml einer 1,7 M Saccharose-Lösung (1,7 M Saccharose in hypotonischem Lysispuffer) gegeben und für 1 h zentrifugiert (650 g, 2°C, Rotor 65.13, Beckmann UZ). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1,5 ml hypotonischem Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension wurde auf 3 ml hypotonischen Lysispuffer mit 2 M Saccharose gegeben, erneut zentrifugiert (s.o.), der Überstand verworfen und die pelletierten Kerne in 1,5 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension wurde auf 3 ml Lysispuffer mit 2,12 M Saccharose gegeben, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Kerne in 1,5 ml Lysispuffer resuspendiert. Die so isolierten Zellkerne wurden direkt verwendet oder bis zu 3 Tagen auf Eis gelagert.

Zur Herstellung von Proben für immunocytochemische Versuche wurden die Kerne auf gereinigte Deckgläschen gegeben und 1 h bei RT sedimentiert. Zur Herstellung von SDS-Proben wurden die Pellets mit insgesamt 50 µl 1x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min gekocht und für 5 min bei 15.000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und in der SDS-Page analysiert.

2.3.4 Kryoschnitte

Frisch entnommenes Gewebe wurde kurz mit eiskalter PBS gewaschen und mit Skalpell und Rasierklingen auf Größen von ca. 0,5 cm³ getrimmt. Die Gewebestückchen wurden anschließend auf mit Filterpapier versehene, rund Korkstücke transferiert, mit Einbettungsmedium (Tissue-Tek, Sakura) vollständig eingedeckt und für 1 min in flüssigem Propan inkubiert. Danach wurden sie zunächst in flüssigem Stickstoff und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Gewebestücke wurden bei -24°C am Gefriermikrotom (Frigocut 2800, Reichert & Jung) in 5 - 10 µm dicke Sektionen geschnitten und diese auf Deckgläschen transferiert. Nach Zugabe von 4% PFA in PBS und 30minütiger Inkubation bei RT konnten die Schnitte für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verwendet werden.

2.4 Nukleinsäurebiochemische Methoden

2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben

Um die Kontamination durch RNAsen in Materialien, Geräten und Lösungen zu verhindern, wurden die Arbeiten grundsätzlich mit Latexhandschuhen durchgeführt. Des Weiteren wurden nur geprüft RNAsfreie Reagenzien und Plastikartikel verwendet. ddH₂O wurde durch Zugabe von 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC), Inkubation ü/N und anschließendem Autoklavieren dekontaminiert und Geräte wie Elektrophoresekammern und Gelkämme zur Dekontamination mit 3% H₂O₂ für 20 min inkubiert.

Durchführung:

Zu 100 mg frisch präpariertem Gewebe (Glattmuskel oder Milz vom Schwein) wurde 1 ml GTC-Lösung zugegeben und das Gewebe mit einem Ultraturrax (Janke & Kunkel, Staufen) bei maximaler Drehzahl für 60 s homogenisiert. Unter Rühren wurden 100 µl 2 M Na-Acetat, pH 4,0, 1 ml wassergesättigtes Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben, die Emulsion 30 s geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm (Sorvall, SS34) für 20 min bei 4°C wurde die obere Phase abgenommen, in ein 2 ml Eppendorfggefäß überführt, 1 Vol eiskaltes Isopropanol zugegeben und die Lösung ü/N bei -20°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das RNA-Präzipitat bei 10.000 rpm in der Tischzentrifuge bei 4°C für 15 min abzentrifugiert und das Sediment in 300 µl GTC-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 1 Vol eiskaltem Isopropanol und erneuter Inkubation ü/N wurde das entstandene Präzipitat für 15 min bei 10.000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, das Sediment zweimal mit 500 µl eiskaltem 75%igem Ethanol gewaschen und in der Tischzentrifuge kurz anzentrifugiert. Das Sediment wurde für ca. 15 min an der Luft getrocknet und in einem Volumen von 20 - 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Nach 10minütiger Inkubation im Wasserbad bei 65°C wurde die RNA-Lösung kurz anzentrifugiert und der Überstand entweder weiter aufgereinigt oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die RNA-Konzentration wurde UV-spektrometrisch bestimmt.

GTC-Lösung:

4 M Guanidinisothiocyanat
25 mM Natriumcitrat, pH 7,0
0,5 % Natrium-Sarkosinat (v/v)
0,1 M β-Mercaptoethanol

Zur weiteren Aufreinigung der gewonnenen RNA wurde die Lösung auf die Matrix einer RNA-Aufreinigungssäule des *High Pure Tissue Kit* (Roche) aufgetragen, die Präparation wie vom Hersteller beschrieben weiter fortgeführt und die RNA mit 10 µl DEPC-

H₂O eluiert. Aussagen über die Integrität der gewonnenen RNA konnten nach MOPS-Agarose-Gelelektrophorese getroffen werden. Die RNA-Konzentration wurde durch UV-Adsorptionsmessung im Spektralphotometer bestimmt. Die gewonnene RNA aus der Milz vom Schwein wurde entweder direkt in der RT-PCR eingesetzt oder bei -80°C gelagert, die RNA aus Magenglattmuskel vom Schwein wurde mit Hilfe des *Oligotex mRNA Mini-Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers weiter zu mRNA aufgereinigt.

2.4.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die UV-Spektrometrie wurde als Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren eingesetzt. Dazu wurden nukleinsäurehaltige Lösungen in einer Verdünnungsreihe von 1:20, 1:50 und 1:100 in 10 mM Tris, pH 8,0, angesetzt und in Quarzküvetten überführt. Die Messung erfolgte im Spektralphotometer bei 260 nm gegen einen Pufferleerwert. Die Konzentration konnte über die Formel: Messwert x Verdünnungsfaktor x 40 [RNA] bzw. 50 [DNA] bestimmt werden (Ergebnis in µg/ml). Die Anwesenheit von Proteinen in den Proben wurde über eine zweite Messung bei 280 nm bestimmt. Der Quotient aus den Adsorptionswerten der Messungen bei 260 nm und 280 nm sollte bei sauberen DNA-Präparationen bei 1,8 - 2,0, bei RNA-Präparationen bei 1,9 - 2,2 liegen.

2.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten und Vektoren für Klonierungen und Transformationen wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Die gewünschten, ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden wurden auf dem UV-Transilluminator mit Skalpells ausge-schnitten und die Gelstückchen in nukleasefreie Eppendorfgefäße überführt und ausge-wogen. Die DNA wurde anschliessend mit dem *MinElute Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers extrahiert. Konzentration und Reinheit der DNA wurden durch UV-Spektrometrie und Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt.

2.4.4 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen bzw. PCR wurde der *QIA-quick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen verwendet und die Aufreinigung nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.5 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde der *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen verwendet. Dabei wurden die Vorgaben des Herstellers beachtet.

2.4.6 Elektrophorese von Nukleinsäuren

2.4.6.1 MOPS-Gelelektrophorese von RNA

Zur Überprüfung der Integrität von isolierter Gesamt-RNA wurde ca. 2 μg RNA lyophilisiert und in 10 μl RNA-Probenpuffer und 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Ethidiumbromid resuspendiert. Die RNA wurde zur Denaturierung für 10 min bei 72°C inkubiert und für weitere 5 min auf Eis gelagert. Die Auftrennung erfolgte anschließend in einem 1%igen Agarosegel (70 x 100 x 4 mm) für ca. 1 h bei 10 V/cm in MOPS-Puffer. Die Dokumentation erfolgte auf dem UV-Transilluminator durch Photographie mit einer Polaroid-Kamera mit vorgesetztem Rotfilter.

RNA-Probenpuffer	Laufpuffer
50 % (v/v) deion. Formamid	20 mM MOPS, pH 7,0
20 mM MOPS	10 mM EDTA
2,2 M Formaldehyd	
6,6 % (v/v) Glycerin	
0,5 % (w/v) Bromphenolblau	

2.4.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA in DNA-Probenpuffer mit 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Ethidiumbromid wurde in 1,5 %igen Agarosegelelen in TBE-Puffer nach ihrer Molekularmasse horizontal aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in Flachbettkammern (70 x 100 mm) mit einer Gelhöhe von ca. 4 mm und einer Laufstrecke von ca. 6 cm bei 10 V/cm in 45 min. Die fertigen Gele wurden durch Photographie mit einer Polaroidkamera auf dem UV-Transilluminator dokumentiert.

6xDNA-Probenpuffer	Laufpuffer (TBE)
0,025 % (w/v) Bromphenolblau	0,089 M Tris-HCl, pH 8,0
0,25 % (w/v) Xylencyanol	0,089 M Borsäure
40 % (w/v) Saccharose	2 mM EDTA

2.4.7 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma Roche eingesetzt. Die Restriktion erfolgte in den mitgelieferten, 10fach konzentrierten Puffern. Beim gleichzeitigen Einsatz von zwei Enzymen wurden die Puffer anhand von Referenztabelle ausgewählt, um eine maximale Aktivität der Enzyme zu gewährleisten. Die Reaktionstemperatur, DNA-Menge und Reaktionsdauer wurde den Herstellerangaben angepasst. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze für 10 min bei 95°C inkubiert und mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt. Die restriktionsgespaltene DNA wurde sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

2.4.8 Klonierung von DNA

2.4.8.1 Dephosphorylierung

Zur Vermeidung unerwünschter Religationsreaktionen wurden bei der Klonierung von restriktionsgespaltenen DNA-Fragmenten in Vektoren die linearisierten Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Zur Dephosphorylierung wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μ l 10 μ g Vektor-DNA mit 1 U CIP (calf intestine phosphatase, Roche) für 1 h bei 37°C inkubiert und der Ansatz zur Inaktivierung des Enzyms anschließend für 10 min bei 95°C inkubiert. Die dephosphorylierte Vektor-DNA wurde dann mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C verwahrt.

2.4.9 Ligation

Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte in einem Volumen von 50 μ l mit 1 bis 5 U T4 DNA Ligase (Roche). Das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA betrug bei überhängenden Einzelsträngen (*sticky ends*) 1:2, bei glatten Enden (*blunt ends*) 1:40. Zur Temperierung des Reaktionsansatzes wurde dieser bei RT in eine geschlossene Thermoskanne gegeben und ü/N bei 2°C inkubiert. Der Temperaturgradient, der sich innerhalb der Thermoskanne ausbildete, sollte die Effizienz der Reaktion erhöhen. Die Ligationsprodukte wurden sofort in *E. coli* transformiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.10 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pPCR-Script SK(+) erfolgte unter Verwendung des *PCR-Script Amp Cloning Kit* der Firma Stratagene und wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Ligationsprodukte wurden dann in *E. coli* transformiert und positive Klone über Blau-Weiss-Selektion identifiziert.

2.4.11 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription kann RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Dabei wird ein retrovirales Enzym, die Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) eingesetzt. Ein Vorteil dieser Technik ist die Möglichkeit, bereits gespleißte, d.h. von zellulären Enzymen modifizierte RNA, welche in der Zelle in eine Aminosäuresequenz translatiert würde, in cDNA umzuschreiben.

In dieser Arbeit wurde die reverse Transkription entweder einzeln oder mit direkt nachfolgender PCR (*One-Step RT-PCR*) durchgeführt.

Die reverse Transkription wurde z.T. mit der *Expand Reverse Transkriptase* der Firma Roche durchgeführt. 1 μg Gesamt-RNA oder 0,1 μg mRNA in ddH₂O und 400 pmol Oligo(dT)₁₅-Primer wurden in PCR-Gefäßen mit 20 μl Mineralöl überschichtet, für 10 min bei 65°C im Thermoblock inkubiert und für 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 9,5 μl RT-Mix mit folgender Zusammensetzung zugegeben und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 μl (ohne Mineralöl) aufgefüllt:

RT-Mix:

4 μl 5xExpand revers. Transkriptase-Puffer

2 μl 100 mM DTT

2 μl dNTP-Mix (Endkonzentration 1 mM pro dNTP)

0,5 μl RNase-Inhibitor (Endkonzentration 20 U)

1 μl Expand Reverse Transkriptase (Endkonzentration 50U)

Die Reaktion wurde bei 43°C für 1 h im Wasserbad durchgeführt. Zum Beenden der Reaktion wurde der Ansatz auf Eis inkubiert und direkt einer PCR-Reaktion zugeführt. Zur späteren Verwendung des Ansatzes wurde er für 2 min bei 95°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

2.4.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine äußerst effektive Methode zur schnellen Vervielfältigung von DNA dar. Das Prinzip beruht auf der Aktivität der DNA-abhängigen DNA-Polymerase, die, ausgehend von zwei spezifischen, zueinander ausgerichteten Primern, ein beliebiges, zwischen diesen Primern befindliches DNA-Segment vervielfältigt. Nach Aufschmelzen des Doppelstrangs (Denaturation) werden die Primer angelagert (Annealing) und das Enzym polymerisiert den Gegenstrang (Elongation). Dies geschieht einzig durch Veränderung der Reaktionstemperaturen im Ansatz. Heutige im Labor eingesetzte Polymerasen sind thermostabil und ermöglichen einen zyklischen Prozessablauf, ohne nach jedem Zyklus neue Polymerase zugeben zu müssen. Die Produktmenge wächst im Verlauf der zyklischen Reaktion logarithmisch, da jeder neu synthetisierte Strang als Matrize in nachfolgenden Zyklen dient. So kann innerhalb kurzer Zeit eine milliardenfache Vermehrung der Ursprungs-DNA erreicht werden. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche PCR-Ansätze durchgeführt.

2.4.12.1 PCR zur cDNA-Amplifikation

Zur Amplifizierung von cDNAs der reversen Transkription wurde das *Expand High Fidelity PCR System* der Firma Roche eingesetzt und die Empfehlungen des Herstellers bezüglich der Reaktionsbedingungen beachtet. Dieses System enthält neben der *Taq* DNA Polymerase eine sog. *proofreading polymerase*, also eine 3' → 5' Exonuclease, welche falsch inkorporierte Nukleotide erkennt und die Anzahl dieser Fehlinkorporationen im Vergleich zu PCRs nur mit *Taq*-Polymerase um den Faktor 3 senkt (Fehlerrate $8,5 \times 10^{-9}$ im Vergleich zur *Taq*-Polymerase mit $2,6 \times 10^{-5}$).

Die Oligonukleotide wurden anhand von Homologien veröffentlichter cDNA-Sequenzen der CapZ-Gene verschiedener Spezies entworfen und mit dem Online-Programm *Primer3* optimiert. Die Annealing-Temperaturen von jedem Primerpaar orientierte sich an den vom Hersteller ermittelten Werten und wurden durch Gradienten-PCRs weiter optimiert. Die PCR-Reaktionsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 100 μ l folgende Komponenten:

PCR-Ansatz für cDNA:

800 μ M dNTPs (200 μ M pro Nukleotid)

300 μ M Sinnprimer

300 μ M Gegensinnprimer

ca. 0,1 μ g Template-DNA

1x Expand HF Puffer mit 1,5 mM MgCl₂

2,6 U Expand HF Enzym-Mix

Die PCR wurde im Trio-Thermocycler der Firma Biometra mit 35 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Schritt
1x	94°C	2 min	Initiale Denaturierung
35x	s. 2.1.10 Oligonukleotide	45 s	Annealing
	72°C	45 s	Elongation
	94°C	30 s	Denaturierung
1x	72°C	5 min	Finale Elongation

Die entstandenen Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und der PCR-Ansatz mit dem *PCR Product Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt.

2.4.12.2 Gradienten-PCR

Zur Optimierung der Annealing-Temperaturen der eingesetzten Primerpaare wurden Temperaturgradienten-PCRs durchgeführt. Dazu wurde die Taq-Polymerase der Firma Roche eingesetzt und die PCR im „Mastercycler gradient“ (Eppendorf) durchgeführt. Das Gesamtvolumen einer Einzelreaktion betrug 10 µl. Der Temperaturgradient umfasste einen Bereich von 56°C - 64,75°C über 8 Einzelreaktionen (56°C + 1,25°C/Reaktion). Ein Ansatz enthielt 1xPCR-Puffer, 0,8 mM dNTP-Mix (0,2 mM je dNTP), 0,3 µM Sinn- und 0,3 µM Gegensinnprimer, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 U Taq DNA-Polymerase und ca. 50 ng Template-DNA.

Die Reaktionszeiten und -temperaturen wurden, mit Ausnahme der Annealingtemperatur, wie in 2.4.11.1 beschrieben gewählt. Nach Abschluß der PCR wurden die entstandenen Amplifikate auf einem TBE-Agarosegel analysiert. Die primerspezifischen, optimierten Annealingtemperaturen wurden anhand des Auftretens einer einzelnen scharfen Bande im Gel innerhalb des vorher vermuteten Molekularmassenbereichs gewählt und in weiteren PCR-Reaktionen beibehalten.

2.4.12.3 One-Step RT-PCR

Die *One-Step RT-PCR* wurde mit dem *One-Step RT-PCR-Kit* der Firma Qiagen mit sequenzspezifischen Primern nach den Angaben des Herstellers in einem Biometra Thermocycler (TRIO-Thermoblock) durchgeführt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass beide

Teilreaktionen in einem Gefäß durchgeführt werden können, indem die Reaktionstemperatur den jeweiligen enzymespezifischen Optimumswerten angepasst wird. Die *One-Step RT-PCR* wurde vor allem zur Analyse von funktionellen Primer-Template-Kombinationen eingesetzt. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μl enthielt folgende Komponenten:

One-Step RT-PCR-Ansatz:

- 10 μl 5xRT-PCR-Puffer
- 2 μl dNTP-Mix (Endkonzentration 200 μM /Nukleotid)
- 3 μl Sinnprimer (0,3 μM)
- 3 μl Gegensinnprimer (0,3 μM)
- 2 μl RT-PCR Enzymmix
- 2 μl Template-DNA (1,75 μg)
- H₂O ad 50 μl

Die Reaktionen wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Schritt
1x	50°C	30 min	Reverse Transkription
1x	95°C	15 min	Denaturierung
35x	s. 2.1.8 Oligonukleotide	1 min	Annealing
	72°C	1 min	Elongation
	1 min	95°C	Denaturierung
1x	10 min	72°C	Finale Elongation

Die entstandenen Amplifikate wurden auf einem TBE-Agarosegel analysiert und der PCR-Ansatz mit dem *PCR Product Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt.

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Plasmid-DNA wurde durch Hitzeschocktransformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* transformiert.

2.5.1.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

Eine Glycerinkultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes wurde auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten (1 % Agarose in LB-Medium) ausgestrichen und ü/N bei 37°C inkubiert. Eine

frische Einzelkolonie wurde anschließend mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, in 5 ml antibiotikahaltiges TymBroth überführt und ü/N bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 in 500 ml TymBroth überimpft und bis zu einer o.D.₆₀₀ von 0,5 bei 37°C geschüttelt. Nach 10minütigem Abkühlen der Suspension auf Eis wurde sie in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt und 10 min bei 2500 g und 4°C zentrifugiert (Beckmann Kühlzentrifuge). Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Bakterien sediment in 40 ml TfbI unter vorsichtigem Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Nun wurde das Sediment in 20 ml TfbII vorsichtig resuspendiert und in vorgekühlten Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die nun kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

TfbI:

30 mM Kaliumacetat
50 mM MnCl₂
100 mM KCl
10 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin

TfbII:

10 mM MOPS, pH 7,0
75 mM CaCl₂
10 mM KCl
15 % (v/v) Glycerin

Beide Lösungen wurden steril filtriert und bei 4°C gelagert.

TymBroth:

2 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
100 mM NaCl
10 mM MgCl₂

LB-Agar:

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
10 g/l NaCl
2 % (w/v) Agar

Die pH-Werte beider Ansätze wurden mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und die Lösungen autoklaviert.

2.5.1.2 Transformation

200 µl kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 - 50 µg Vektor-DNA (in einem maximalen Volumen von 10 µl) gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurde die Suspension sofort für exakt 90 s in ein auf 42°C temperiertes Wasserbad überführt und für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl vorgewärmten Psi Broth (LB-Medium mit 4 mM MgSO₄ und 10 mM KCl) wurde die Suspension für 1 h bei 37°C geschüttelt, 2 min bei 3000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert und das Pellet in 200 µl des Überstandes resuspendiert. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren

der Suspension auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten und ü/N-Inkubation bei 37°C im Brutschrank.

2.5.1.3 Blau-Weiss-Selektion

Zur Identifizierung rekombinanter Klone nach der Zwischenklonierung von cDNAs in pPCR-Vektoren und anschließender Transformation in *E. coli* XL-10 gold wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten mit 80 µg/ml X-Gal und 10 mM IPTG ausplattiert und für 17 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Kolonien, die Vektoren mit Inserts enthalten, sind weiß, während Kolonien mit religierten Vektoren blau erscheinen. Weiße Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, in 10 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und ü/N bei 37°C inkubiert. Die Plasmide wurden wie beschrieben isoliert, einer Restriktionsanalyse unterzogen und Plasmide mit der passenden Insertgröße zur Sequenzierung aufbereitet.

2.5.1.4 Colony Blot

Der Colony Blot ist ein Verfahren zur Identifizierung von Bakterienklonen, die das klonierte Zielprotein in höchst möglichen Mengen exprimieren. Dazu wurde durch Auflegen einer Nitrozellulose-Membran auf die LB-Agarplatte mit den Bakterienkolonien eine Replika erzeugt, welche mit der Kolonieseite nach oben auf eine LB-Agarplatte mit 1 mM IPTG und den entsprechenden Antibiotika gelegt und für 4 h bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde die Nitrozellulosereplika auf Filterpapiere gelegt und dort wie folgt bei RT inkubiert:

- 10 min in SDS-Lösung
- 5 min in Denaturierungslösung
- 5 min in Neutralisierungslösung
- 5 min in zweiter Neutralisierungslösung
- 15 min in 2xSSC

Anschließend wurde die Replika zweimal für je 10 min mit TBS gewaschen, 1 h bei RT in Blockierungslösung inkubiert und zweimal für 10 min in TBS-Tween/Triton-Puffer bzw. TBS gewaschen. Die bakteriellen Proteine waren nun an die Nitrozellulose gebunden und die bakteriellen Zelltrümmer entfernt. Die Replika konnte nun wie in 2.2.12.2 beschrieben, mit Gelatine abgeblockt und mit Primär- bzw. Sekundärantikörpern inkubiert werden. Die Entwicklung des Blots erfolgte kolorimetrisch mit alkalischer Phosphatase und Entwicklung mit NBT/BCIP.

Die Lage der positiven Spots wurde mit der Lage der Kolonien auf der Masterplatte verglichen, die entsprechenden Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in LB-Medium mit Antibiotikazusatz überführt. Nach ü/N-Inkubation wurden die Suspensionen zu Glycerinkulturen verarbeitet und verwahrt, oder direkt zur großskaligen Proteinexpression weiter verwendet.

Lösungen für den Colony Blot:

SDS-Lösung:	10 % (w/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)
Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4
20XSSC, 500 ml:	87,65 g NaCl, 50,25 g Natriumcitrat x 2 H ₂ O
TBS-Tween/Triton-Puffer:	TBS mit 0,05 % Tween20 und 0,2 % Triton X-100

2.5.2 Glycerinkulturen

Bakterienstämme und rekombinanten Klone wurden in LB-Medium mit 15 % (v/v) Glycerin bei -80°C für 2 - 3 Jahre gelagert. Zur Herstellung wurden 850 µl einer logarithmisch wachsenden Bakterienkultur mit 150 µl sterilem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Verwendung wurden sie auf Eis aufgetaut, auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und diese ü/N im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine Methode dar, die die Lokalisation von Strukturen oder Makromolekülen in lichtmikroskopischen Objekten ermöglicht. Da die direkte Fluoreszenz (Primärfluoreszenz) objekteigener Substanzen in der Regel sehr schwach ausgeprägt und wenig spezifisch ist, werden Fluorochrome mit einer hohen Affinität zu bestimmten Molekülen oder Strukturen eingesetzt (Sekundärfluoreszenz). Ein weiteres Mittel zur spezifischen Bindung von Fluorochromen an objekteigene Strukturen ist die Verwendung von fluorochromgekoppelten Antikörpern, wobei die hohe Bindungsaffinität von Antikörpern an bestimmte Antigene ausgenutzt wird.

2.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht die Lokalisation von bestimmten Makromolekülen in lichtmikroskopischen Präparaten über zweistufige Antigen-Antikörper-Reaktionen. Dabei werden über einen Erstantikörper bestimmte Antigene im Präparat erkannt und dieser über einen fluorochromgekoppelten Zweitantikörper detektiert.

Lösungen:

PBS:	0,137 M NaCl, 2,6 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,01 % (w/v) NaN ₃ , pH 7,4
Fixative:	4 % (w/v) Formaldehyd in PBS; 100 % Methanol, -20°C
Tritonlösung:	0,1 % (v/v) Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol) in PBS
Bleichlösung:	1 mg/ml NaBH ₄ in PBS
Blockierung:	10 % (v/v) Horse Serum (HS) und 3 % (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS

Einbettungsmedium:

Als Einbettungsmedium wurde eine Mischung aus *n*-Propyl-Gallat und drei Teilen Moviol verwendet, die kurz vor Gebrauch angesetzt und für maximal vier Wochen bei 4°C dunkel gelagert wurde.

Moviol:

20 g Moviol (Moviol 4.88, Hoechst) wurden in 80 ml PBS ü/N unter Rühren bei RT gelöst, mit 40 ml Glycerin versetzt und ü/N gerührt. Nach Zentrifugation (1 h, 15.000 rpm) wurde der Überstand abgezogen und bei 4°C gelagert.

n-Propyl-Gallat:

2,5 g *n*-Propyl-Gallat (Sigma) wurden in 50 ml PBS gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Nach Zugabe von 50 ml Glycerin wurde die Lösung ü/N gerührt und bei 4°C dunkel gelagert.

Durchführung:

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei RT in einer feuchten Kammer auf einem Taumel-schüttler unter leichter Agitation durchgeführt.

2 Material und Methoden

Die für die Immunfluoreszenz vorgesehenen Proben (C_2C_{12} - und Glattmuskelzellen, Gefrierschnitte und isolierte Zellkerne) wurden auf mit Chromschwefelsäure gereinigte Deckgläschen aufgebracht und bis zu einer Stunde mit 4 % PFA in TBS fixiert. Nach dem Waschen der Proben für 10 min mit TBS wurden sie, mit Ausnahme der für die Inkubation mit dem 2G2-Antikörper vorgesehenen Proben, für 2 min mit auf -20°C temperiertem Methanol fixiert. Im Anschluß an die Fixierung wurden die Proben zweimal für je 5 min mit TBS gewaschen, für 30 min mit Blockierungslösung inkubiert, 5 min mit Bleichlösung versetzt und zweimal mit TBS für je 5 min gewaschen. Es folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (s. Tabelle) in TTBS für 1 h. Bei Doppelimmunfluoreszenzpräparaten wurden beide Antikörper simultan appliziert.

Antigen	Quelle	Klon/Serum	Verdünnung
Vinculin	Sigma, V-9131	hVin-1	1:500
α -Actinin	Sigma, A-5044	BM 75.2	1:200
G-Actin	AG Biochem. Zellbiol., Uni Bielefeld	2G2	1:200
β -NM-Actin	Sigma, A-4700	-	1:200
CapZ	AG Biochem. Zellbiol., Uni Bielefeld	Serum 1.2, aff. pure	1:100
CapZ β_2 Peptid- antiserum	Diese Arbeit	150. Immunisierungstag	1:200
Maus-IgG	Sigma, FITC-konj.	-	1:300
Kaninchen-IgG	Sigma, TRITC-konj.	-	1:300

Die Proben wurden dreimal für je 5 min mit TTBS gewaschen und für 30 min mit den Zweitantikörpern in TTBS inkubiert. Bei Doppelfluoreszenzversuchen wurden beide Sekundärantikörper simultan appliziert. Es folgten drei abschließende Waschstschritte mit TTBS für je 10 min, wonach die Proben mit Eindeckungsmedium versehen und auf Objektträger gelegt wurden. Die Deckgläschen wurden mit Gewindemuttern beschwert, ü/N zum Trocknen bei RT inkubiert und bis zur Mikroskopie bei 4°C dunkel gelagert.

2.6.2 Markierung mit rhodamingekoppeltem Phalloidin

Fluorochromierte Phallotoxine bieten eine einfache Möglichkeit der Färbung von F-Actin in der Fluoreszenzmikroskopie. Phallotoxine sind Alkaloide aus dem Knollenblätterpilz *Amanita phalloides*, die hoch affin an F-Actin binden und dieses stark stabilisieren. Durch die Kopplung von Fluorochromen können sie zur Detektion von F-Actin verwendet werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Phalloidin-Fluorochrom handelte es sich um

Rhodamin-Phalloidin (Sigma). Es wurde in Doppelfluoreszenzpräparaten in einer Verdünnung von 1:10 zusammen mit dem Sekundärantikörper in TTBS eingesetzt.

2.6.3 Kontrollfärbungen

Zur Verifizierung der Spezifität von lokalen Fluoreszenzen in gefärbten Präparaten wurden diese nur mit den Zweitantikörpern inkubiert. Blieb eine Färbung in der Fluoreszenzmikroskopie aus, so wurde davon ausgegangen, dass die Färbungen bei der indirekten Immunfluoreszenz auf spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen basierten.

2.6.4 Photodokumentation

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde an zwei Systemen durchgeführt:

- Gestaffelte Medial- und Serienaufnahmen wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica TCS SP2) durchgeführt und die Bilder mit der Carl Zeiss AIM-Software sowie dem 3D-Bildbearbeitungsprogramm Amira 3.1.1 aufgearbeitet.
- Allgemeine Immunfluoreszenzaufnahmen wurden am Olympus-BH2 Fluoreszenzmikroskop (OM System/Fluoreszenzfilter) mit angeschlossener Hamamatsu-CCD-Kamera und der Steuerungssoftware Argus 20 durchgeführt.

DNA- und RNA-Gelfotos, SDS-Gele und Immunblots wurden auf einem PC-Flachbettscanner (z.T. mit aufgesetztem Durchlichtadapter) gescannt. Die Bearbeitung erfolgte mit gängiger Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop und Adobe Illustrator).

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinantes CapZ

3.1.1 Klonierungsstrategie

Auf der Grundlage verschiedener publizierter cDNA-Sequenzen für die CapZ-Untereinheiten α_1 , α_2 , β_1 und β_2 aus Mammalia wurden Oligonukleotidpaare entworfen, mit denen die vollständigen codierenden Bereiche aller vier Transkripte in der PCR erzeugt werden konnten. Diese Bereiche umfassten 861bp bei der α_1 - und bei der α_2 -Untereinheit sowie 834bp bei der β_1 - und 846bp bei der β_2 -Untereinheit.

Die CapZ-cDNAs wurden mit ihren endogenen Start- und Stop-Codons in den Expressionsvektoren platziert, um heterologe Sequenzanteile zu eliminieren. Dazu wurden Sinnprimer mit NcoI-Schnittstellen über die Translationsstarts gelegt. Zur Termination der Translation wurden die endogenen Stop-Codons verwendet. Die Gegensinnprimer wurden so stromabwärts gelegt, dass sie entweder exogen amplifizierten oder das Stop-Codon mit einschlossen, ansonsten aber exogen lagen. Sie enthielten BamHI-, HindIII- oder BglII-Schnittstellen. Einerseits wurde ein Teil der PCR-Produkte über diese Schnittstellen in die Expressionsvektoren kloniert, andererseits wurden Schnittstellen des Klonierungsvektors genutzt, um die PCR-Produkte in die Expressionsvektoren zu klonieren. Da bisher keine cDNA- und RNA-Sequenzen zu den CapZ-Untereinheiten aus *sus scrofa* vorlagen, kann im Vergleich zu den Sequenzen anderer Spezies nur abgeschätzt werden, ob sich durch diese Klonierungsstrategie die Translationsprodukte der hergestellten Expressionskonstrukte geändert haben.

In Abbildung 3.1 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte gezeigt. Die Amplifikation der CapZ-cDNAs konnte sehr spezifisch bei primerabhängigen Annealingtemperaturen (s. Material und Methoden) durchgeführt werden. Die amplifizierten cDNAs hatten eine Länge von ca. 960 bp (α_1 - und α_2 -cDNAs) bzw. 840 bp (β_1 - und β_2 -cDNAs).

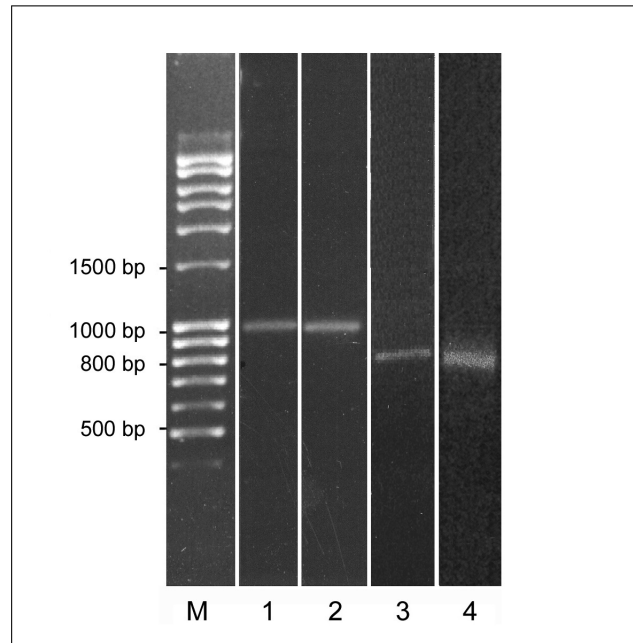


Abbildung 3.1: RT-PCR-Produkte. Gelelektrophoretische Auftrennung der (1) CapZ α_1 -, (2) CapZ α_2 -, (3) CapZ β_1 - und (4) CapZ β_2 -cDNAs. M: 100bp-Leiter

3.1.2 Klonierung der cDNAs

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung der vier CapZ-Untereinheiten diente Gesamt-RNA aus dem Glattmuskel des Schweinemagens (für die α_2 - und β_1 -Untereinheit) bzw. aus der Milz vom Schwein (α_1 - und β_2 -Untereinheit). Diese wurde, je nach Gewebe, unterschiedlich aufgereinigt und mittels der reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Nach präparativer PCR wurden die Produkte aufgereinigt, die bestehenden Einzelstrangüberhänge mittels *Pfu*-Polymerase aufgefüllt und in den Klonierungsvektor pPCR-Script Amp SK(+) zwischenkloniert. Rekombinante Transformanden wurden über Blau-Weiß-Selektion identifiziert und deren Plasmid-DNA über eine Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Rekombinante Klone mit dem gewünschten Insert wurden mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA durch Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten. Nach präparativer Agarosegelelektrophorese wurden die gewünschten Inserts aus dem Gel aufgereinigt und mit den entsprechenden, geöffneten Expressionsvektoren ligiert. Die entstandenen Expressionsplasmide (alle pQE60 mit Inserts) wurden anfänglich in *E. coli* M15[pRep4] bzw. SG13009[pRep4] transformiert und positive Klone über Antibiotika-Selektion und Colony-Blot-Analysen identifiziert.

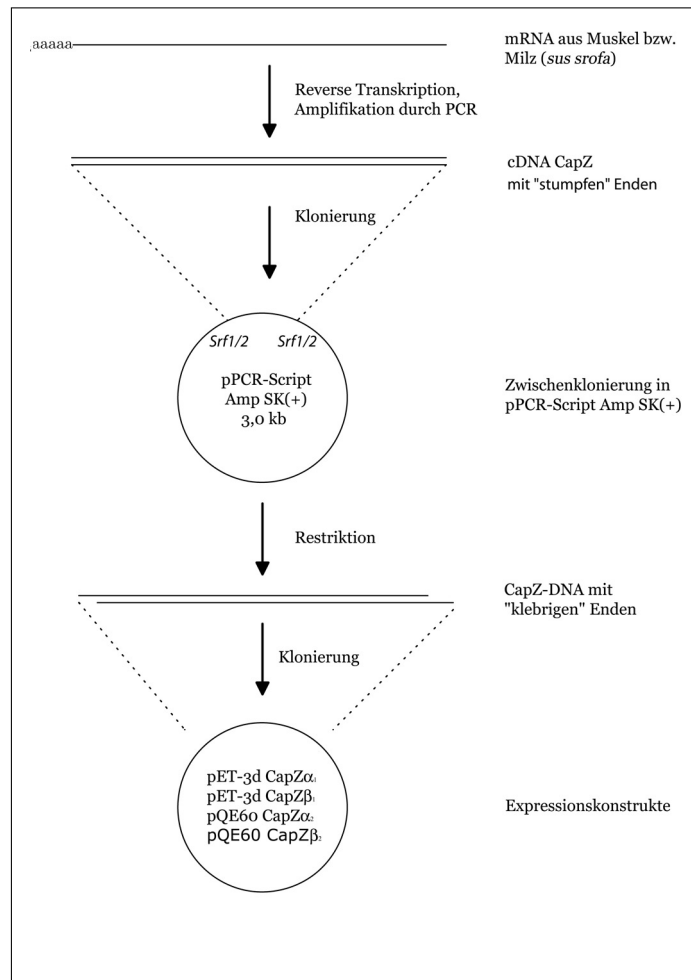


Abbildung 3.2: Flußdiagramm zur Klonierung der CapZ-cDNAs. Die in der RT-PCR erzeugten Amplifikate wurden zunächst in den Klonierungsvektor pPCR-Script Amp SK(+) eingefügt und die Inserts nach Restriktionsanalyse sequenziert. Nach Restriktion der Inserts mit den entsprechenden Endonukleasen wurden diese abschließend in die jeweiligen Expressionsvektoren kloniert.

Es ergab sich jedoch, daß sich die CapZ α_1 - und CapZ β_1 -Untereinheiten in diesem System nicht zufriedenstellend exprimieren ließen, da die Expressionsraten beider Proteine äußerst gering waren. Eine Analyse der *codon usage* (Häufigkeit, mit der bestimmte Codons in *E. coli* verwendet werden) mit Hilfe des Online-Programms *graphic codon analyser* zeigte, dass im Bereich der Aminosäuren 37 bis 48 der α_1 -Untereinheit insgesamt sechs seltene Codons und bei der β_1 -Untereinheit drei seltene Codons im Bereich von AS 33-35 lagen. Dies führte bei der bakteriellen Expression zu Kettenabbrüchen während der Proteinsynthese. So wurde durch supplementierte Medien und verringerte Expressionstemperaturen sowie längere Expressionszeiten und variierte Induktorkonzentrationen versucht, die Expressionsraten zu steigern. Diese Maßnahmen führten jedoch nicht zu einer nennenswerten Steigerung der Proteinexpression. Eine Lösung des Problems biete die Verwendung von Bakterienstämmen, deren Gehalt an seltenen tRNAs durch Einschleusen

3 Ergebnisse

von Zusatzkopien der entsprechenden tRNA-Gene erhöht wurde. Diese zusätzlichen Gene lagen dabei auf Plasmiden und waren mit starken Promotoren sowie Antibiotikaresistenzgenen versehen. In dieser Arbeit wurde für die Expression von rekombinanten CapZ α_1 - und - β_1 -Untereinheiten der *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL verwendet, der zusätzliche Kopien der Gene *argU* (AGA, AGG), *ileY* (AUA), *leuW* (CUA) und *proL* (CCC) besitzt.

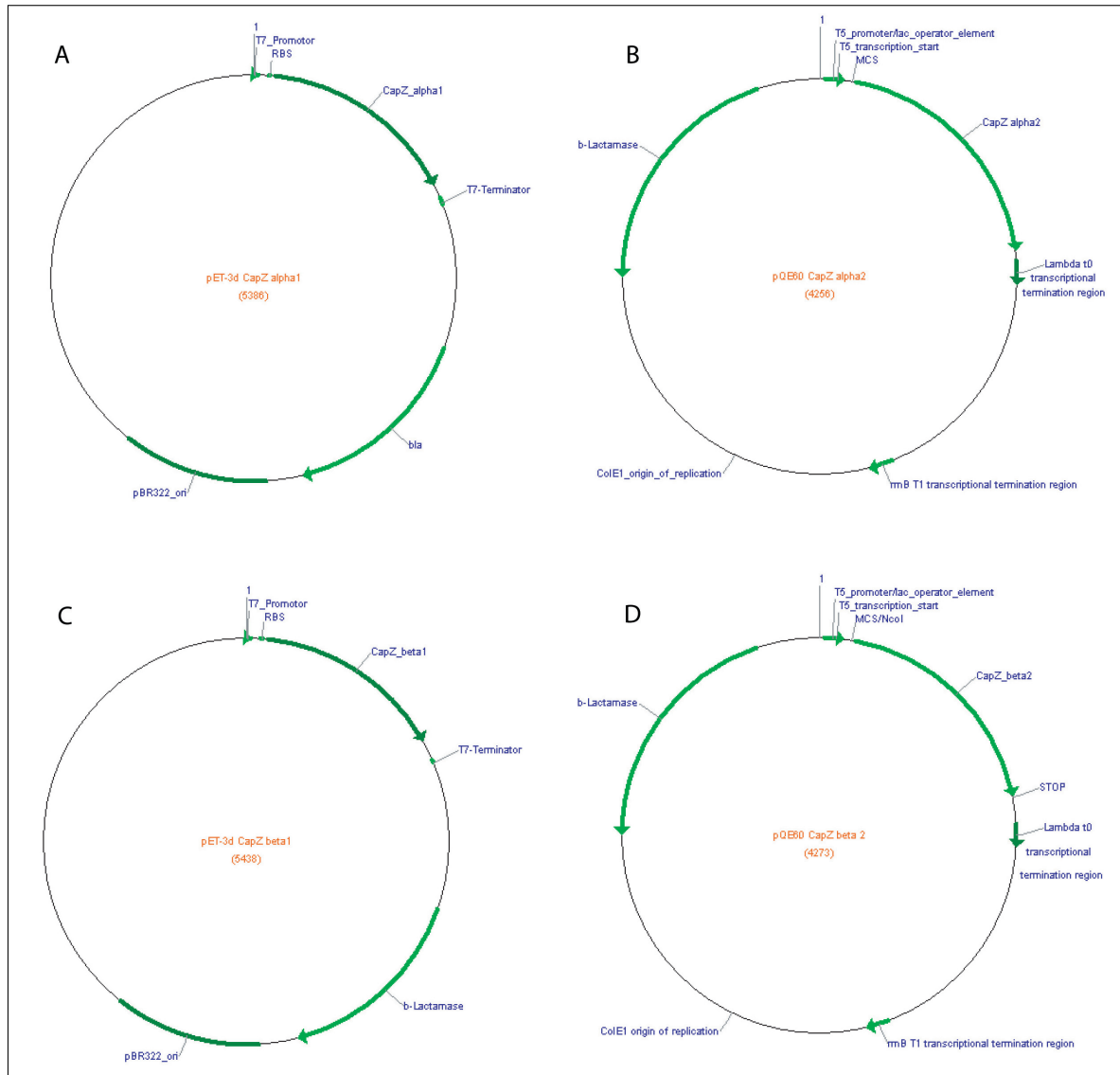


Abbildung 3.3: CapZ-Expressionskonstrukte. Vektoren pET-3dCapz α_1 , 5386bp (A), pQE60CapZ α_2 , 4256bp (B), pET-3dCapZ β_1 , 5438bp (C) und pQE60CapZ β_2 , 4372bp (D). Zusätzlich zu den Inserts sind u.a. die jeweiligen Antibiotikaresistenzgene markiert.

3.1.3 Sequenzanalyse der CapZ-cDNAs

Die in die Expressionsvektoren klonierten CapZ-cDNAs wurden in Sinn- und Gegenrichtung mit vektorspezifischen Oligonukleotiden sequenziert (Sequenzen s. Anhang). Die Sequenzierungen wurden von der Firma IIT-Biotech GmbH (Bielefeld) durchgeführt. cDNA-Sequenzen von CapZ aus *sus scrofa* sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht veröffentlicht worden. Der Abgleich der ermittelten Sequenzen erfolgte daher mit bereits bekannten Sequenzen aus anderen Organismen durch das Online-Programm „blastn“ des NCBI. Außerdem wurden die vom IIT ermittelten Sequenzen in Aminosäuresequenzen translatiert (Genamics Expression) und durch das Online-Programm „blastp“ mit CapZ-Aminosäuresequenzen anderer Spezies verglichen. Es ergaben sich folgende Abweichungen:

- Das Translationsprodukt des Vektors pET-3dCapZ α_1 zeigte zwei Unterschiede im Vergleich zu Sequenzen vom *homo sapiens* (gi:62898013, gi:12652785, gi: 5453597): AS115 (Gly \rightarrow Ser) und AS147 (Thr \rightarrow Asn).
- Das Translationsprodukt des Expressionsvektors pET-3dCapZ β_1 zeigte an Position 2 einen Aminosäureaustausch von (Gly \rightarrow Ser), sowie einen Austausch an Position 206 (Ser \rightarrow Cys) im Vergleich zu Sequenzen vom *homo sapiens* (gi:55665442, gi:55664835, gi:13124696).

Die beobachteten Abweichungen in den Aminosäuresequenzen lassen sich durch einzelne Nukleotidsubstitutionen in den Basentriplets erklären. So führt beispielsweise die Substitution von G \rightarrow A im ersten Nukleotid des Tripletts GGC (Gly) zu AGC (Ser).

3.1.4 Analyse des Expressionsverlaufs

Die Expression der einzelnen rekombinanten CapZ-Untereinheiten wurde in getrennten Kulturen vorgenommen und der Expressions- sowie Wachstumsverlauf durch gelelektrophoretische Analyse von Bakteriengesamtextrakten (Abbildung 3.4, jeweils (3)-(5)) und photometrischen Streulichtmessungen vorgenommen. Die Bakterien wurden entsprechend dem Beginn der stationären Wachstumsphase nach 4 h geerntet. Längere Kultivierungszeiten zeigten keine wesentliche Steigerung der Expressionsrate. Zudem konnte durch die relativ kurzen Expressionszeiten eine Proteolyse der rekombinanten Proteine durch bakterielle Proteasen weitgehend vermieden werden.

Die rekombinanten CapZ-Untereinheiten wurden in bakteriellen Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) abgelagert, deren Gehalt an rekombinantem Protein bei ca. 90% lag. Insgesamt lagen die Mengen an exprimierten, rekombinanten Proteinen bei ca. 90 mg (CapZ α_1), ca. 50 mg (CapZ α_2), ca. 80 mg (CapZ β_1) und ca. 35 mg (CapZ β_2) pro Liter

Bakterienkultur.

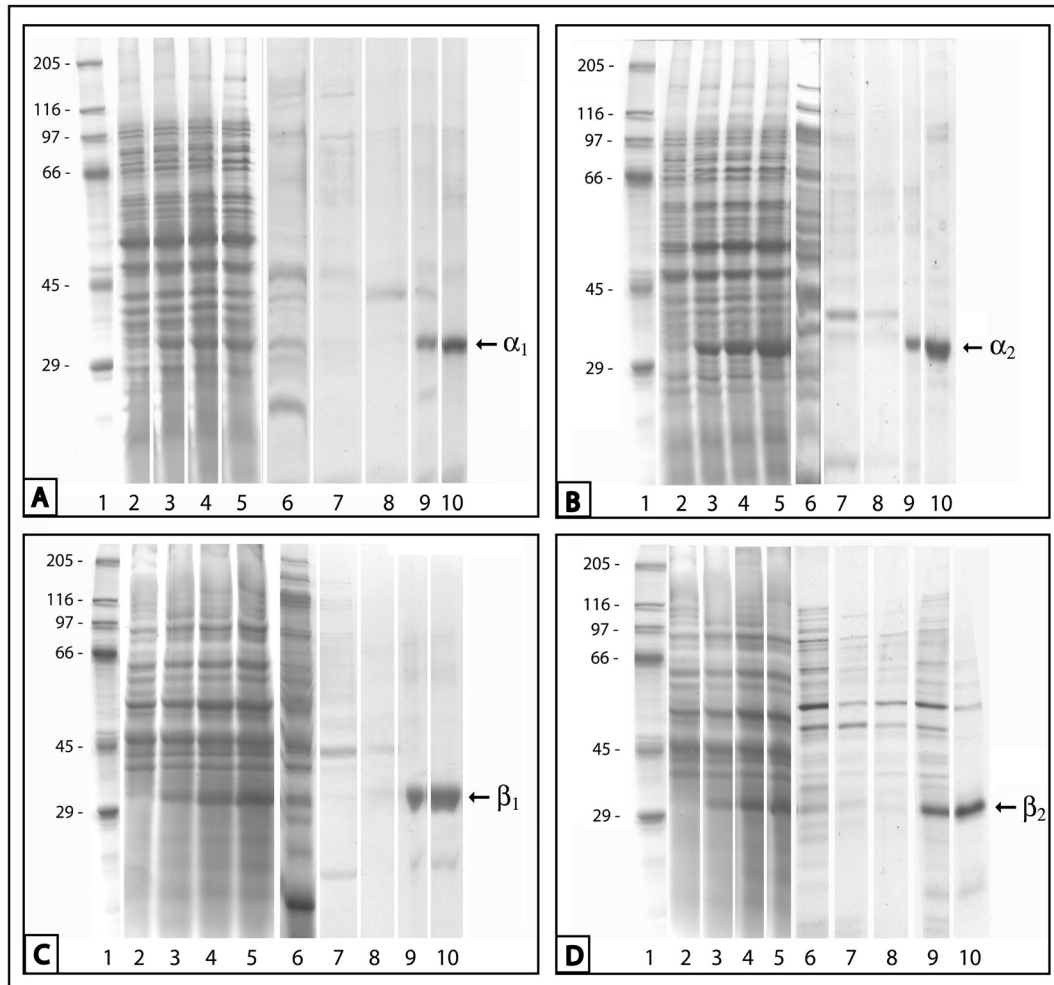


Abbildung 3.4: Expression und Aufreinigung der rekombinanten CapZ-Untereinheiten. (A) CapZ α_1 , (B) CapZ α_2 , (C) CapZ β_1 , (D) CapZ β_2 . (1) HMW; (2) Expressionskultur vor Induktion; Expressionskultur 1 h (3), 2,5 h (4), 4 h (5) nach Induktion durch 1 mM IPTG. (6) - (8) Überstände nach Ultraschalllyse und Waschen mit detergenzhaltigen Puffern; (9) *inclusion bodies*; (10) durch Ionenaustauschchromatographie gereinigte rekombinante Untereinheiten. Angaben in kDa.

3.1.5 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *inclusion bodies* bietet neben dem Vorteil der schnellen und einfachen Isolierung jedoch den Nachteil, dass die Proteine oft parakristallin und damit denaturiert vorliegen. Um sie in Lösung zu bringen, müssen sie mit stark denaturierenden Agenzien wie z.B. Harnstoff oder Guanidinisothiocyanat in hochmolaren Konzentrationen versetzt werden. In Abb. 3.4 ist die Aufreinigung der rekombinanten

CapZ-Untereinheiten dargestellt. Nach der Lyse der Bakterien mit Ultraschall und dreimaligem Waschen der Zelltrümmer mit verschiedenen detergenzhaltigen Puffern (Abbildung 3.4, jeweils (6)-(8)) lassen sich die *inclusion bodies* selektiv anreichern (Abbildung 3.4 (9)). Sie wurden mit Harnstoff denaturiert und zur weiteren Reinigung wurden die rekombinanten Proteine auf eine DEAE-Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen KCL-Gradienten von 50- 500 mM unter weiterhin denaturierenden Bedingungen (Abbildung 3.4 (10)). Die gesammelten Fraktionen enthielten die rekombinanten Proteine mit Reinheitsgraden von ca. 80% - 95% und wurden anschließend zur Renaturierung verwendet.

3.1.6 Renaturierung

Zur Rückfaltung der rekombinanten Heterodimere und einzelner Untereinheiten wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

- Schnelles Verdünnen der harnstoffhaltigen Lösung und anschließende Rückfaltung durch temperierte Inkubation für 24h.
- Langsamer Austausch des Harnstoffs durch Dialyse.

3.1.6.1 Renaturierung durch schnelles Verdünnen

In Anlehnung an die Methode von Remmert [152] wurden die denaturierten Untereinheiten simultan zum Rückfaltungspuffer in einer Konzentration von 15-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und einer Harnstoffkonzentration von maximal 80 mM zugegeben. Nach \bar{u}/N -Inkubation

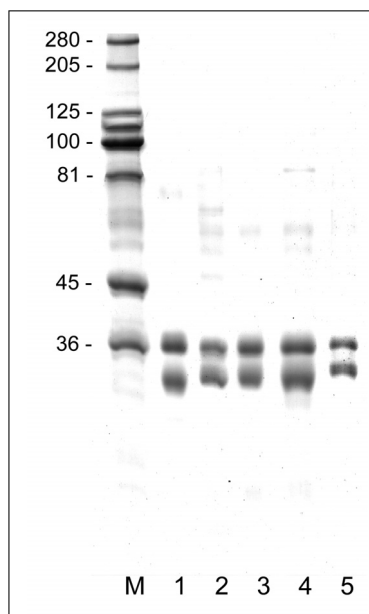


Abbildung 3.5: Gelelektrophoretische Analyse der renaturierten Heteromere. Nach Renaturierung durch schnelles Verdünnen und Aufreinigung der CapZ-Heterodimere wurden die Proteine einer SDS-PAGE unterzogen. Es konnten die Isoformkombinationen $r\text{CapZ}\alpha_1\beta_1$ (2), $r\text{CapZ}\alpha_1\beta_2$ (3), $r\text{CapZ}\alpha_2\beta_1$ (4) und $r\text{CapZ}\alpha_2\beta_2$ (5) rückgefaltet werden. M Marker; (1) natives CapZ; Angaben in kDa.

bei 14°C, Ankonzentrierung durch Ionenaustauschchromatographie über eine MonoQ fast flow-Säule und weiterer Ankonzentrierung über eine Amicon-Rührzelle sowie präparativer Gelfiltration über eine Sephadex 16/60-Säule wurden die Rückfaltungsprodukte hinsichtlich ihrer Homogenität und Aktivität untersucht. Es konnten die Heterodimere rCapZ $\alpha_1\beta_1$, rCapZ $\alpha_1\beta_2$, rCapZ $\alpha_2\beta_1$ und rCapZ $\alpha_2\beta_2$ rückgefaltet werden (Abbildung 3.5).

3.1.6.2 Renaturierung durch Dialyse

Da die Rückfaltung nach der modifizierten Methode von Remmert [152] relativ zeitaufwändig war und sich einzelne rCapZ-Untereinheiten nur in geringem Maße oder im Fall der rCapZ α -Untereinheiten überhaupt nicht rückfalten ließen, wurde über einen *fractional factorial protein refolding screen* ein alternativer Rückfaltungsweg gesucht. Dieser Screen beinhaltete 48 verschiedene Puffer, durch deren Zusammensetzung sich Proteinfaltungsfaktoren wie Proteinkonzentration, polare Additive, Detergenzien, pH-Wert, chaotrophe Reagenzien, Ionenstärke, divalente Kationen und nichtpolare Additive evaluieren ließen. Als Standard-Proteine zum Test der einzelnen Puffer wurden die rCapZ-Untereinheiten α_2 und β_1 zusammen eingesetzt. Der Rückfaltungserfolg nach Dialyse und Zentrifugation wurde über einen F-Actin-Depolymerisationsansatz mit pyrenmarkiertem Actin beurteilt. Die in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Aktivitäten ergeben sich aus der Fluoreszenzabnahme bei der Messung der Rückfaltungsansätze nach 400 s in Relation zur Messung des nativen CapZs und des Actins ohne Zusatz von Effektoren. Die Aktivität des nativen CapZs wurde mit 100% angenommen. Somit ergibt sich:

$$\text{Aktivität (in \%)} = 1 - \left(\frac{\Delta A_P}{\Delta A_0 - \Delta A_K} \right) * 100\%$$

wobei ΔA_P die Differenz aus Anfangs- und Endfluoreszenz des Renaturierungsansatzes, ΔA_0 die Differenz aus Anfangs- und Endfluoreszenz der Actin-Kontrolle und ΔA_K die Differenz aus Anfangs- und Endfluoreszenz des Ansatzes mit nativem CapZ darstellt.

Das in Puffer 5 des *fractional factorial protein refolding screens* rückgefaltete rCapZ-Heterodimer zeigte die stärkste Capping-Aktivität (s. Tabelle 3.1). Dieser Puffer wurde in zwei weiteren *Screens* hinsichtlich pH-Wert und Zusatz verschiedener Detergenzien weiter optimiert (s. Material und Methoden). Nach der Optimierung wurden die Rückfaltungsprodukte über eine Gelfiltration analysiert, um über die Symmetrie und Basisbreite der einzelnen Ausschläge im Elutionsprofil zusätzliche Aussagen über die Homogenität hinsichtlich der Faltung der applizierten Proteine zu erhalten.

3 Ergebnisse

Puffernummer/ Kontrolle	ΔA	Aktivität (in %)	Puffernummer	ΔA	Aktivität
Actin	813	-	8	466	36%
Nat. CapZ	87	100%	9	563	22%
1	554	23%	10	401	45%
2	597	18%	11	553	24%
3	407	44%	12	484	33%
4	450	38%	13	414	43%
5	263	64%	14	538	26%
6	520	28%	15	394	46%
7	545	25%	16	503	31%

Tabelle 3.1: Aktivität des rekombinanten CapZ-Heterodimers $\alpha_2\beta_1$ nach Renaturierung in verschiedenen Rückfaltungspuffern. Nach Inkubation und Dialyse wurde die Aktivität der Proteine in Actindepolymerisationsmessungen untersucht.

3.1.6.3 Analytische Gelfiltration der Rückfaltungsprodukte

Die simultane Rückfaltung der verschiedenen Heterodimere führte, ähnlich wie beim nativen CapZ, bei der analytischen Gelfiltration über zwei in Tandem geschaltete Superdex200 HR-Säulen zu Elutionsprofilen mit symmetrischem Peak bei einem Elutionsvolumen von ca. 29 ml. Dies entspricht einer Molekularmasse von ca. 68 kDa (Abb. 3.6). Die rCapZ $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_1\beta_2$ -Heterodimere eluierten ca. 0,2 - 0,5 ml nach dem Elutionspeak des nativen CapZs (Abb. 3.6 A), während die rCapZ $\alpha_2\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimere an gleicher Stelle wie das native CapZ eluierten (Abb. 3.6 B). Vor dem Hauptpeak der rekombinanten Heterodimere ist, im Gegensatz zum nativen CapZ, im Elutionsprofil jeweils ein weiterer, kleinerer Peak bei Volumen 28 ml zu erkennen. Hierbei handelt es sich offenbar um fehlgefaltete Heterooligomere. Außerdem weisen die Elutionsprofile in Abbildung 3.6 B im Bereich von ca. 31 ml einen kleinen Peak auf, der von einzeln rückgefalteten rCapZ β -Untereinheiten stammen könnte.

Die Amplitude der Hauptpeaks variiert je nach Zusammensetzung der einzelnen Heterodimere. So ist sie, mit Ausnahme des $\alpha_1\beta_2$ -Heterodimers, kleiner als beim nativen CapZ. Da bei allen analytischen Gelfiltrationsläufen die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, steht zu vermuten, dass die Bildung von Heterooligomeren, die vor dem Heterodimer eluierten, dafür verantwortlich ist.

Insgesamt zeigen die Elutionsprofile der rekombinanten CapZs weitgehende Homogenität hinsichtlich der Symmetrie des Hauptpeaks und die ermittelten Molekularmassen entsprechen denen des nativen Proteins. So kann davon ausgegangen werden, dass die rekombi-

nanten renaturierten Proteine größtenteils zu Heterodimeren rückgefaltet wurden.

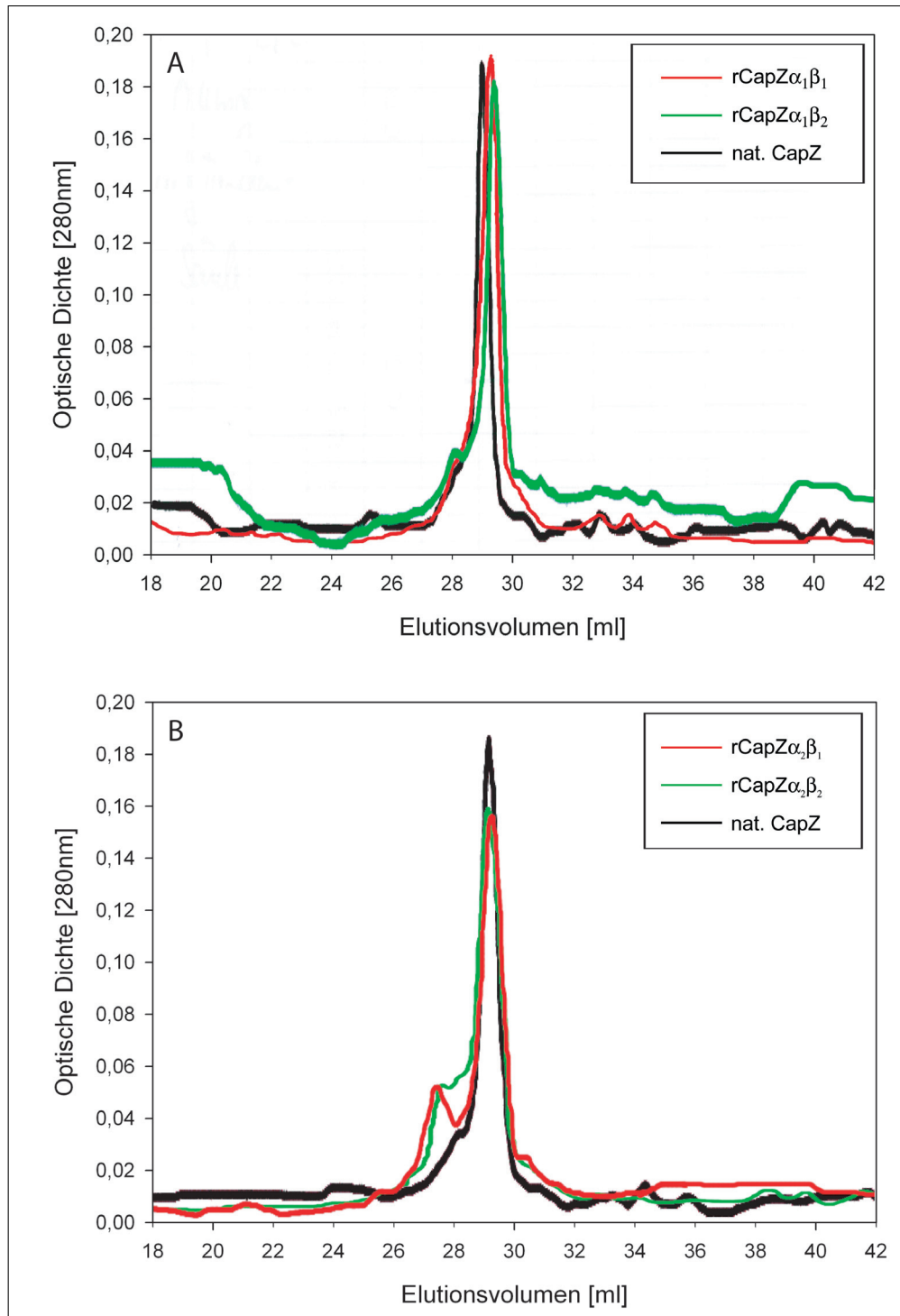


Abbildung 3.6: Analytische Gelfiltration der rückgefalteten rCapZ-Heterodimere. Jeweils 500 μg Protein wurden auf zwei in Reihe geschaltete Superdex-200 Säulen appliziert und mit einer Flußrate von 0,5 ml/min eluiert. (A) Rot: rCapZ $\alpha_1\beta_1$, grün: rCapZ $\alpha_1\beta_2$, schwarz: natives CapZ; (B) Rot: rCapZ $\alpha_2\beta_1$, grün: $\alpha_2\beta_2$, schwarz: natives CapZ

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die einzelnen rCapZ-Untereinheiten auch separat unter den gleichen Bedingungen wie die Heterodimeren renaturieren lassen. Zur Kontrol-

le der Renaturierung wurde ebenfalls die analytische Gelfiltration eingesetzt (Abbildung 3.7). Im Elutionsprofil der rCapZ α -Untereinheiten liegt der Maximalausschlag bei einem Volumen von ca. 31 ml (Abbildung 3.7 A). Dies entspricht einer Molekularmasse von ca. 34-38 kDa. Allerdings ist ab einem Volumen von ca. 24 ml bereits ein langsames Ansteigen der Extinktion zu beobachten, was durch die Bildung von Oligomeren erklärt werden kann.

Nach dem Hauptpeak der Elutionsprofile ist ein langsames Abnehmen der Extinktion zu erkennen. Bei den hier eluierenden Proteinen handelt es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen durch bakterielle Proteine, die während der Rückfaltung im Vergleich zu den rCapZ α -Untereinheiten in verstärktem Maße renaturierten und sich dadurch selektiv anreicherten. Die ermittelten Molekularmassen der α -Untereinheiten sowie die Symmetrie der Hauptpeaks lassen auf die partielle Rückfaltung der Untereinheiten schließen. Der Renaturierungsansatz enthält vermutlich noch Verunreinigungen durch bakterielle Proteine sowie aggregierte α -Untereinheiten.

Das Elutionsprofil der beiden CapZ β -Untereinheiten (Abbildung 3.7 B) zeigt einen Maximalausschlag bei ca. 31,5 ml. Dies entspricht einer Molekularmasse von ca. 30-34 kDa. Bei der β_2 -Untereinheit zeigt sich ein kleiner Anstieg der Extinktion bei ca. 27 ml. Dabei handelt es sich vermutlich ebenfalls um verbliebene bakterielle Verunreinigungen, die sich bei der Rückfaltung selektiv anreicherten. Peaksymmetrie und ermittelte Molekularmassen lassen auf separat renaturierte rCapZ β -Monomere schließen.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Säulenfraktionen bei der Aufreinigung der rekombinanten Heterodimere sowie der einzeln renaturierten Untereinheiten über eine Superdex 16/60-Säule sollte Aufschluss über die Homogenität der Rückfaltungsprodukte bei der präparativen Renaturierung geben (Abbildung 3.8). Durch Auswahl von Fraktionen ohne fehlgefaltete Proteine und ohne Verunreinigungen durch bakterielle Proteine wurden so nur korrekt gefaltete, reine Heterodimere für weiterführende biochemische Charakterisierungen verwendet.

Natives CapZ eluierte hauptsächlich in Fraktion 56 (nicht gezeigt). Die CapZ- α -Untereinheiten eluieren bei verschiedenen Volumina: Oligomere Rückfaltungsprodukte eluieren von Fraktion 50 bis 56 (Abbildung 3.8). Diese Fraktionen wurden verworfen und nur die Fraktionen 60 - 62 mit einzelnen Untereinheiten für weitere Messungen eingesetzt. Die CapZ β -Untereinheiten eluieren im Bereich von Fraktion 58 bis 64 als nicht aggregierte Monomere. Diese Fraktionen wurden für weitere Messungen verwendet. Die renaturierten rCapZ-Heterodimere, hier in den Kombinationen $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_2$ gezeigt, eluieren in den Fraktionen 56 bis 64 und wurde für weitere Messungen verwendet. In den Fraktionen 50 bis 54 sind die beiden Untereinheiten nicht in gleichem stöchiometrischem Verhältnis vertreten, die Proben enthalten verstärkt die β -Untereinheit. Dies und der im Vergleich zum nativen CapZ frühe Elutionspunkt deuten auf eine Fehlfaltung der rekombinanten

CapZs zu Oligomeren hin. Die entsprechenden Fraktionen wurden verworfen. Ab Fraktion 64 eluierte bei allen Präparationen nur noch sehr wenig Protein, daher wurde auf die Darstellung der Proteinzusammensetzung von nachfolgenden Fraktionen verzichtet.

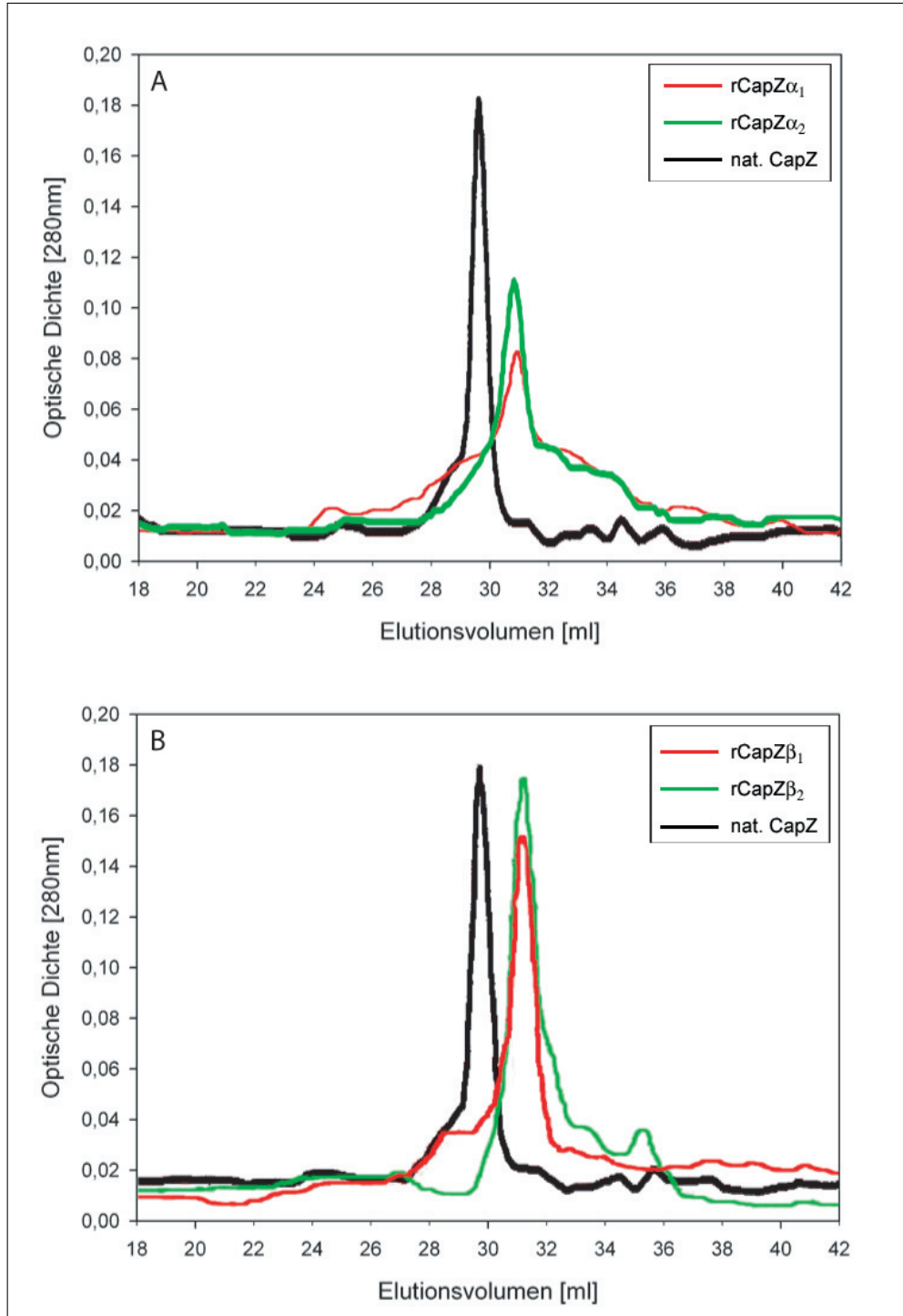


Abbildung 3.7: Analytische Gelfiltration der einzeln rückgefalteten rCapZ-Untereinheiten. Jeweils 500 μ g Protein wurden auf zwei in Reihe geschaltete Superdex-200 Säulen appliziert und mit einer Flußrate von 0,5 ml/min eluiert. (A) rCapZ α -Untereinheiten. Rot: rCapZ α_1 , grün: rCapZ α_2 , schwarz: natives CapZ; (B) rCapZ- β -Untereinheiten. Rot: rCapZ β_1 , grün: rCapZ β_2 , schwarz: natives CapZ.

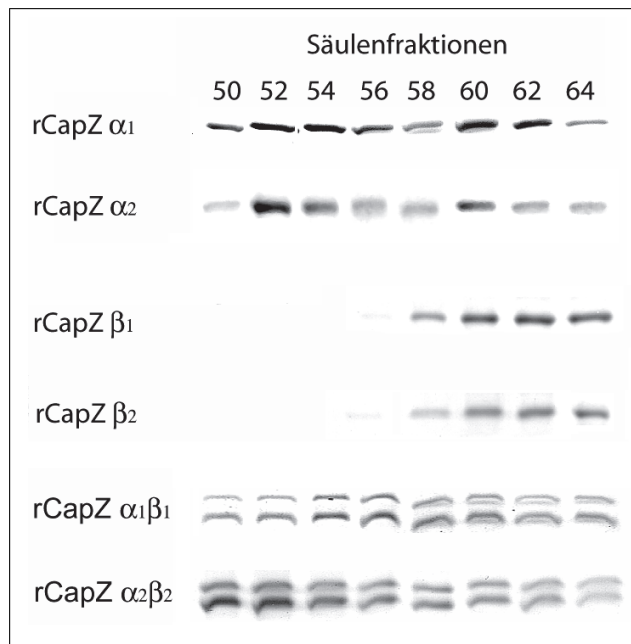


Abbildung 3.8: Gelelektrophoretische Analyse der Säulenfraktionen einer präparativen Gelfiltration von simultan renaturiertem rCapZ und den einzeln renaturierten CapZ-Untereinheiten. Proben einzelner Fraktionen (je 1,5 ml) der präparativen Gelfiltration über eine Superdex 16/60-Säule wurden entnommen, zu SDS-Proben aufgearbeitet und im 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die bei der Rückfaltung einzelner rCapZ-Untereinheiten entstandene Oligomere mit hoher Molekularmasse eluierten in den Säulenfraktionen 50 - 56, korrekt gefaltete Untereinheiten in den Fraktionen 58 - 64. Die bei der Renaturierung der rekombinanten Heterodimere gebildeten Oligomere mit hoher Molekularmasse eluierten in den Fraktionen < 50 - 54. Sie weisen einen höheren Anteil der β -Untereinheit auf. Korrekt gefaltete Heterodimere eluierten in den Fraktionen 56 - 64. Durch Auswahl geeigneter Fraktionen wurden für weiterführende Versuche nur korrekt gefaltete Mono- bzw. Heteromere verwendet. 15 %iges PAA-Gel, Ausschnitt.

3.1.6.4 Isoformspezifischen Rückfaltung von Heterodimeren

Basierend auf der Beobachtung, dass nativ isoliertes CapZ scheinbar immer eine Kombination von $\alpha_1\beta_2$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Untereinheiten aufweist, wurden Versuche durchgeführt, die zeigen sollten, ob die Information zum Zusammenführen genau dieser Isoformen bereits in der Struktur bzw. Aminosäuresequenz der einzelnen Untereinheiten enthalten ist. Dazu wurden in zwei verschiedenen Versuchsansätzen beide denaturierte α -Untereinheiten im molaren Verhältnis von 2:1 zu den jeweiligen denaturierten β_1 - bzw. β_2 -Untereinheiten gegeben und im Rückfaltungspuffer nach Remmert [152] simultan renaturiert. Ausschlaggebend dabei war, dass sich die α -Untereinheiten in diesem Puffer nicht separat renaturieren ließen und so nur $\alpha\beta$ -Heterodimere mit möglicherweise spezifischer Isoformverteilung

entstehen sollten.

Nach erfolgter Renaturierung wurden die Ansätze rCapZ $\alpha_1\beta_1$ und rCapZ $\alpha_1\beta_2$ ankonzentriert und über eine Superdex 16/60-Säule gefiltriert. Fraktionen im Bereich von 50-60 ml wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die stöchiometrische Verteilung beider Untereinheiten analysiert (Abbildung 3.9). Die Säulenfraktionen 50-54 enthielten verstärkt α -Untereinheiten und wurden verworfen. Die Säulenfraktionen 56-60 enthielten beide Untereinheiten in etwa gleichem stöchiometrischen Verhältnis. Sie wurden vereinigt, lyophilisiert und zu Proben für die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) verarbeitet.

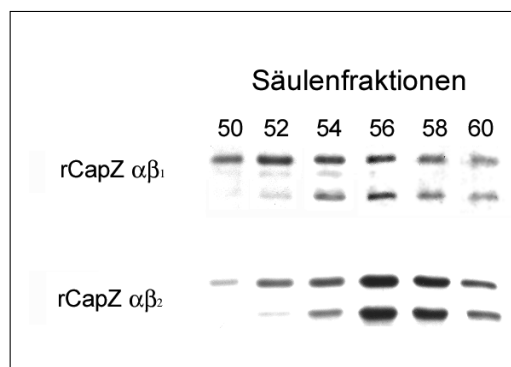


Abbildung 3.9: Gelelektrophoretische Analyse von Säulenfraktionen der selektiven Bildung isoformspezifischer Heterodimere. Proben einzelner Fraktionen (1,5 ml) der präparativen Gelfiltration über eine Superdex 16/60-Säule wurden entnommen, zu SDS-Proben aufgearbeitet und im 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Fraktionen mit gleichen Anteilen von α - und β -Untereinheit wurden in der 2D-PAGE analysiert. Ausschnitt.

Für die 2D-PAGE wurden je 1-3 μ g Protein aus dem Superdexpool aufgetragen. Als Marker diente in weiteren Elektrophoresen natives CapZ und ein Gemisch der vier nicht renaturierten rekombinanten CapZ-Untereinheiten α_1 , α_2 , β_1 und β_2 .

Abbildung 3.10 A zeigt die 2D-elektrophoretische Auftrennung von nativem CapZ aus der Skelettmuskulatur des Schweins. Die vier Proteinspots konnten den vier CapZ-Untereinheiten, die im Skelettmuskel exprimiert werden, zugeordnet werden. Die Spots der α_1 - und β_2 -Untereinheit waren schwächer ausgeprägt, d.h. ihr Anteil an der isolierten Isoformmischung war gering. Bei diesen Isoformen handelte es sich um das sogenannten Nichtmuskel-CapZ. Deutlich stärker ausgeprägt erscheinen die Spots der anderen beiden Isoformen CapZ $\alpha_2\beta_1$ (Muskel-CapZ).

In Abbildung 3.10 B ist die 2D-elektrophoretische Auftrennung der rekombinanten, nicht renaturierten CapZ-Untereinheiten vor der Renaturierung gezeigt. Im Molekularmassensbereich von 36 kDa sind 4 größere Proteinspots zu erkennen, die den α -Untereinheiten zugeordnet werden können. Des Weiteren sind zwei größere Spots im Molekularmassensbereich von 32 kDa zu erkennen, die die β_1 und β_2 -Untereinheit repräsentierten. Das Auftreten von mehreren Spots mit gleicher Molekularmasse einer exprimierten Untereinheit

kann mit Artefaktbildung mittels Carbamylierung durch Harnstoffabbauprodukte erklärt werden. Durch diese Modifikationen kam es teilweise zu Änderungen der Nettoladung des Proteins und damit z. T. zu veränderten isoelektrischen Foki (pI's). In Verbindung mit den Ergebnissen zur Sequenzanalyse der Isoformen auf Aminosäureebene (3.1.3) zeigt sich zusätzlich eine andere Positionierung der rekombinanten Untereinheiten in der zweidimensionalen Elektrophorese als beim nativen CapZ (Abbildung 3.10 A).

In Abbildung 3.10 C sind die Produkte aus dem Rückfaltungsgemisch rCapZ $\alpha_{1/2}\beta_1$ nach zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung dargestellt. Obwohl α_1 - und auch α_2 -Untereinheiten im Renaturierungsansatz vorhanden waren, sind nur die Spots der α_2 -Untereinheit zu erkennen. Das Gleiche gilt im umgekehrten Fall für die Rückfaltung des Proteingemisches rCapZ $\alpha_{1/2}\beta_2$ (Abbildung 3.10 D): In diesem Ansatz faltete sich hauptsächlich die α_1 -Untereinheit zusammen mit der β_2 -Untereinheit zu einem Heterodimer.

In vitro falten sich die rekombinanten Heterodimere demnach entsprechend der beobachteten Isoformverteilung von isoliertem nativen CapZ bevorzugt zu $\alpha_1\beta_2$ - bzw. $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimeren. Allerdings können auch $\alpha_1\beta_1$ - bzw. $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimere erzeugt werden, wenn im Renaturierungsansatz nur die entsprechenden Isoformen vorhanden sind.

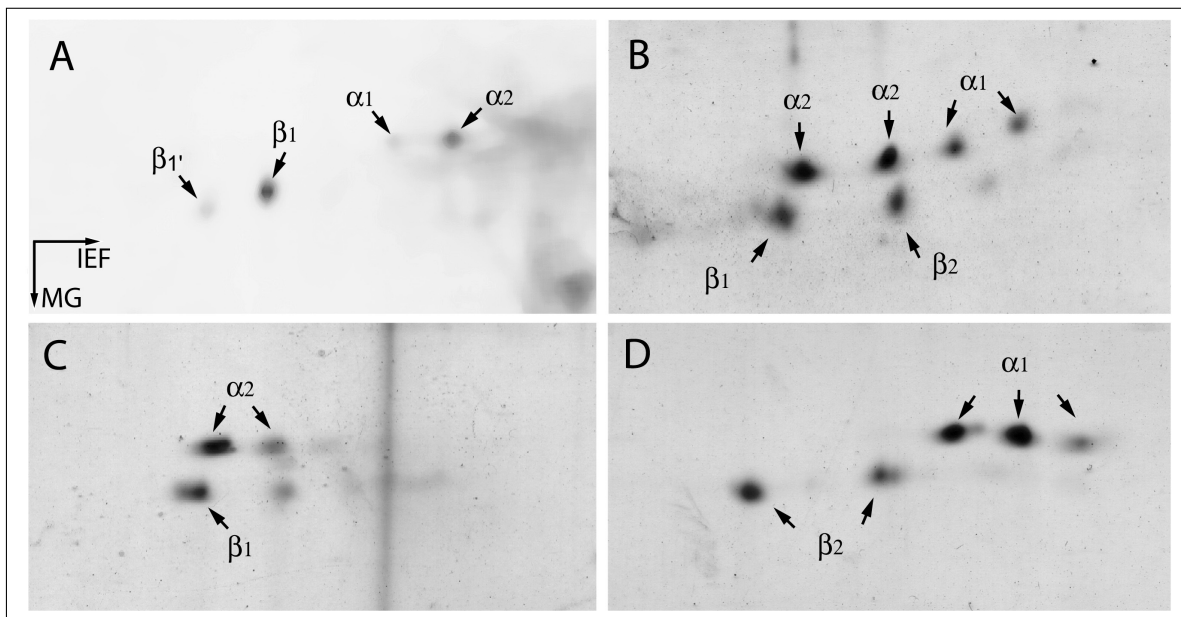


Abbildung 3.10: Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese zur isoformspezifischen Bildung von CapZ-Heterodimeren. (A) Natives CapZ wurde als Marker mit der Bezeichnung der Isoformen nach Schafer et al., 1994 [160] zweidimensional aufgetrennt. (B) Gemisch der rekombinanten, denaturierten Isoformen. (C) Die Heterodimere aus dem Rückfaltungsmix von rCapZ $\alpha_{1/2}\beta_1$ und (D) von rCapZ $\alpha_{1/2}\beta_2$ wurden nach Renaturierung und Aufreinigung durch Gelfiltration 2D-elektrophoretisch analysiert. Es zeigt sich eine β -isoformabhängige Verteilung der α -Isoformen, bei der die α_2 -Untereinheit mit β_1 (C) und die α_1 -Untereinheit mit β_2 renaturiert (D). IEF: Isoelektrische Fokussierung, ca. pH 5,0 bis pH 6,0; MG: Molekulargewicht. Ausschnitt.

Zusammenfassend lässt sich für die Rückfaltung der simultan renaturierten Heterodimere

und der einzelnen, separat renaturierten Untereinheiten Folgendes aussagen:

Die simultane Rückfaltung der Heterodimer durch \bar{u}/N -Dialyse der denaturierten Untereinheiten führte zu korrekt gefalteten Proteinen, wobei die Renaturierung durch Dialyse im Vergleich zur Methode von Remmert einen geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand bedeutete und höhere Proteinausbeuten erzielte. Es konnten die beiden α - und die beiden β -Untereinheiten in allen vier möglichen Kombinationen simultan miteinander rückgefaltet werden. Außerdem führte die separate Renaturierung von α - bzw. β -Untereinheiten durch Dialyse zu nativen Proteinen, die nach Gelfiltration in monomerer Form isoliert werden konnten. Die Rückfaltung von CapZ-Heterodimeren erfolgte *in vitro* isoformspezifisch, d.h. die CapZ β_1 -Untereinheit renaturierte vorwiegend mit der CapZ α_2 -Untereinheit, die CapZ β_2 -Untereinheit renaturierte vorwiegend mit der CapZ α_1 -Untereinheit. Die Information zur isoformspezifischen Renaturierung der Heterodimere *in vitro* scheint in den Sequenzen der einzelnen Untereinheiten zu liegen.

3.1.7 Aktivität der rekombinanten Heterodimere

Die Aktivität der rekombinanten Heterodimere und der separaten α - und β -Untereinheiten wurde mit Hilfe verschiedener Methoden überprüft. Ein erster Test auf die Funktionalität der rekombinanten Proteine wurde mit einem F-Actin-Kosedimentationsassay durchgeführt, worauf sich fluorometrische Nukleations- und Cappingassays mit Glattmuskel- und Skelettmuskelactin anschlossen.

3.1.7.1 Bindung an Glattmuskel-F-Actin

Die Bindung von rekombinanten CapZ-Isoformen an Glattmuskel-F-Actin wurde durch Kosedimentationsanalysen untersucht (Abbildung 3.11). Dabei wurde Actin polymerisiert, die zu untersuchenden Proteine zugesetzt und entstandene Effektor-F-Actin-Komplexe durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Die Überstände und Sedimente wurden anschließend durch SDS-gelelektrophoretische Analyse (Abbildung 3.11 A) und Immunblot-Analyse (Abbildung 3.11 B) auf die enthaltenen Proteine untersucht.

Um die Anzahl von freien Actinfilamentenden zu erhöhen und so mehr potentielle Bindungsstellen für die rekombinanten Proteine zu schaffen, wurde die F-Actin-Lösung kurz vor Zugabe der Heterodimere und der separat renaturierten Untereinheiten dreimal für je 5 s auf Eis mit Ultraschall behandelt. Dies führte zum Bruch langer Actin-Filamente und damit zu einer erhöhten Anzahl freier Enden. Allerdings sedimentieren sehr kurze F-Actin-Effektor-Komplexe wegen ihrer geringen Masse bei der maximal zu erreichenden Zentrifugalbeschleunigung während der Ultrazentrifugation nicht.

Nach der Ultrazentrifugation des F-Actins verblieb ein Teil des Actins im Überstand. Bei diesem handelte es sich um kurze F-Actin-Polymere, Oligomere sowie nicht polymerisationsfähige Actin-Monomere. Nach Zugabe der Effektoren blieb diese Verteilung erhalten. Die rekombinanten Heterodimere rCapZ $\alpha_1\beta_1$ und rCapZ $\alpha_2\beta_2$, die separat renaturierten β -Untereinheiten und das native CapZ ließen sich sowohl im Überstand als auch im Sediment nachweisen. Eine Kosedimentation der Effektoren bedeutet Bindung an F-Actin. Da eine Bindung der separat renaturierten α -Untereinheiten an F-Actin nicht nachweisbar war, wurden die SDS-PAGE und Immunblotanalyse nicht dargestellt.

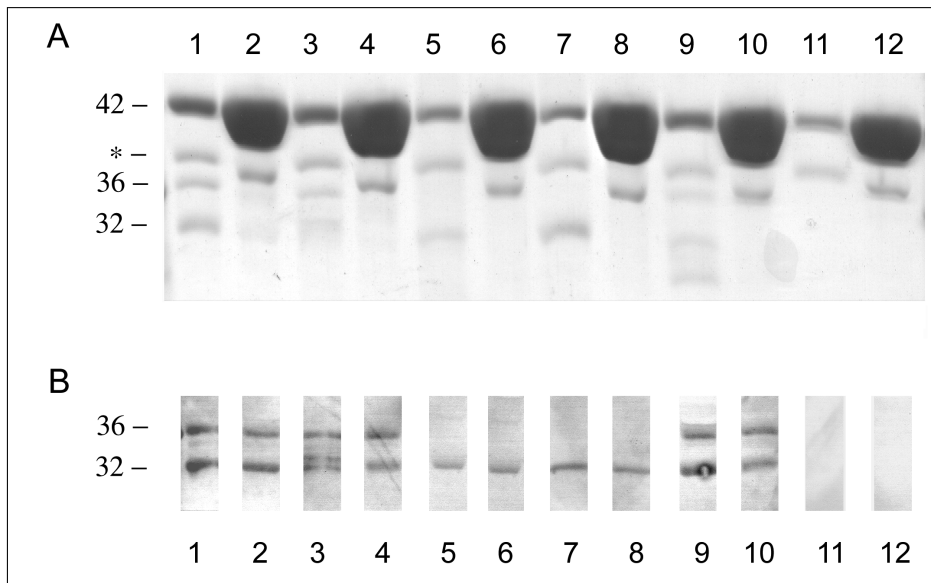


Abbildung 3.11: Kosedimentation von Glattmuskel-F-Actin und nativem CapZ, rekombinanten CapZ und separat renaturierten β -Untereinheiten. (A) Gelelektrophoretische Analyse (Ausschnitt). Sediment und Überstand wurden direkt nach der Zentrifugation getrennt, zu SDS-Proben verarbeitet und im 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. (1) + (2) Überstand und Sediment rCapZ $\alpha_1\beta_1$, (3) + (4) Überstand und Sediment rCapZ $\alpha_2\beta_2$, (5) + (6) Überstand und Sediment rCapZ β_1 , (7) + (8) Überstand und Sediment rCapZ β_2 , (9) + (10) Überstand und Sediment natives CapZ, (11) + (12) Actin-Kontrolle; die Beschriftung links bezeichnet die jeweiligen Molekulargewichte in kDa. * Actinabbauprodukt. (B) Immunblotanalyse (Ausschnitt). Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese mit p-a-CapZ aff. (1:200) inkubiert.

3.1.7.2 Capping-Aktivität an Skelettmuskel F-Actin

Nach der Feststellung, dass die rekombinanten Heterodimere und die separat renaturierten β -Monomere an F-Actin binden, wurden Messungen hinsichtlich der Aktivität der Proteine durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob sich die Aktivitäten der Isoformen biochemisch differenzieren ließen und ob unterschiedliche Capping- und Nukleationseigenschaften der Grund für die Existenz verschiedener CapZ-Isoformen sein könnten.

Die Capping-Aktivität der vier simultan renaturierten Heterodimere wurde anhand eines F-Actin-Depolymerisationsansatzes mit Skelettmuskelactin bestimmt (Abbildung 3.12). Bei allen fünf CapZs ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle deutlich verzögert. Die Intensität sinkt bei der Kontrolle nach 200 s auf ca. 10% des Anfangswertes, während sie beim nativen CapZ nur auf ca. 52% absinkt. Die Aktivität der rekombinanten Heterodimere liegt z.T. im Bereich von der des nativen CapZs, z.T. aber auch deutlich darunter. So ist beim $\alpha_1\beta_2$ -Heterodimer ein Absinken der Fluoreszenzintensität nach 200 s auf ca. 48% des Ausgangswertes, beim $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer bei ca. 33%, beim $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimer bei ca. 30% und beim $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer bei nur ca. 21% des Ausgangswertes zu beobachten. Die Versuche wurden mehrfach mit den gleichen Ergebnissen wiederholt. Heterodimere mit α_1 -Isoform zeigen demnach eine stärkere Cappingaktivität als Heterodimere mit α_2 -Isoform und Heterodimere mit β_2 -Isoform eine stärkere Aktivität als mit β_1 -Isoform.

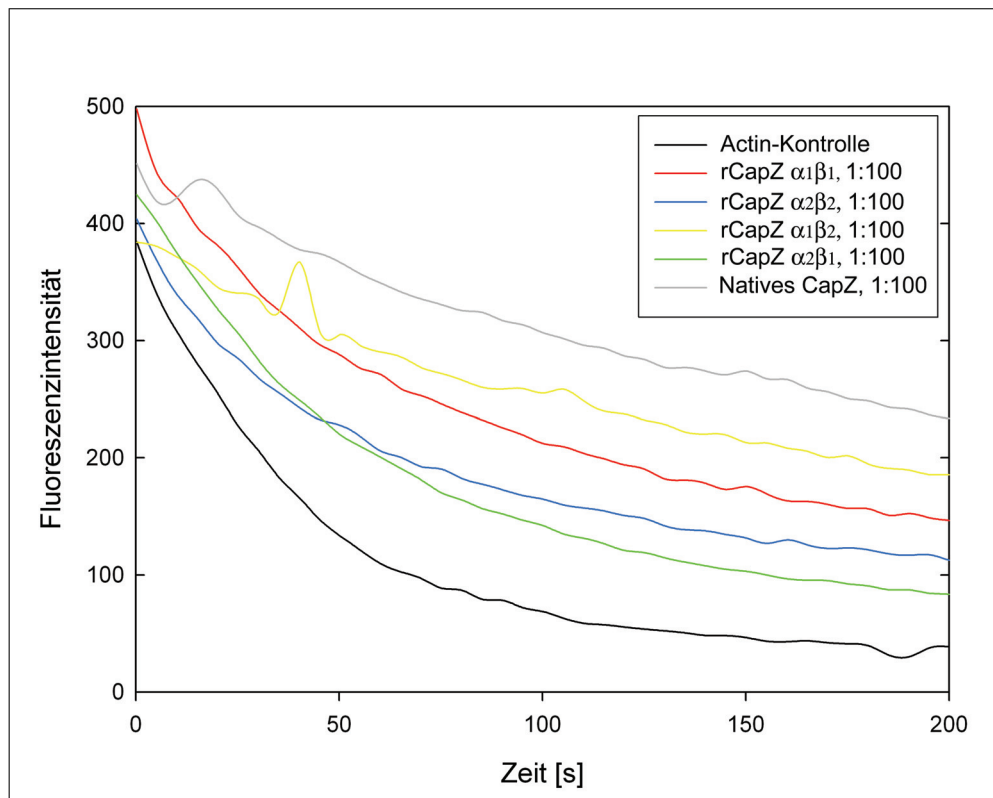


Abbildung 3.12: Capping-Aktivität von nativem CapZ und den simultan renaturierten Heterodimeren. Die Aktivität wurde in einem Skelettmuskel-F-Actin-Depolymerisationsansatz mit pyrenmarkiertem Actin (20%) bestimmt. Die einzelnen rekombinanten Heterodimere zeigen unterschiedliche Capping-Aktivitäten. In der Legende sind die molaren Verhältnisse von Effektor zu Actin angegeben.

Um die Frage zu klären, ob bereits die einzelnen CapZ-Untereinheiten eine Capping-Aktivität besitzen und in wie weit sie jeweils an der Interaktion des Heterodimers mit F-Actin beteiligt sind, wurden die separat renaturierten α - und β -Untereinheiten hinsichtlich

ihrer Capping-Eigenschaften mit einem F-Actin-Depolymerisationsansatz mit pyren-markiertem Actin analysiert (Abbildung 3.13 und 3.14). Die Fluoreszenzintensität der Actin-Kontrolle sinkt nach 200 s auf ca. 10% des Ausgangswertes, die des nativen CapZs auf ca. 52% des Ausgangswertes (Abbildung 3.13). Bei den β -Untereinheiten ist eine leichte Retardierung der Abnahmegeschwindigkeit zu beobachten. So fällt die Fluoreszenzintensität der β_1 -Untereinheit nach 200 s auf 15% der Ausgangsintensität, die der β_2 -Untereinheit auf ca. 25%. Einzelne β -Untereinheiten zeigen somit eine geringe Capping-Aktivität, wobei die der β_2 -Untereinheit stärker ist als die der β_1 -Untereinheit. Dies lässt sich auch an der Retardierungsgeschwindigkeit der Fluoreszenzkurve für die β_2 -Untereinheit im Vergleich zur Kurve der β_1 -Untereinheit erkennen.

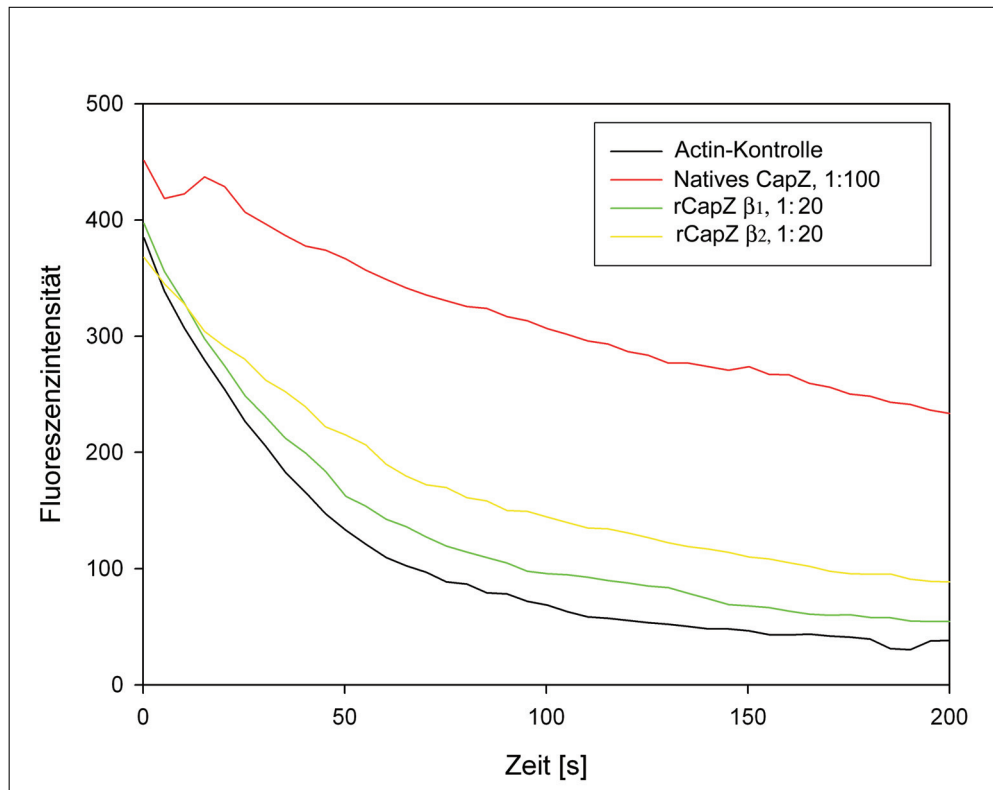


Abbildung 3.13: Capping-Aktivität von separat rückgefalteter β -Untereinheit und nativem CapZ. Die Aktivität wurde mit einem F-Actin-Depolymerisationsansatz mit pyrenmarkiertem Actin (20%) bestimmt. Beide Untereinheiten zeigen geringe Aktivität, die der β_2 -Untereinheit ist etwas stärker als die der β_1 -Untereinheit. Die molaren Verhältnisse von Effektor zum Actin sind in der Legende angegeben.

Die separat renaturierten α -Untereinheiten zeigten im F-Actin-Depolymerisationsassay, ähnlich wie die β -Untereinheiten, nur geringe Capping-Aktivität (Abbildung 3.14). Im Vergleich zu der Intensitätsabnahme auf ca. 9% der Anfangsfluoreszenz nach 200 s bei der Actin-Kontrolle sinkt die Fluoreszenzintensität im α_1 -Ansatz auf ca. 40%, im α_2 -Ansatz auf ca. 17% der Ausgangsintensität. Allerdings war es möglich, durch Zugabe von renaturierter β_2 -Untereinheit zur renaturierten α_2 -Untereinheit ein Heterodimer zu er-

zeugen, das stärkere Cappingaktivität als die einzeln renaturierten Untereinheiten besaß. Hier sinkt die Fluoreszenzintensität nach 200 s auf ca 40% des Ausgangswertes, allerdings ist die Retardierung des Fluoreszenzsignals im weiteren Verlauf stärker als bei den einzelnen α -Untereinheiten. Dies spricht dafür, dass sich im Ansatz eine geringe Zahl intakter Heterodimere gebildet hat, welche die Actin-Filamente stärker cappt als die α -Untereinheiten allein. Die Menge an sukzessiv renaturiertem CapZ muss allerdings sehr gering sein, vergleicht man die Kurve mit der von simultan renaturiertem rCapZ $\alpha_2\beta_2$ (Abbildung 3.12). Nur ein geringer Teil der zugesetzten β_2 -Untereinheit bildet mit der nativen α_2 -Untereinheit ein funktionelles Heterodimer. Es ist allerdings auch möglich, dass die separate β_2 -Untereinheit ohne Interaktion mit α_2 für die beobachtete Aktivitätssteigerung verantwortlich ist.

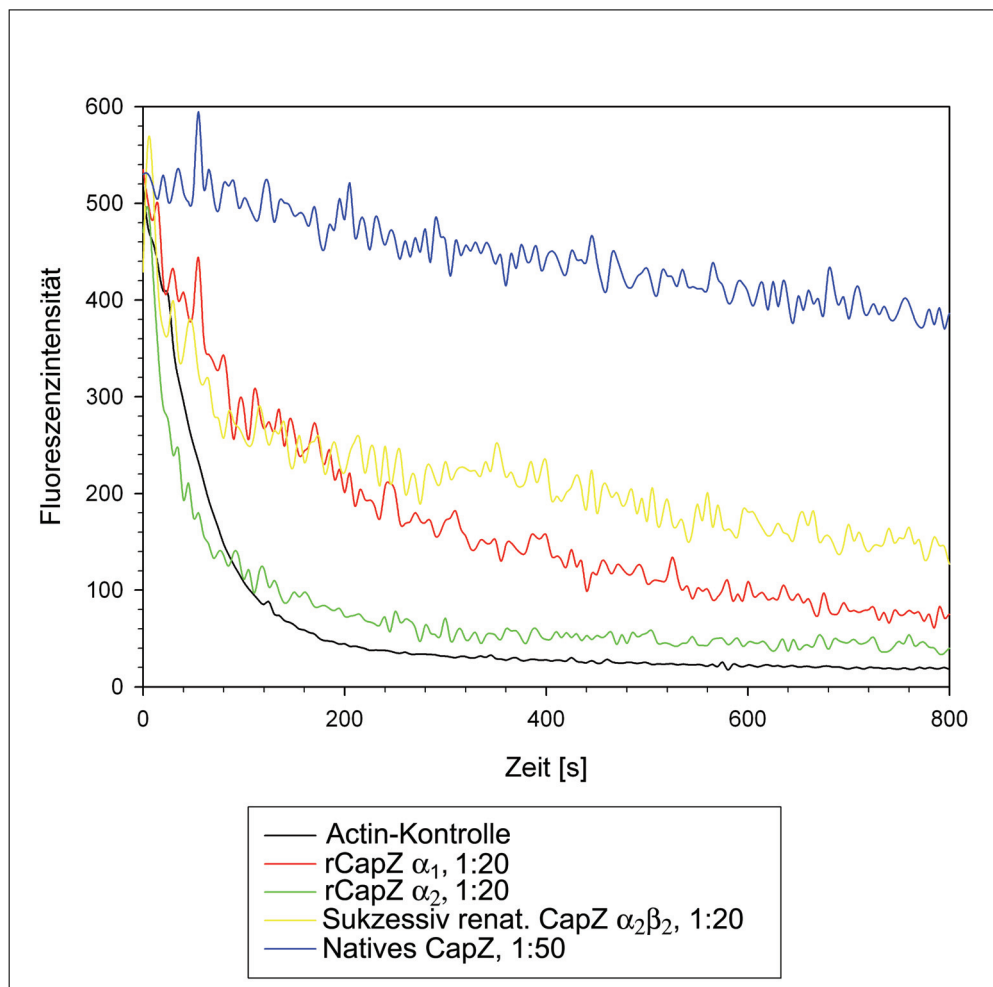


Abbildung 3.14: Capping-Aktivität von separat rückgefalteter α_1 - und α_2 -Untereinheit und sukzessiv renaturiertem $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimer. F-Actin-Depolymerisationsansatz mit 20% Pyren-Actin. Beide α -Untereinheiten besitzen geringe Capping-Aktivität, wobei die α_1 -Untereinheit stärker cappt als die α_2 -Untereinheit. Die Zugabe von einzeln renaturierter β_2 - zu einzeln renaturierter α_2 -Untereinheit führt in geringem Maße zur sukzessiven Rückfaltung eines funktionellen Heterodimers. Das Effektor-Actin-Verhältnis ist in der Legende angegeben.

3.1.7.3 Capping-Aktivität an Glattmuskel-F-Actin

Da sich diese Arbeit im Wesentlichen mit der glatten Muskulatur beschäftigt, wurden weitere Versuche zur Capping-Aktivität der rekombinanten Heterodimere und einzelner Untereinheiten mit Glattmuskel-Actin durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob sich die Bindungseigenschaften der CapZ-Isoformen an Sm-F-Actin von denen an Skm-F-Actin unterscheiden. Da die Markierung von Glattmuskel-G-Actin mit Pyren nicht zu einem Protein führt, dessen Polymerisationsstatus wie beim Pyrenactin des Skelettmuskels anhand des veränderten Fluoreszenzsignals gemessen werden kann, wurde in den folgenden Versuchen pyrenmarkiertes Skelettmuskelactin eingesetzt.

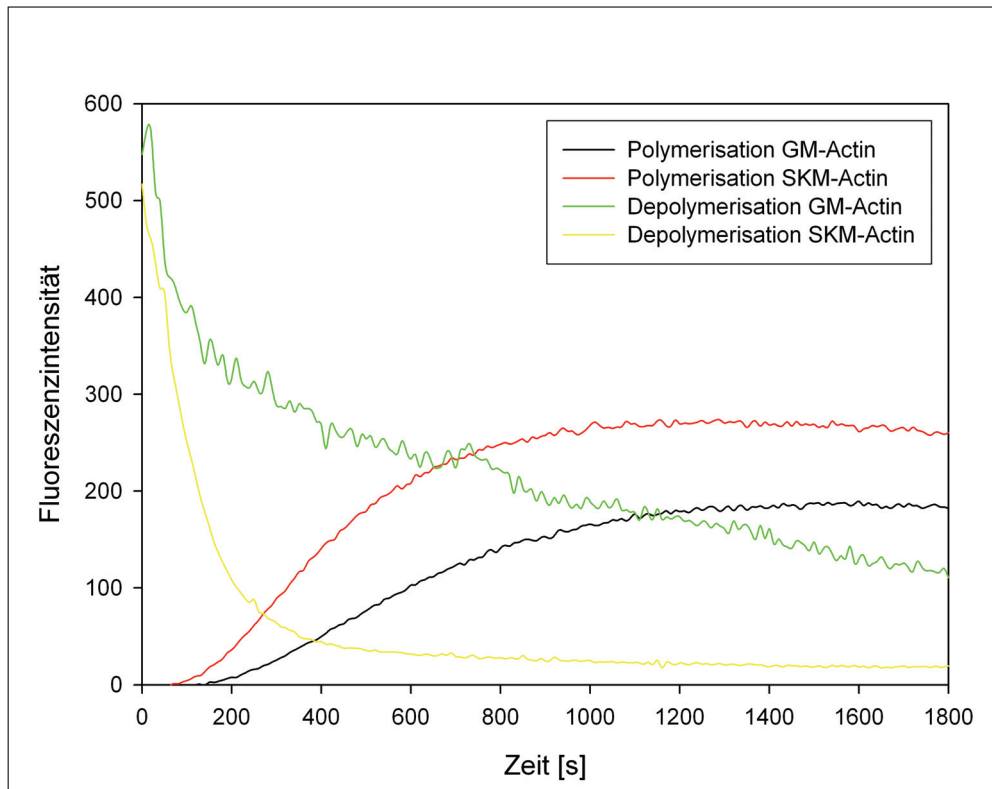


Abbildung 3.15: Polymerisations- und Depolymerisationsverhalten von Skelettmuskel- und Glattmuskel-Actin. Die De- bzw. Polymerisationsansätze enthielten jeweils die gleichen Mengen Actin mit einem Anteil von pyrenmarkiertem Actin von 20%. Glattmuskel-Actin polymerisiert und depolymerisiert wesentlich langsamer als Skelettmuskel-Actin.

Es ist bekannt, dass sich das Polymerisations- und Depolymerisationsverhalten der beiden Actine unterscheidet. Daher wurden beide Actine ohne Zusatz von Effektoren in entsprechenden Assay untersucht (Abbildung 3.15) In den Polymerisations- bzw. Depolymerisationsansätzen wurden jeweils die gleichen Mengen an Actin und pyrenmarkiertem

Actin eingesetzt und die gleichen Pufferbedingungen gewählt.

Im Vergleich zur Depolymerisationskurve des Skm-Actins, welche bereits nach 400 s auf einen Fluoreszenzwert von ca. 8,5% des Ausgangswertes fällt, ist die Depolymerisation des Gm-Actins deutlich retardiert. Hier liegt die Fluoreszenzintensität nach 400 s noch bei ca. 50% des Ausgangswertes.

Bei der Polymerisation beider Actine ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität bei der Skm-Actin-Polymerisation schneller zunimmt als die des GM-Actins. Beim Erreichen des Plateaus, im sogenannten *steady state*, zeigt sich beim Skm-Actin eine höhere Fluoreszenz als beim Gm-Actin. Dies spricht für einen verstärkten Einbau von pyrenmarkiertem Actin in die entstandenen Skm-Actin-Filamente im Vergleich zum Gm-Actin. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Skm- α -Actin deutlich schneller polymerisiert und depolymerisiert als Gm- α -Actin.

Die Capping-Aktivitäten der renaturierten rCapZ-Heterodimere unterscheiden sich nicht so stark wie beim Capping von Skm-F-Actin (Abbildung 3.16 A). Die Kurven verlaufen insgesamt deutlich flacher, auch wenn das Effektor:Actin-Verhältnis mit 1:100 um den Faktor 2 niedriger ist als im Skm-Actin-Capping-Assay. Wegen der im Vergleich zum Skm-Actin geringeren Dynamik von Polymerisation und Depolymerisation des Gm-Actins wurden die Messungen auf 30 min ausgedehnt. Die Fluoreszenzintensität sinkt bei allen vier renaturierten Heterodimeren auf ca. 30% der Anfangsintensität (Zum Vergleich: Beim nativen CapZ erreicht die Fluoreszenzintensität ca. 60% des Ausgangswertes). Es ergeben sich, verglichen mit den jeweiligen Ausgangsintensitäten, für die renaturierten rCapZ-Heterodimere nach 30 min folgende Endfluoreszenzintensitäten: rCapZ $\alpha_1\beta_1$: 30%, rCapZ $\alpha_1\beta_2$: 32%, rCapZ $\alpha_2\beta_1$: 30% und rCapZ $\alpha_2\beta_2$: 33%. Die einzelnen Isoformen besitzen beim Capping von Gm-F-Actin keine differenzierbaren Aktivitäten.

Auch die β -Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Capping-Aktivitäten an Gm-F-Actin nicht (Abbildung 3.16 B). Bei beiden fällt die Fluoreszenzintensität nach 1800 s auf ca. 30% der Ausgangsfluoreszenz. Die separat renaturierten α -Untereinheiten besitzen selbst bei einem Effektor:Actin-Verhältnis von 1:10 keine nachweisbare Capping-Aktivität an Gm-F-Actin, daher wurde auf die Darstellung verzichtet.

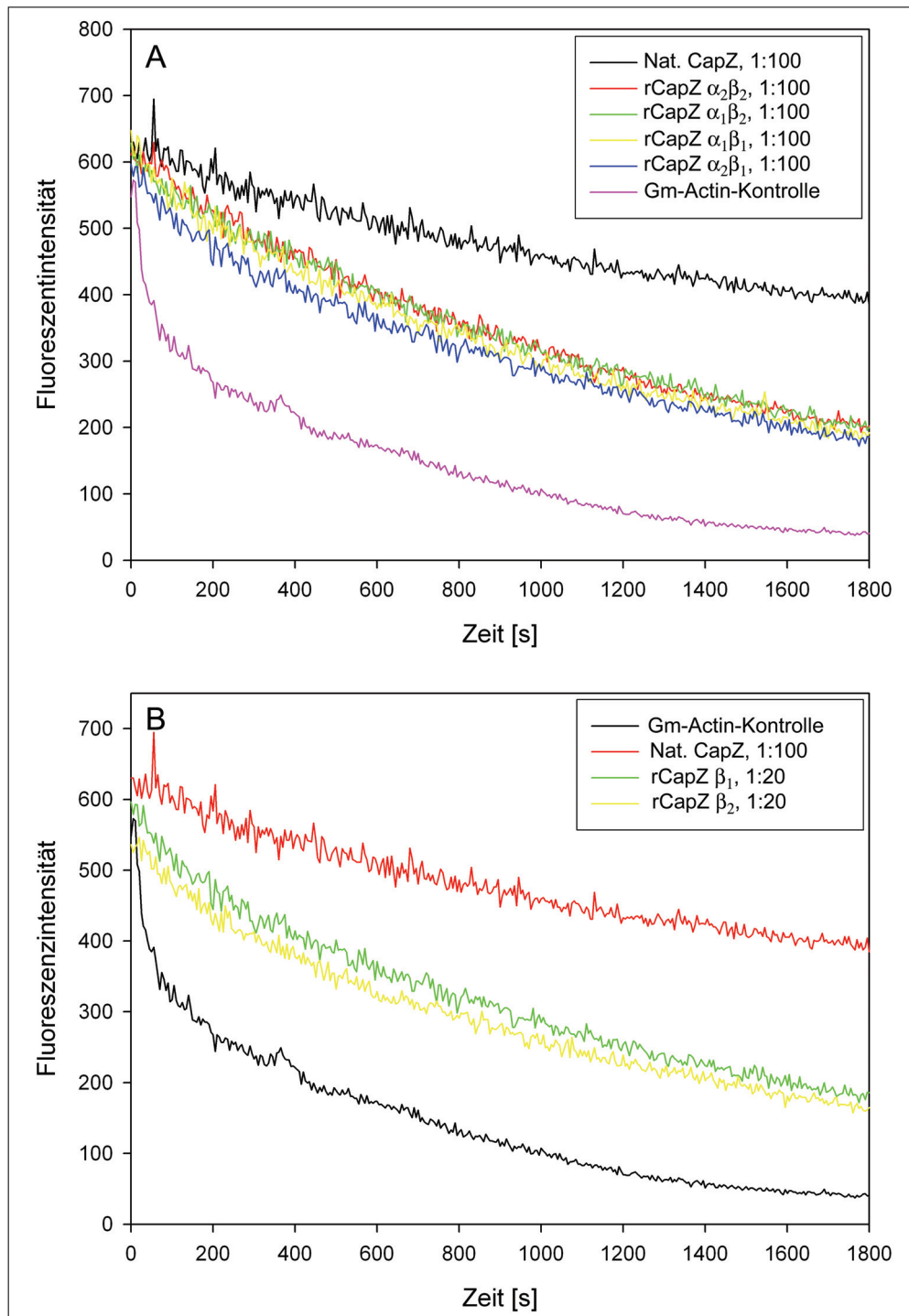


Abbildung 3.16: Capping-Aktivität des nativen CapZs, der simultan renaturierten Heterodimere und der separat renaturierten Untereinheiten mit Glattmuskel-Actin. (A) Simultan renaturierte rCapZ-Heterodimere und natives CapZ, (B) Separat renaturierte β -Untereinheiten und natives CapZ. Die Aktivität wurde in einem Gm-F-Actin-Depolymerisationsansatz mit pyrenmarkiertem Skm-Actin (20%) bestimmt. In der Legende ist das molare Verhältnis von Effektor zu Actin angegeben. Die Abstufung der Capping-Aktivitäten der rekombinanten Heterodimere sowie der einzeln rückgefalteten Untereinheiten beim Cappen von Gm-F-Actin gleicht der beim Cappen von Skm-F-Actin, wobei diese aber weniger stark ausgeprägt ist.

3.1.7.4 Nukleationsaktivität der rekombinanten Proteine

Heterodimere F-Actin-Capping-Proteine cappen nicht nur die Enden von Actinfilamenten, sondern zeigen auch nukleationsfördernde Eigenschaften. In Nukleationsassays wurden natives CapZ, rekombinante Heterodimere und einzeln rückgefaltete rCapZ-Untereinheiten auf ihre nukleationsfördernden Eigenschaften mit Skm-Actin untersucht, um die Frage zu klären, ob sich die einzelnen Isoformen hinsichtlich dieser Aktivität unterscheiden (Abbildung 3.17). Als Standardansatz diente eine Lösung mit 0,3 mg/ml Skm-Actin ($7\mu\text{M}$) mit einem 20%igen Anteil an Pyren-Actin, der nach Zugabe von KCl und MgCl_2 eine sehr geringe Eigenpolymerisationsrate aufwies.

Die Nukleationsaktivitäten von nativem CapZ und dem rekombinanten Heterodimer $\alpha_1\beta_1$ ähneln sich stark (Abbildung 3.17 A). Beide Fluoreszenzkurven haben fast die gleiche Steigung und die Fluoreszenzmaxima in der lag-Phase nach 1000 s differieren nur wenig. Die Nukleationsaktivität des rekombinanten $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimers ist ein wenig schwächer. Die Steigung der Fluoreszenzkurve während der Polymerisation beträgt im Vergleich etwa 50% von der des nativen CapZs. Die Kontrolle zeigt, wie zu erwarten, nur eine sehr geringe Eigenpolymerisationsrate. Die Endfluoreszenz nach 1000 s liegt nur etwa drei Einheiten über der Anfangsfluoreszenz.

Um zu untersuchen, ob die einzeln renaturierten CapZ-Untereinheiten ebenfalls eine Nukleationsfördernde Aktivität besitzen, wurden ebenfalls Actin-Nukleationsassay durchgeführt (Abbildung 3.17 B). Die Ansätze glichen den oben erwähnten, jedoch wurden die zu untersuchenden Effektoren in einem Actin-Effektor-Verhältnis von 1:20 eingesetzt, um eine deutlichere Reaktion zu erzielen. Insgesamt zeigen die einzeln renaturierten Untereinheiten deutlich schwächere Nukleationsaktivitäten als die rekombinanten Heterodimere und natives CapZ.

Beide einzeln renaturierten α -Untereinheiten zeigen deutliche Nukleationsaktivitäten, die sich jedoch kaum unterscheiden. So sind Steigung und Endpunkt der Fluoreszenzkurve annähernd gleich (Abbildung 3.17 B), im Vergleich zur Fluoreszenzkurve des nativen CapZs ist die Steigung der Kurve in der Polymerisationsphase jedoch geringer.

Auch die einzeln renaturierten β -Untereinheiten zeigen Nukleationsaktivität, wobei kaum Aktivitätsunterschiede zwischen den β -Isoformen zu erkennen sind. Steigung und Endpunkte der beiden Polymerisationskurven sind sich äußerst ähnlich. Die β_1 -Untereinheit fördert die Nukleation nur minimal weniger als die β_2 -Untereinheit.

Die Bindungsaktivitäten aller Isoformen an F- und G-Actin aus dem Glatt- und Skelettmuskel sind sich hinsichtlich Capping und Nukleation äußerst ähnlich. Minimale isoformspezifische Unterschiede lassen sich jedoch ausmachen.

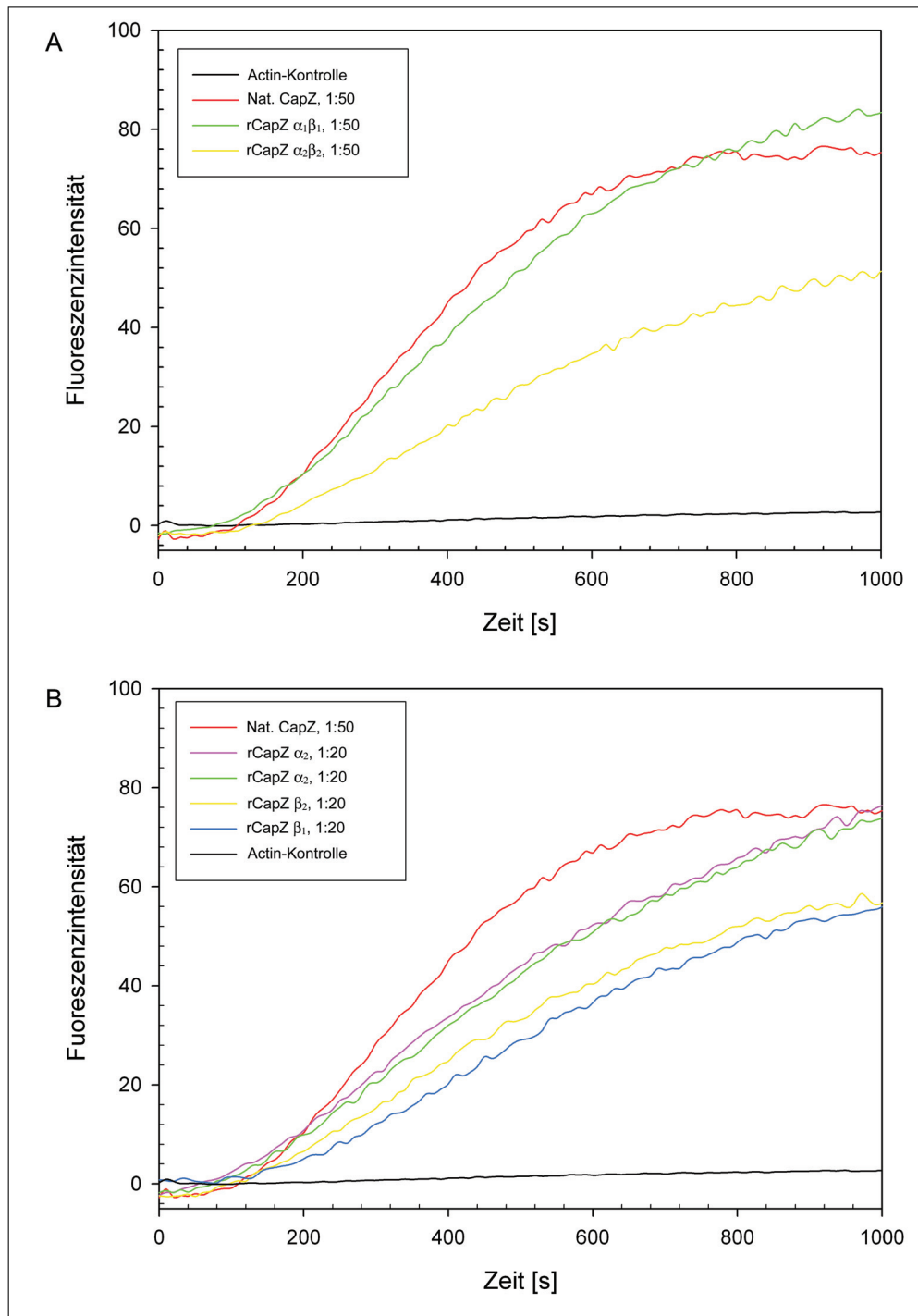


Abbildung 3.17: Nukleationsaktivität der rekombinanten Proteine Die Nukleationsaktivitäten von nativen CapZ, rekombinanten Heterodimeren und einzeln renaturierten Untereinheiten wurden mit einem Polymerisationsansatz aus 0,3 mg/ml Actin (20% Pyren-markiert) und Effektoren im Verhältnis Actin:Effektor von 1:50 bzw. 1:20 bestimmt. Die Polymerisation wurde mit 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ induziert. (A) Natives CapZ und rekombinante Heterodimere; (B) Natives CapZ und einzeln renaturierte Untereinheiten.

Die Aktivitäten lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die simultan renaturierten Heterodimere besitzen eine Capping-Aktivität, die der des nativen CapZs nahekommen.

So besitzt das $\alpha_1\beta_2$ -Heterodimer eine fast identische Aktivität im Vergleich zum nativen CapZ, während die anderen Heterodimere schwächere Aktivitäten zeigen. Die separat renaturierten α - und β -Untereinheiten besitzen beide eine geringe Capping-Aktivität, wobei die α_1 -Untereinheit sowohl separat renaturiert als auch im Heterodimer eine stärkere Capping-Aktivität als die α_2 -Untereinheit besitzt. Die β_2 -Untereinheit besitzt ebenfalls sowohl separat renaturiert als auch im Heterodimer eine stärkere Capping-Aktivität als die β_1 -Untereinheit. Die Capping-Aktivitäten der Heterodimere steigen also in der Reihenfolge $\alpha_1\beta_2 > \alpha_1\beta_1 > \alpha_2\beta_2 > \alpha_2\beta_1$. Durch Zugabe von renaturierter β_2 - zu renaturierter α_2 -Untereinheit bildet sich ein Heterodimer, welches deutlich stärkere Capping-Aktivität besitzt als die beiden einzelnen Untereinheiten allein. Diese Aktivität ist aber wegen potentieller Fehlfaltungen schwächer als im simultan renaturierten rCapZ $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimer. Die Depolymerisation von Gm-F-Actin verläuft deutlich langsamer als die von Skm-F-Actin, auch die Depolymerisation von gecapptem Gm-F-Actin verläuft langsamer als bei gecappten Skm-Actin-Filamenten. Aus diesem Grund variieren die Capping-Aktivitäten der einzelnen Heterodimere sowie der separaten β -Untereinheiten nicht so stark wie bei Capping-Assays mit Skm-Actin.

Auch in ihren Nukleationsaktivitäten ähneln sich die verschiedenen Isoformen der Heterodimere und separat renaturierten Untereinheiten. Allgemein zeigen die α -Untereinheiten leicht stärkere Aktivität als die β -Untereinheiten, jedoch besitzen alle separaten Untereinheiten nicht annähernd die Aktivität der intakten Heterodimere. Bei diesen zeigte sich, dass Heterodimere mit der Isoformkombination $\alpha_1\beta_1$ etwa doppelte Nukleationsaktivität besitzen als $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimere, wobei die Aktivität des $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimers vergleichbar mit der von nativem CapZ ist.

3.1.8 Komplexbildung

Um Bindungen von CapZ, rekombinanten CapZ-Isoformen und separaten Untereinheiten an andere Proteine nachzuweisen, wurden chemische Quervernetzungen vorgenommen. Dazu wurde das quervernetzende Agens EDC (1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]carbodiimid) eingesetzt. Bei diesem handelt es sich um einen sogenannten *zero space linker*, der miteinander wechselwirkende Epitope ohne Ausbildung eines Verbindungsarms kovalent verbindet, indem er durch Aktivierung von Carboxylgruppen diese mit primären Aminen unter Ausbildung von Amidbindungen verknüpft. Die reagierenden Gruppen müssen dabei in direkter Verbindung zueinander stehen. EDC geht als lösliches Harnstoffderivat aus der Reaktion hervor.

3.1.8.1 Komplexbildung von nativem CapZ, rekombinanten CapZ-Isoformen und separat renaturierten Untereinheiten mit Glattmuskel-G-Actin

Da die CapZ-Untereinheiten und Heterodimere nukleationsfördernde Eigenschaften aufweisen, sollte in Quervernetzungsexperimenten geklärt werden, in welcher Stöchiometrie diese G-Actin binden. Dazu wurde eine molare 1:4-Mischung von G-Actin und rekombinanten CapZ-Isoformen bzw. eine 1:2-Mischung von G-Actin und separat renaturierten Untereinheiten unter nicht-polymerisierenden Bedingungen mit EDC versetzt und bis zu 60 min bei RT inkubiert. Zu den Zeitpunkten t_{0min} bis t_{60min} wurden in 10minütigen Abständen Proben entnommen, die sofort zu SDS-Proben verarbeitet, im 15%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet wurden. Der Immunblot wurde mit dem affinitätsgereinigten p-a CapZ-Antikörper sowie mit alkalischer Phosphatasegekoppeltem Zweitantikörper inkubiert und mittels NBT/BCIP entwickelt.

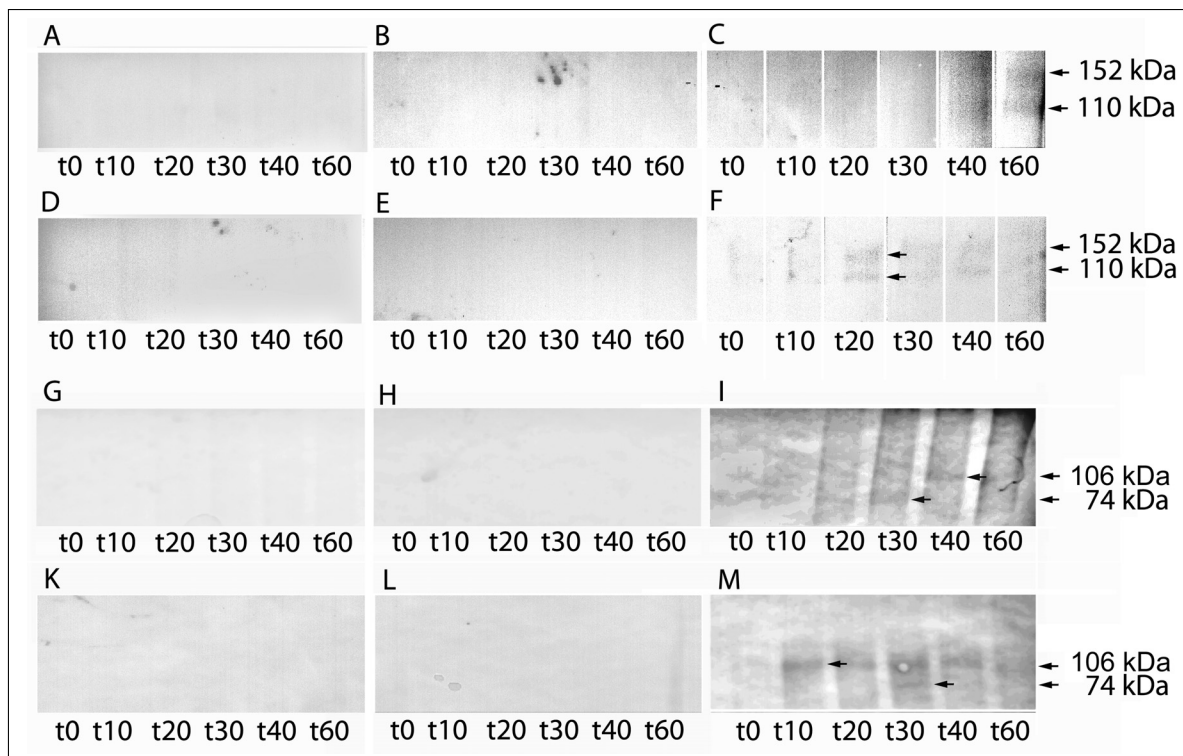


Abbildung 3.18: Chemische Quervernetzung von rekombinantem CapZ und separat renaturierten rCapZ β_1 - und β_2 -Untereinheiten mit Glattmuskel-G-Actin. Rekombinantes CapZ bzw. separat renaturierte β -Untereinheiten, G-Actin oder rCapZ/Actin wurden in einem molaren Verhältnis von 1:4 bzw. 1:2 gemischt und mit 20 mM EDC versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, zu SDS-Proben verarbeitet und in der SDS-PAGE mit gleichen Volumina eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und mit dem pa-CapZ aff.-Antikörper (Verdünnung 1:200) inkubiert. (A, D, G, K) Die Kontrollen der rekombinanten renaturierten Proteine und (B, E, H, L) die Kontrollen von G-Actin zeigten kein Crosslinking. In den Ansätzen (C) rCapZ $\alpha_1\beta_1$ + G-Actin, (F) rCapZ $\alpha_2\beta_2$ + G-Actin, (I) rCapZ β_1 + G-Actin und (M) rCapZ β_2 + G-Actin konnten Quervernetzungsprodukte detektiert werden (Pfeile). Ausschnitt, t: Zeit [min]

Parallel wurden Kontrollen der einzelnen Proteine G-Actin, rCapZ und rCapZ β -Untereinheiten mitgeföhrt (Abbildung 3.18). Die Kontrollen zeigten, wie zu erwarten, in den hier dargestellten Molekularmassenbereichen keine geföhrteten Proteinbanden. Die Einzelproteine interagieren also nicht miteinander und werden daher auch nicht quervernetzt (Abbildung 3.18 A, B, D, E, G, H, K, L). Bei den Quervernetzungen der beiden renaturierten Isoformen rCapZ $\alpha_1\beta_1$ (Abbildung 3.18 C) und rCapZ $\alpha_2\beta_2$ (Abbildung 3.18 F) sind im Verlauf der Reaktion jeweils zwei Banden zu erkennen, die Molekularmassen von ca. 110 kDa und ca. 152 kDa entsprechen. Diese Molekularmassen setzen sich aus den Summen der Molekularmassen von G-Actin (42 kDa) und CapZ (68 kDa) zusammen.

Bei der Quervernetzung der beiden β -Untereinheiten erscheint im Verlauf der Reaktion jeweils eine deutlich geföhrtete Proteinbande im Molekularmassenbereich von ca. 106 kDa (Abbildung 3.18 I (β_1) und M (β_2)). Dies entspricht der Summe der Molekularmassen von zwei G-Actinen (je 42 kDa) und rCapZ β (32 kDa). Die Quervernetzung nur eines G-Actinmoleküls mit je einer β -Untereinheiten war sehr ineffektiv. Die Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von 74 kDa war nur zu wenigen Reaktionszeitpunkten detektierbar. Eine Quervernetzungsreaktion der rekombinanten α -Untereinheiten mit G-Actin wurde ebenfalls durchgeföhrt, erbrachte aber keine Resultate und wurde daher hier nicht dargestellt.

Die Effizienz der Quervernetzungsreaktionen war insgesamt sehr gering, allerdings vergleichbar mit veröfentlichten Resultaten von Quervernetzungen anderer F-Actin-bindender Proteine mit G-Actin.

3.1.8.2 Komplexbildung von nativem CapZ, rekombinanten CapZ-Isoformen und separat renaturierten Untereinheiten mit α -Actinin aus dem Glattmuskel

Eine molare 1:1-Mischung von α -Actinin und rekombinanten CapZ-Isoformen bzw. separat renaturierten rCapZ β -Untereinheiten wurde mit EDC versetzt und bis zu 60 min bei RT inkubiert. Zu den Zeitpunkten t_{0min} bis t_{60min} wurden in zehnmünütigen Abständen Proben entnommen, diese sofort zu SDS-Proben verarbeitet und im 12,5%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit dem affinitätsgereinigten p-a CapZ-Antikörper inkubiert (Abbildung 3.19). Die Detektion erfolgte wie bereits beschrieben.

Alle Kontrollen zeigten in den hier dargestellten Molekularmassenbereichen keine geföhrteten Proteinbanden (Abbildung 3.19 A, B, D, E, G, H, K und L), die separaten Proteine werden also nicht quervernetzt. Bei der Quervernetzung der rekombinanten CapZ-Heterodimere erscheinen im Verlauf der Reaktion zwei Proteinbanden. Diese haben eine Molekularmasse von ca. 168 kDa und 268 kDa, was der Summe der Molekularmassen von CapZ (68 kDa) und monomerem (100 kDa) bzw. dimerem (200 kDa) α -Actinin entspricht

3 Ergebnisse

(Abbildung 3.19 C und F). α -Actinin liegt nativ als Dimer vor, welches aber durch die denaturierenden Bedingungen des SDS-Probenpuffers und der SDS-Page als 100 kDa-Protein erscheint. Bei der Quervernetzungsreaktion werden durch Zugabe von EDC beide Untereinheiten kovalent miteinander verknüpft; es entsteht somit ein Produkt von 200 kDa. Wird allerdings zuerst ein rCapZ-Heterodimer mit einer α -Actinin-Untereinheit vernetzt, bevor diese mit ihrer anderen α -Actinin-Untereinheit verknüpft wird, so entsteht ein Vernetzungsprodukt mit einer Molekularmasse von 168 kDa.

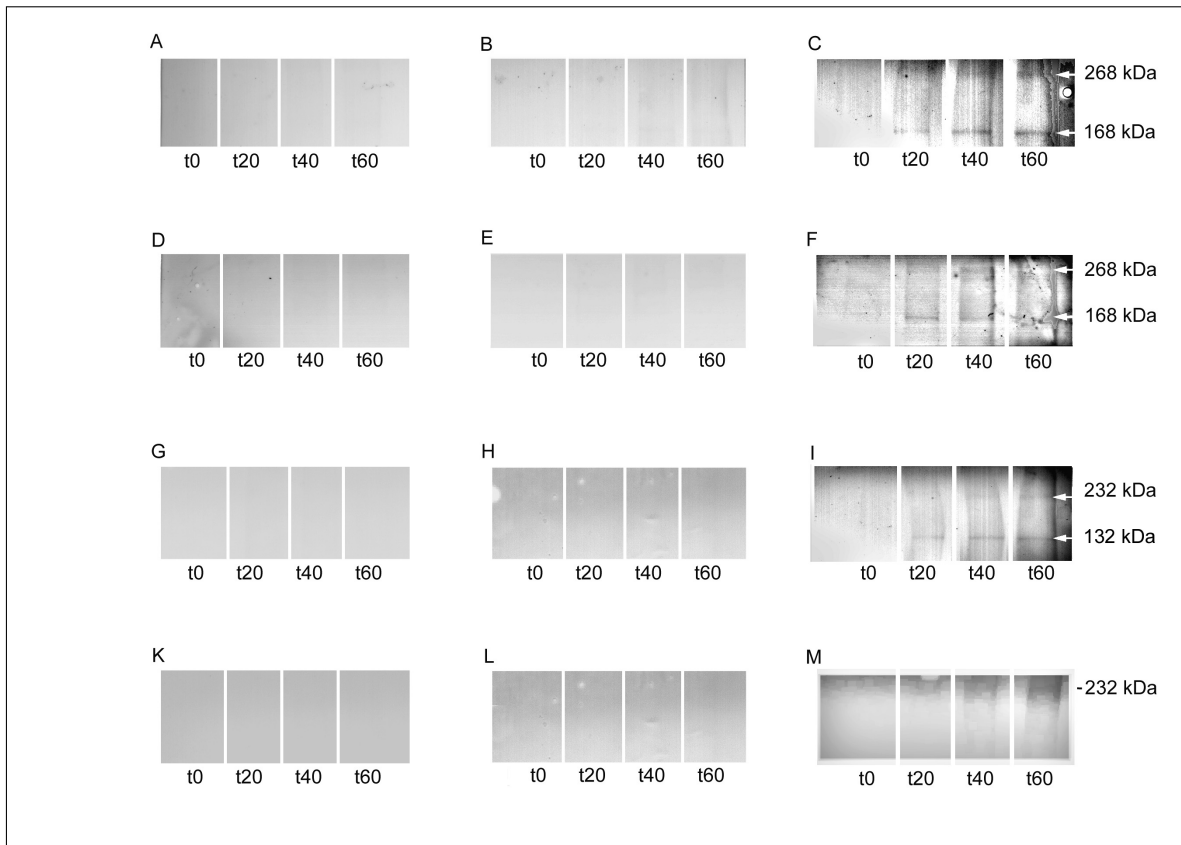


Abbildung 3.19: Chemische Quervernetzung von rekombinantem CapZ bzw. separat renaturierten rCapZ β -Untereinheiten mit Glattmuskel- α -Actinin. Rekombinantes CapZ bzw. separat renaturierte Untereinheiten, α -Actinin oder rCapZ/ α -Actinin wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt und mit 20 mM EDC versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, zu SDS-Proben verarbeitet und in der SDS-PAGE in gleichen Volumina eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und mit dem p-a CapZ aff.-Antikörper (Verdünnung 1:200) inkubiert. (A, D, G, K) Kontrollen der renaturierten rekombinanten Proteine, (B, E, H, L) Kontrollen α -Actinin. Es findet keine Quervernetzung der Einzelproteine statt. (C) rCapZ $\alpha_1\beta_1$ + α -Actinin, (F) rCapZ $\alpha_2\beta_2$ + α -Actinin, (I) rCapZ β_1 + α -Actinin, (M) rCapZ β_2 + α -Actinin. Ausschnitt. t: Zeit [min].

Bei der Quervernetzung der rekombinanten, separat rückgefalteten β_1 -Untereinheit erscheinen im zeitlichen Verlauf der Reaktion zwei schwache Banden im Molekulargewichtsbereich von 132 kDa und 232 kDa (Abbildung 3.19 I und M). Dies entspricht der Summe

der Molekularmasse der β_1 -Untereinheiten (32 kDa) und der des α -Actinins (100 kDa bzw. 200 kDa). Bei der Vernetzung der β_2 -Untereinheit mit α -Actinin konnte nur eine Proteinbande im Massenbereich von ca. 232 kDa detektiert werden.

Bei der Quervernetzung der CapZ α -Untereinheiten mit α -Actinin wurden keine Banden in den Molekulargewichtsbereichen von 136 kDa bzw. 236 kDa gefärbt. Auf die Darstellung dieser Reaktionen wurde daher verzichtet.

3.1.8.3 Analytische Gelfiltration zur Interaktion von α -Actinin mit CapZ und dessen Untereinheiten

Zur weiteren Analyse der Interaktionen von nativem CapZ, den rekombinanten Heterodimeren bzw. der separat rückgefalteten rCapZ-Untereinheiten mit α -Actinin wurden analytische Gelfiltrationen durchgeführt. Mögliche Interaktionen zwischen den Proteinen können im Ausschrieb des Detektors anhand von Peakverschiebungen, -verbreiterungen oder dem Erscheinen neuer Peaks beobachtet werden. Diese Veränderungen werden dabei durch die Bildung von Proteinkomplexen, die höhere Molekulargewichte als die Einzelproteine haben, verursacht.

Das Elutionsprofil der α -Actinin-Kontrolle (Abbildung 3.20) zeigt einen distinkten, symmetrischen Maximalausschlag bei einem Volumen von ca. 25 ml (blau), während das Profil von nativem CapZ einen symmetrischen Peak bei ca. 30 ml aufweist (schwarz). Nach der Applikation der Proteingemische rCapZ $\alpha_1\beta_1$ (grün) bzw. $\alpha_2\beta_2$ (rot) mit α -Actinin erscheinen die linken Peakflanken verbreitert. Dies spricht für eine Interaktion der Heterodimere mit α -Actinin. Komplexe, die sich aus beiden Proteine zusammensetzen, haben höhere Molekulargewichte als die Einzelproteine und eluieren damit in der Gelfiltration vor den Einzelproteinen.

Zur Beantwortung der Frage, welche CapZ-Untereinheiten an der Interaktion mit α -Actinin beteiligt sind, wurden die separat renaturierten Untereinheiten mit α -Actinin inkubiert und ebenfalls einer Gelfiltration unterzogen (Abbildung 3.21). Die Elutionsprofile der rCapZ α -Untereinheiten mit α -Actinin zeigten keine Verbreiterung des α -Actinin-Peaks (Abbildung 3.21 A). Auch eine Erhöhung der Konzentration der rCapZ α_1 -Untereinheit auf 1:12 (Mol:Mol) im Ansatz zeigte keine Interaktionen (grün). Des Weiteren eluierten diese Untereinheiten im gleichen Volumen (ca. 31 ml) wie die rCapZ α -Kontrolle ohne Zusatz von α -Actinin (schwarz). Somit interagieren diese Untereinheiten nicht mit α -Actinin.

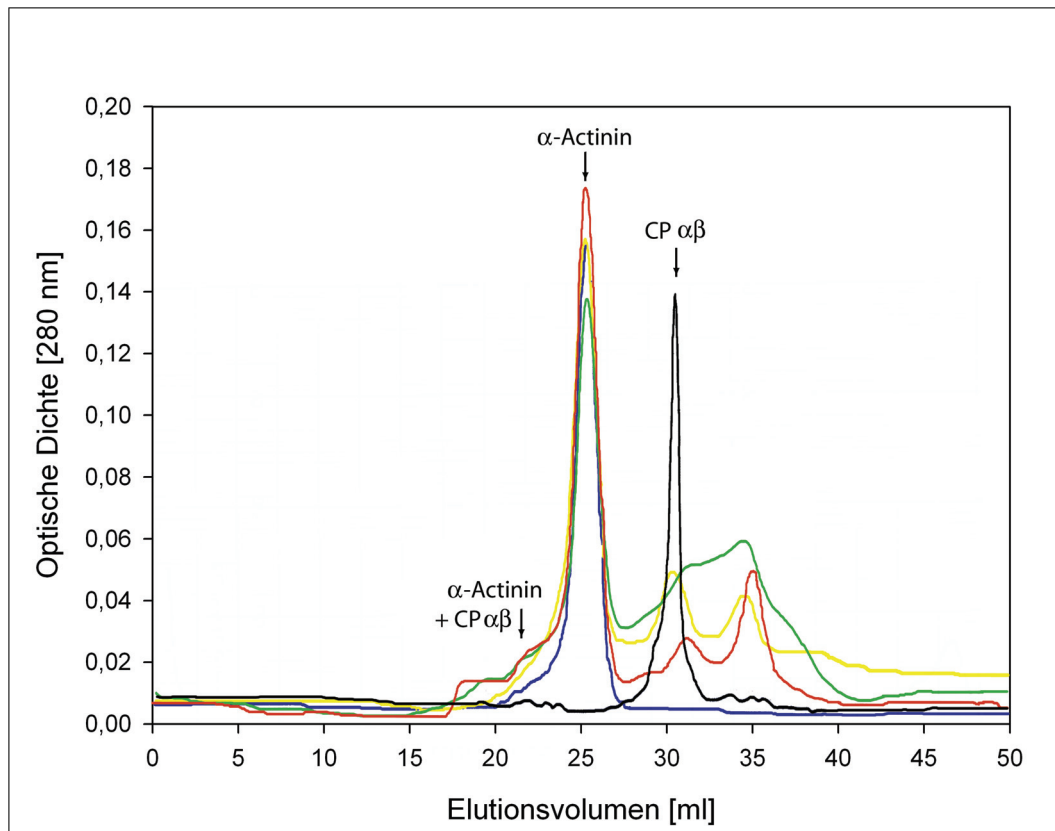


Abbildung 3.20: Analytische Gelfiltration zur Interaktion von rCapZ-Heterodimeren bzw. nativem CapZ mit Glattmuskel- α -Actinin. Die heterodimeren Cappingproteine wurden mit α -Actinin im molaren Verhältnis von 1:6 (60 μg α -Actinin und 120 μg Capping Protein) inkubiert und einer analytischen Gelfiltration unterzogen. Während reines α -Actinin (blau) in einem Volumen von ca. 25 ml und natives CapZ (schwarz) in einem Volumen von ca. 31 ml eluierten, zeigten die Proteingemische mit α -Actinin und rCapZ $\alpha_1\beta_1$ (grün) bzw. rCapZ $\alpha_2\beta_2$ (rot) eine deutliche Verbreiterung der linken Flanke des α -Actinin-Peaks.

Die Elutionsprofile der Ansätze rCapZ β_1 bzw. β_2 und α -Actinin (Abbildung 3.21 B) beinhalten deutliche Hinweise auf eine Interaktion dieser Proteine. So sind die Peaks des α -Actinins in Gemischen mit rCapZ β (grün: β_1 , rot: β_2) im Vergleich zum reinen α -Actinin (blau) an ihren linken Flanken deutlich verbreitert. Außerdem erscheinen die Peaks der rCapZ β -Untereinheiten in rCapZ β / α -Actinin-Ansätzen im Vergleich zum Kontrollansatz mit reiner β_1 -Untereinheit deutlich abgeflacht. Die β -Untereinheiten scheinen im Verlauf der Gelfiltration mäßig stark an α -Actinin zu binden und von diesem verzögert abzuwandern. Dies führt dann zu einer Verbreiterung und Abflachung der Peaks der rCapZ β -Untereinheiten, wobei es bei den Symmetrien der rCapZ β - bzw. α -Actinin-Peaks im Vergleich keine isoformspezifischen Unterschiede gibt.

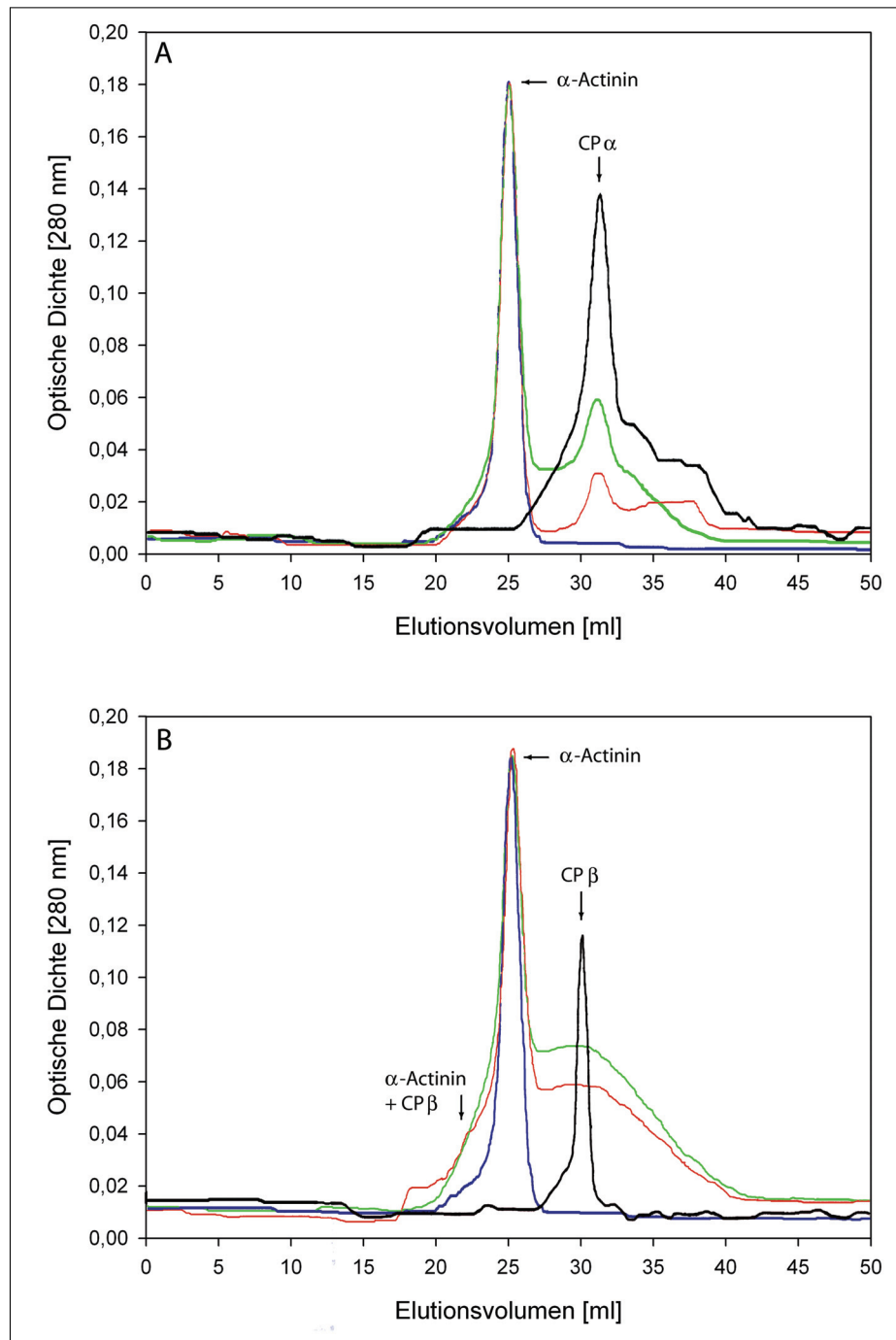


Abbildung 3.21: Analytische Gelfiltration zur Interaktion von separat renaturierten rCapZ-Untereinheiten mit Glattmuskel- α -Actinin. Je $60 \mu\text{g}$ der separat rückgefalteten rCapZ-Untereinheiten wurden mit $60 \mu\text{g}$ α -Actinin versetzt (Verhältnis α -Actinin:CapZ-Untereinheit: 1:6) und einer analytischen Gelfiltration unterzogen. (A) Die separat renaturierten rCapZ α -Untereinheiten interagieren nicht mit α -Actinin. Die Symmetrien der α -Actininpeaks der Ansätze rCapZ α_1 (grün) und rCapZ α_2 (rot) sind identisch mit der α -Actininkontrolle (blau). Auch die Peaks der jeweiligen rCapZ α -Untereinheiten zeigen keine Verschiebung im Vergleich zur Kontrolle (schwarz). (B) Bei der Interaktion von α -Actinin mit den rCapZ-Untereinheiten β_1 (grün) und β_2 (rot) zeigt sich eine deutliche Verbreiterung der linken Flanke der α -Actininpeaks im Vergleich zur α -Actininkontrolle (blau). Die Peaks der rCapZ β -Untereinheiten sind im Vergleich zur Kontrolle (schwarz, nur rCapZ β) verbreitert und abgeflacht.

Zu den Interaktionen der einzeln renaturierten CapZ-Untereinheiten und rekombinanten CapZ mit Actin bzw. α -Actinin läßt sich folgendes zusammenfassend sagen: Die rekombinanten CapZ-Heterodimere $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_2$ binden ebenso wie natives CapZ an Glattmuskel-F-Actin. Die separat rückgefalteten rekombinanten CapZ-Untereinheiten β_1 und β_2 binden ebenfalls an Glattmuskel-F-Actin, allerdings konnte eine Bindung von separat renaturierten CapZ α -Untereinheiten an F-Actin durch Kosedimentationsanalysen nicht nachgewiesen werden. Sie zeigen jedoch geringe Capping- und Nukleationsaktivität. Die rekombinanten CapZ-Heterodimere $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_2$ binden an Glattmuskel-G-Actin, wobei mindestens zwei G-Actin-Monomere pro Heterodimer gebunden werden. Die separat renaturierten β -Untereinheiten binden an Glattmuskel-G-Actin, wobei mindestens ein G-Actin-Monomer gebunden wird. Eine Bindung von separat renaturierten CapZ α -Untereinheiten an G-Actin konnte nicht nachgewiesen werden. Wie bei den meisten F-Actin-bindenden Proteinen waren die Interaktionen mit G-Actin sehr schwach und damit schwer detektierbar.

Sowohl die rekombinanten CapZ-Heterodimere $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_2$ als auch die separat rückgefalteten rekombinanten CapZ-Untereinheiten β_1 und β_2 binden an Glattmuskel- α -Actinin. Die Bindung ist jedoch sehr schwach und war durch Quervernetzungsexperimente kaum detektierbar. Die Interaktionen ließen sich jedoch durch analytische Gelfiltrationsexperimente verifizieren. Eine Bindung der separat rückgefalteten rCapZ α -Untereinheiten an Glattmuskel- α -Actinin konnte weder durch chemische Quervernetzung noch durch Gelfiltrationsassays nachgewiesen werden. Durch den Einsatz zweier voneinander unabhängiger Techniken bei der Untersuchung von α -Actinin-CapZ-Interaktionen, die beide die gleichen Resultate erbrachten, können diese Interaktionen als gesichert angesehen werden.

3.2 Das polyklonale CapZ β_2 -Peptidantiserum

Im Auftrag der AG Biochemische Zellbiologie wurde von der Firma Pineda (Berlin) ein synthetisches Peptid erzeugt, welches in seiner Sequenz dem C-Terminus der CapZ β_2 -Untereinheit gleich. Dieses Peptid wurde von der Firma an ein starkes Immunogen gekoppelt und Kaninchen injiziert. Die gewonnenen Antiseren wurden im Rahmen dieser Arbeit in Immunblotanalysen auf deren Kreuzreaktivität getestet. Dazu wurden SDS-Proben von gereinigtem nativen CapZ, Bakteriengesamtextrikte mit der rekombinanten CapZ β_1 - und β_2 -Untereinheit sowie Ganzgewebeproben der Milz und des Magen-Glattmuskels vom Hausschwein in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und einer Immunblotanalyse unterzogen. Die Milz enthält vorwiegend die CapZ β_2 -Isoform.

Nach Test der einzelnen Seren wurde das reaktivste ausgewählt (150. Immunisierungstag) und dieses sowie das Praeimmunserum in einer weiteren Immunblotanalyse eingesetzt

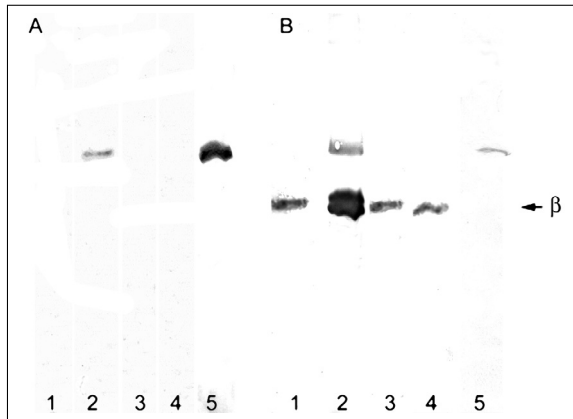


Abbildung 3.22: Test des Peptid-Antiserums auf Kreuzreaktivität. Das Präimmunsrum (A) und das Peptidantiserum ((B), 150. Immunisierungstag) wurden in einer Immunblotanalyse auf ihre Kreuzreaktivität mit nativem CapZ (1), bakteriellem Gesamtextrakt mit rekombinanter CapZ β_2 -Untereinheit (2), Gewebeproben des Magenglattmuskels (3) und der Milz (4) sowie bakteriellem Gesamtextrakt mit rekombinanter CapZ β_1 -Untereinheit (5) getestet. CapZ β_2 -Peptidantiserum, 1:10.000; 2. Antikörper Peroxidase-gekoppelt.

(Abbildung 3.22). Die Reaktivität des Peptidantiserums war mit einer Verdünnung von 1:10.000 insgesamt sehr zufriedenstellend, es wurde in den Gewebeproben eine einzelne Proteinbande mit einer Molekularmasse von 32 kDa detektiert (Abbildung 3.22 B). Die Reaktion des Serums gegen natives CapZ war sehr schwach, da CapZ aus dem Skelettmuskel nur einen geringen Anteil der β_2 -Untereinheit aufweist. Im bakteriellen Gesamtextrakt mit rekombinanter β_1 -Untereinheit kann keine Reaktion im Molekularmassenbereich von 32 kDa beobachtet werden. Das Präimmunsrum zeigt ausschließlich Reaktionen auf bakterielle Proteine.

3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunocytochemische Lokalisationsstudien an den actinbindenden Proteinen CapZ, der CapZ β_2 -Untereinheit sowie α -Actinin und Vinculin in myogenen Kulturzellen und Glattmuskeln vorgenommen. Für die Untersuchungen an myogenen Zellen wurde eine C₂C₁₂-Zelllinie benutzt, für Untersuchungen an glatter Muskulatur wurden Gewebsschnitte des *taenia coli* aus Meerschweinchen sowie isolierte Zellen aus der Muskulatur des Schweinemagens und dem *taenia coli* aus Meerschweinchen verwendet. Außerdem wurden isolierte Zellkerne aus C₂C₁₂- und Glattmuskelzellen eingesetzt.

3.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Gesamt-Actin und β -Actin in C₂C₁₂-Zellen

Um Informationen über die Verteilung von β -Actin in C₂C₁₂-Zellen zu erhalten, wurden die Zellen mit einem monoklonalen anti- β -Actin-Antikörper inkubiert. Zur Detektion des gesamten Actin-Gehalts wurden die Zellen außerdem mit Rhodamin-Phalloidin inkubiert. Bei der Kolokalisation können dann Aussagen über die isoformspezifische Beteiligung von

β -Actin an actingebundenen Prozessen getroffen werden.

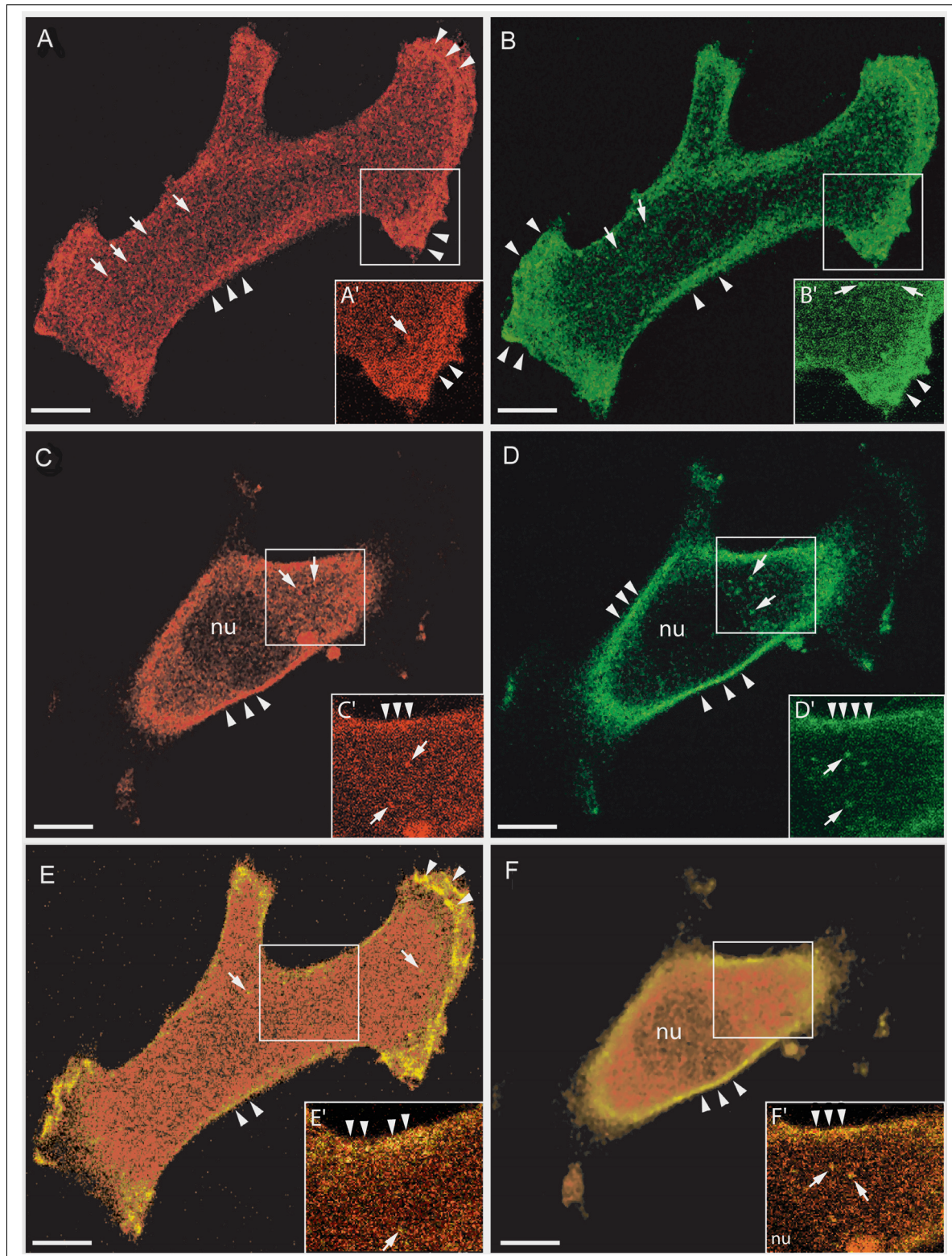


Abbildung 3.23: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Gesamt- und β -Actin in C_2C_{12} -Zellen.

Zu Abbildung 3.23: (A) Rhodamin-Phalloidin-Färbung; Actin ist in der gesamten Basalebene, vor allem

3 Ergebnisse

im Bereich des Leitsaums, aber auch in punktiert erscheinenden Fokalkontakten an der Zellbasis präsent. (B) Die β -Isoform des Actins ist größtenteils in der Zellperipherie lokalisiert (parallele Pfeilspitzen), findet sich aber auch in einzelnen Fokalkontakten der Basalebene (Pfeile). (C) In der Medialebene kann Actin vor allem in Membrannähe nachgewiesen werden (Pfeilspitzen), erscheint aber auch in punktierten cytosolischen Bereichen (Pfeile). (D) β -Actin ist fast ausschließlich peripher lokalisiert (Pfeilspitzen). Nur vereinzelt ist eine punktierte Färbung im Zelllumen erkennbar (Pfeile). Die Kolokalisation von β - (grün) und Gesamtactin (rot) in der Basalebene (E) und Medialebene (F) verdeutlicht die distinkte Verteilung von β -Actin auf membrannähe Bereiche (Pfeilspitzen). Innerhalb der Zelle ist diese Isoform nur wenig am Aufbau actinhaltiger Systeme beteiligt (Pfeile). Balken: 5 μm . (A') - (F') Ausschnittsvergrößerungen. cLSM-Aufnahmen.

In Höhe der Basalebene der Zellen ist Actin vor allem in den Bereichen des Leitsaums in den Lamellipodien und allgemein in unmittelbarer Membrannähe lokalisiert (Abbildung 3.23 A, Pfeilspitzen), findet sich aber auch in punktiert erscheinenden Strukturen, die über die ganze Zellbasis verteilt vorliegen (Abbildung 3.23 A, Pfeile). Bei diesen handelt es sich um Fokalkontakte, die die Anheftung der Zelle an den Untergrund bzw. die extrazelluläre Matrix (ECM) vermitteln. In der Transversalebene liegt Actin vor allem in der Nähe der Zellmembran vor, wo es das Membranskelett bildet (Abbildung 3.23 C, Pfeile). Es ist aber auch in punktförmigen cytoplasmatischen Bereichen, die Teile des Cytoskeletts repräsentieren, lokalisiert.

Die Lokalisation von β -Actin in der Basalebene von C_2C_{12} -Zellen ähnelt der des Gesamtactins. So werden von dem monoklonalen β -Actin-Antikörper vor allem Strukturen im Bereich des Leitsaums und der gesamten Plasmamembran erkannt (Abbildung 3.23 B, Pfeilspitzen). In inneren Bereichen der Zelle werden punktförmige Strukturen gefärbt, die aber im Vergleich zur Färbung mit RhPh schwächer ausgeprägt sind (Abbildung 3.23 B, Pfeile).

Im Medialschnitt ist β -Actin fast ausschließlich in peripheren Bereichen der Zelle lokalisiert (Abbildung 3.23 D, Pfeilspitzen). Es erscheinen nur wenige punktförmige Strukturen in der Nähe des Zellkerns (Abbildung 3.23 D, Pfeile).

Bei der Kolokalisation von Gesamt- und β -Actin erscheinen Bereiche, die die β -Isoform enthalten, gelb (Abbildung 3.23 E und F), da Phalloidin alle Actinfilamente mit mehr als 7 Actinmolekülen unabhängig von deren Isoform detektiert (Visegrady et al., 2005 [200]). Die gelb gefärbten Areale befinden sich sowohl in der Basal- als auch in der Medialebene fast ausschließlich in peripheren, membrannahen Bereichen (Pfeilspitzen). β -Actin kann jedoch auch in wenigen punktiert erscheinenden Strukturen im Cytoplasma beobachtet werden (Pfeile).

β -Actin scheint also hauptsächlich am Aufbau des Membranskeletts und der Bildung

des Leitsaums beteiligt zu sein, während die übrigen Actin-Isoformen vorwiegend andere Strukturen in der Zelle aufbauen.

3.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ und β -Actin in C_2C_{12} -Zellen

Zur Untersuchung einer möglichen Kolo-kalisation von CapZ und β -Actin in C_2C_{12} -Zellen wurden diese mit affinitätsgereinigtem p-a CapZ-Antikörper und monoklonalem β -Actin-Antikörper inkubiert. In Abbildung 3.24 A ist die Verteilung von CapZ in der Basalebene gezeigt. Es erscheinen punktförmige Strukturen (Pfeile), welche gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt vorliegen. Dieses Muster spiegelt die Verteilung von Fokalkontakten wider. Eine lokale Häufung von CapZ, z.B. im Leitsaum oder an der Plasmamembran der Zelle, ist nicht erkennbar (Abbildung 3.24 A').

Abbildung 3.24 B zeigt die Lokalisation von β -Actin in der gleichen Ebene. Auch hier erscheinen überwiegend punktierte Strukturen, die, ähnlich der Lokalisation von CapZ, gleichmäßig über die Zelle verteilt sind (Pfeile). Ebenso werden Bereiche im Leitsaum der Zelle verstärkt angefärbt, welche sich strukturell von der übrigen Färbung unterscheiden (Pfeilspitze). β -Actin scheint hier überwiegend in langen Filamenten organisiert vorzuliegen.

Bei der Überlagerung der Bilder (Abbildung 3.24 C) erscheinen einige Bereiche der Zelle gelb (Pfeile). Hier liegt eine Kolo-kalisation von CapZ und β -Actin vor, welche verstärkt im Bereich des Leitsaums auftritt. Außerdem sind punktförmigen Strukturen zu erkennen, welche relativ gleichmäßig über die Zellbasis verteilt auftreten. Auch in der Peripherie des Zellkerns kann verstärkt eine Kolo-kalisation beobachtet werden. Im Lamellipodium sind jedoch auch einige kleine Bereiche zu erkennen, in denen CapZ nicht zusammen mit β -Actin kolo-kalisiert (Abbildung 3.24 C, Pfeilspitze). Durch Überlagerung aller bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie erhaltenen Bilder (Abbildung 3.24 D) kann die Gesamtverteilung von CapZ und β -Actin in allen Ebenen der Zelle beobachtet werden. So sind beide Proteine verstärkt in punktförmigen Strukturen des Cytoplasmas, die sich bis in die Peripherie des Zellkerns erstrecken und in z. T. bänderartigen Strukturen im Bereich der Lamellipodien (Pfeile) vertreten. In der Nähe der Kernmembran sind in punktiert erscheinenden Arealen beide Proteine lokalisierbar (Abbildung 3.24 D, Pfeile). Dies führt zu der Annahme, dass Capz auch mit Kernstrukturen assoziiert ist.

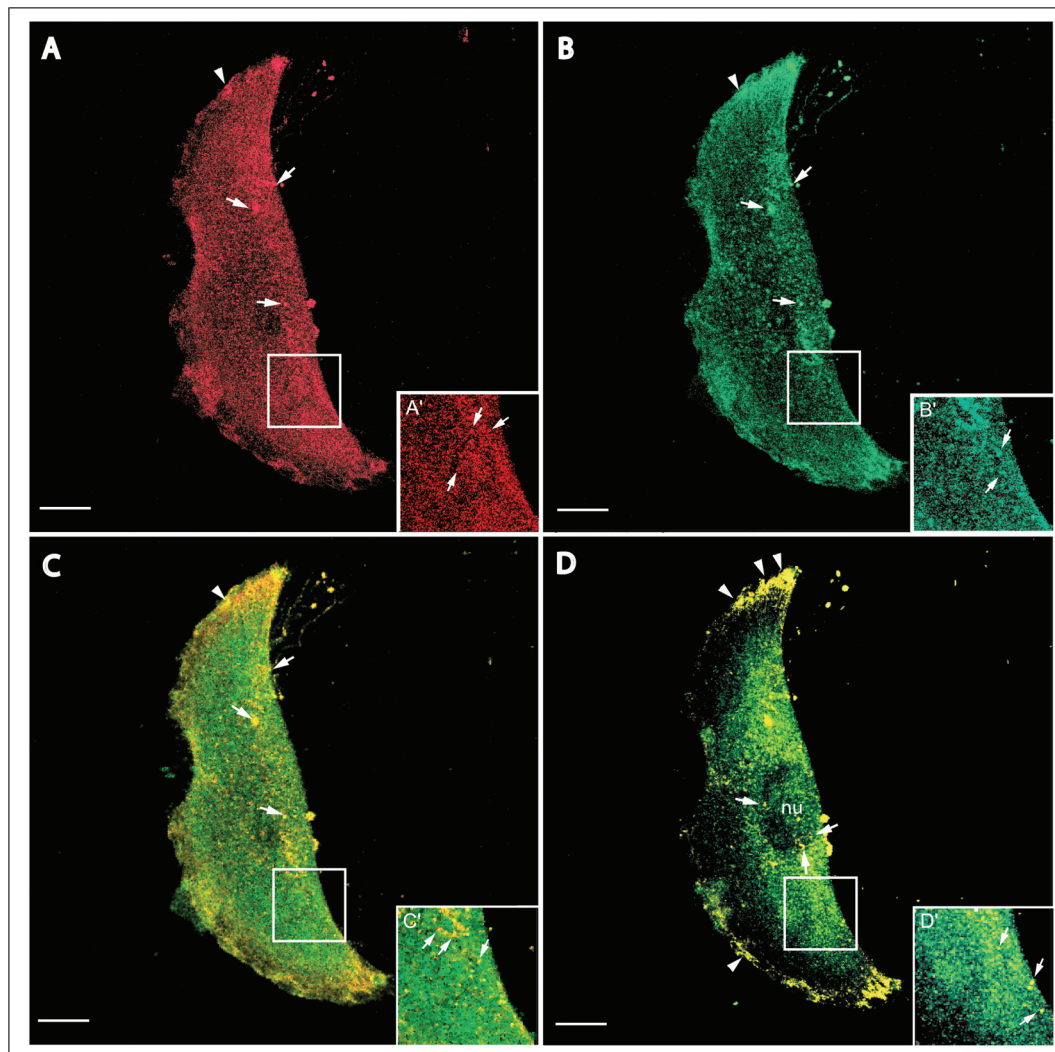


Abbildung 3.24: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ und β -Actin in C_2C_{12} -Zellen. (A) CapZ kann in punktförmigen, gleichmäßig verteilten Strukturen in der Basalebene lokalisiert werden, während β -Actin vor allem in Lamellipodien und fokalen Kontakten nachgewiesen werden kann (B). Die Lokalisierung von CapZ und β -Actin in der Basalebene zeigt das Auftreten beider Proteine in Lamellipodien und Fokalkontakten (C). In der Totalansicht der Zelle (D) ist der größte Teil des CapZs zusammen mit β -Actin im Leitsaum lokalisiert. Beide Proteine lassen sich jedoch auch zusammen in der Kernperipherie nachweisen (Pfeile). Balken: 5 μ m. Zweit-Antikörper: g-ar rh (p-a CapZ) und g-am FITC (m-a β -Actin); A' bis D': Ausschnittsvergrößerungen.

3.3.3 Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation der CapZ β_2 -Untereinheit und β -Actin in C_2C_{12} -Zellen

Die folgende Koloalisationsstudie sollte zeigen, ob die CapZ β_2 -Untereinheit *in vivo* ausschließlich mit β -Actin assoziiert ist, oder ob sich Strukturen nachweisen lassen, in denen die β_2 -Untereinheit separat vorliegt. Dazu wurden die C_2C_{12} -Zellen mit monoklonalem

β -Actin-Antikörper und dem CapZ β_2 -Antiserum und den entsprechenden Zweitantikörpern inkubiert (Abbildung 3.25). Die CapZ β_2 -Untereinheit ist vor allem im Leitsaum der Zelle lokalisiert (Abbildung 3.25 A, Pfeilspitzen). Es werden in der Basalebene jedoch auch punktförmige Strukturen erkannt, welche gleichmäßig über die Zellebene verteilt vorliegen. Bei diesen handelt es sich um Fokalkontakte, welche die Adhäsion der Zelle an extrazelluläre Strukturen wie die extrazelluläre Matrix vermitteln (Pfeile).

Abbildung 3.25 B zeigt erneut die Verteilung von β -Actin in der Basalebene der Zelle. Es ist, wie bereits erwähnt, überwiegend in der Zellperipherie, vor allem aber in den Lamellipodien lokalisiert. Es werden jedoch auch Fokalkontakte und faserartige Bündel, welche sich überwiegend apikal orientieren, erkannt (Pfeile). Bei der Überlagerung beider Bilder erscheinen ausschließlich gelb und grün gefärbte Bereiche (Abbildung 3.25 C). Eine Kollokalisierung in der Basalebene kann vor allem in der Peripherie der Zelle, besonders im Bereich der Lamellipodien aber auch in punktiert erscheinenden Arealen an der Zellbasis gezeigt werden (Pfeile).

Abbildung 3.25 D zeigt die Überlagerung der Bilder von sämtlichen Schnittebenen. Hier erscheinen zusätzlich zu den schon erwähnten Strukturen in der Medialebene der Zelle im Bereich der Cytoplasmamembran gelb punktierte Bereiche (Pfeile), welche ebenfalls CapZ β_2 und β -Actin enthalten.

Zur genaueren Lokalisierung der CapZ β_2 -Untereinheit in C₂C₁₂-Zellen in der Nähe des Zellkerns und der Plasmamembran wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (Abbildung 3.25 E und F). Hier zeigen sich punktierte Linien im Bereich der Cytoplasmamembran von Filopodien (Abbildung 3.25 E, lange Pfeile) sowie punktierte Areale innerhalb der Filopodien (kurze Pfeile), bei denen es sich um Fokalkontakte handelt. Im Bereich der Kernmembran kann die CapZ β_2 -Untereinheit verstärkt lokalisiert werden (Abbildung 3.25 F). Auch hier erscheint eine eng an den Zellkern anliegende, punktierte Linie sowie einzelne, stark fluoreszierende Bereiche in der Umgebung des Zellkerns (Pfeile). Bei diesen scheint es sich um Verknüpfungspunkte von cytoskeletalen Actinfilamenten zu handeln. Innerhalb des Kerns sind diffuse, wolkige Färbungen zu erkennen, welche allerdings relativ selten beobachtet werden konnten. Um welche Art von Struktur es sich hierbei handelt, konnte nicht festgestellt werden.

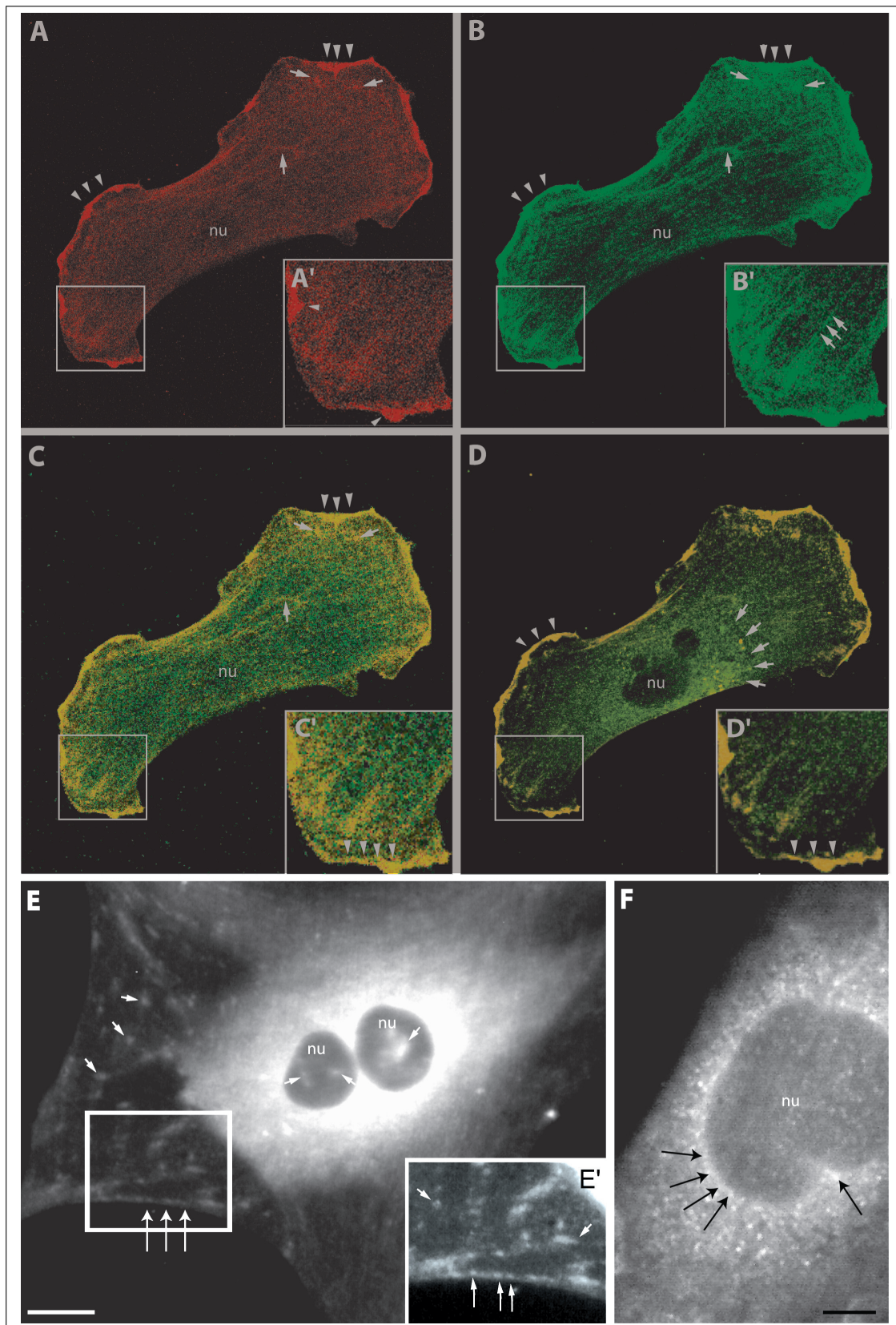


Abbildung 3.25: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ β_2 und β -Actin in C₂C₁₂-Zellen.

Zu Abbildung 3.25: In der Basalebene ist die CapZ β_2 -Untereinheit in hohen Konzentrationen im Leitsaum der Zelle präsent (A, Pfeilköpfe), sie kann aber auch innerhalb der Zellebene in punkt- und bänderförmigen Bereichen nachgewiesen werden. β -Actin bildet in der Basalebene lange, apikal verlaufende Bündel (B'), ist aber verstärkt im Leitsaum ((B), Pfeilköpfe) und Fokalkontakten ((B), Pfeile) lokalisiert. Die Kolo-kalisation von CapZ β_2 und β -Actin in der Basalebene zeigt, dass die CapZ β_2 -Untereinheit nur zusammen mit β -Actin lokalisiert ist (C). Auch in der Projektionsansicht dieser Kolo-kalisation, die die gesamte Zelle zeigt, ist die CapZ β_2 -Untereinheit immer mit β -Actin kolo-kalisiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lokalisation von CapZ β_2 -Untereinheiten zeigen die Verteilung des Proteins an der Membran ((E') und (E), lange Pfeile) in Zellkernen (E, kurze Pfeile im Nukleus) und in Fokalkontakten ((E), kurze Pfeile) sowie in der Peripherie der Kernmembran (F). Balken in (A) - (D): 10 μm , (E): 5 μm , (F): 3 μm ; nu: Nukleus; cLSM- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

3.3.4 Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ, CapZ β_2 und α -Actinin in C₂C₁₂-Zellen

Die Lokalisierung von CapZ, CapZ β_2 und α -Actinin in C₂C₁₂-Zellen wurde unter Einsatz des affinitätsgereinigten CapZ-Antikörpers, des CapZ β_2 -Antiserums und eines monoklonalen α -Actinin-Antikörpers durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob auch *in vivo* eine Interaktion von CapZ und α -Actinin zu beobachten ist und ob diese Interaktion möglicherweise isoformspezifisch stattfindet.

Abbildung 3.26 A zeigt die Lokalisation der CapZ-Untereinheit β_2 in der Basalebene. Es lassen sich, wie bereits beschrieben, punktierte Färbungen, welche über die gesamte Fläche verteilt sind, erkennen (Pfeile). Am linken unteren Leitsaum der Zelle sind einzelne Punkte zu erkennen, welche in gleichem Abstand zueinander angeordnet sind. Im Bereich des Zellkerns erscheint die Färbung deutlich schwächer, das charakteristische Muster bleibt allerdings erhalten.

Die Lokalisation von CapZ zeigt ein ähnliches Muster wie die der β_2 -Untereinheit (Abbildung 3.26 B). Auch hier läßt sich eine punktierte Färbung in der gesamten basalen Zellebene erkennen (Pfeile). Deutlich stärker ausgeprägt ist die Färbung im Bereich der Lamellipodien. Außerdem sind in einigen membran-nahen Bereichen punktierte Linien zu erkennen (Pfeilspitzen), bei denen es sich um Verankerungspunkte von F-Actin handelt. α -Actinin ist, ebenso wie CapZ und die CapZ β_2 -Untereinheit, in gleichmäßiger Punktierung über die Basalebene der Zelle verteilt (Abbildung 3.26 C und D). Vor allem im Bereich von fokalen Kontakten sowie F-Actin-Ansatzstellen an der Plasmamembran kann es nachgewiesen werden (Pfeile).

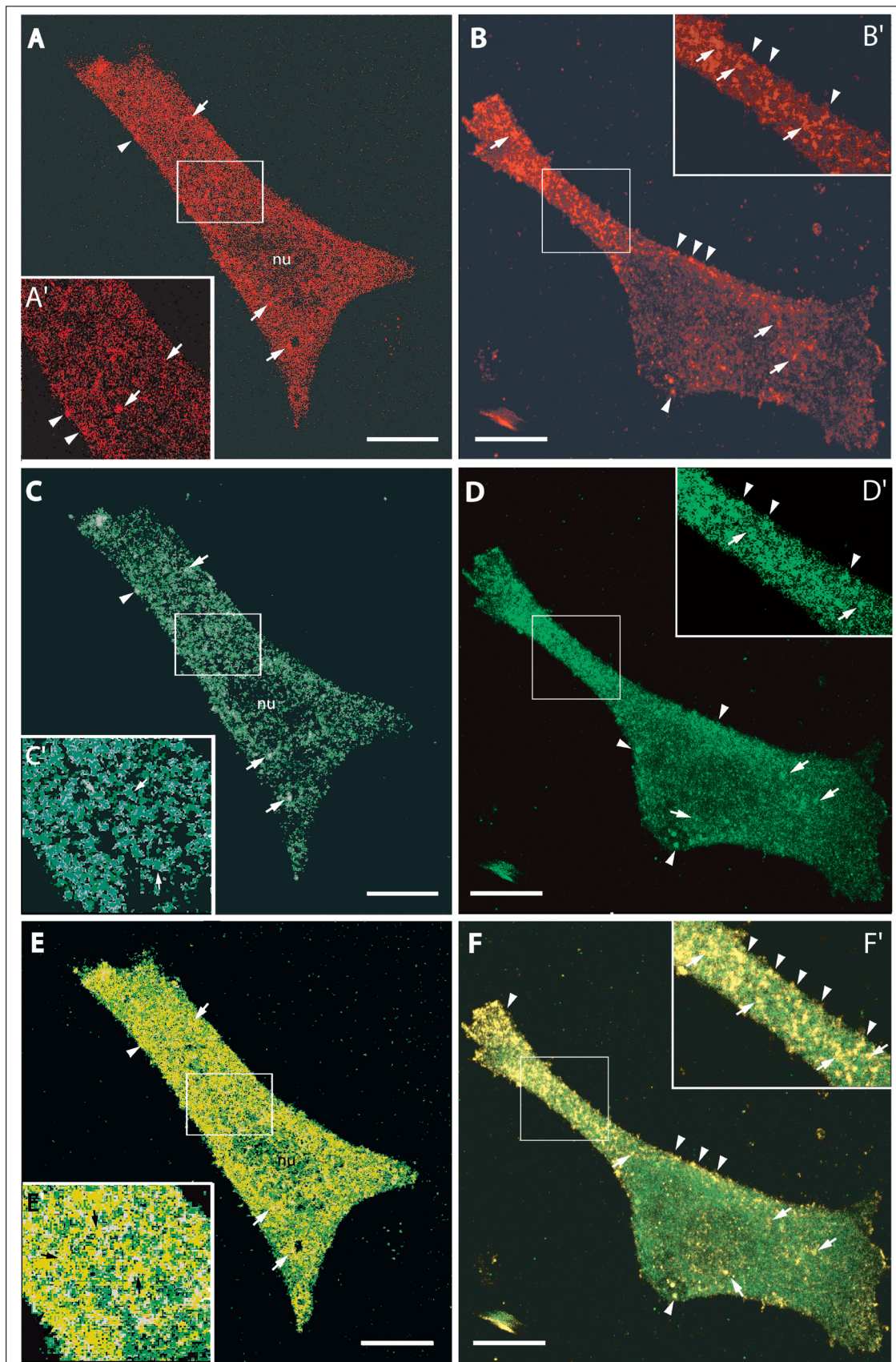


Abbildung 3.26: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ, CapZ β_2 und α -Actinin in C₂C₁₂-Zellen.

Zu Abbildung 3.26: In der Basalebene der Zelle liegen die CapZ-Untereinheit β_2 (A) und CapZ (B) in punktierten Bereichen gleichmäßig über die gesamte Zellebene verteilt vor. Die Lokalisation von α -Actinin erzeugt ein ähnliches Muster mit punktförmigen, gleichmäßig verteilten Strukturen in der gesamten Basalebene ((C) und (D)). Die Kolokalisation von α -Actinin mit CapZ/ β_2 (E) bzw. CapZ (F) zeigt, dass in diesen Zellen heterodimere Capping Proteine unabhängig von der Isoform immer zusammen mit α -Actinin vorliegen. Balken: 5 μm . Zweit-Antikörper: g-ar rh (p-a CapZ aff., p-a CapZ/ β_2) und g-am FITC (m-a α -Actinin). cLSM-Aufnahmen.

Abbildung 3.26 E zeigt die Kolokalisation der CapZ/ β_2 -Untereinheit mit α -Actinin in der Basalebene der Zelle. Vor allem in Zellkernnähe sowie in membrannahen Bereichen und in fokalen Kontakten erscheinen gelb gefärbte, punktförmige Strukturen, welche beide Proteine beinhalten (Pfeile). Die Kolokalisation von CapZ mit α -Actinin (Abbildung 3.26 F) zeigt weniger gelb gefärbte Bereiche. Diese liegen jedoch, ähnlich der Kolokalisation von CapZ/ β_2 und α -Actinin, verstärkt in der Peripherie des Zellkerns sowie im Lamellipodium und an der Cytoplasmamembran. Es können keine Areale ausgemacht werden, in denen CapZ oder die CapZ/ β_2 -Untereinheit nicht mit α -Actinin kolokalisiert sind. Somit scheint die Interaktion von CapZ und α -Actinin zumindest in diesen Zellen ein allgemeines, strukturbildendes Prinzip darzustellen.

3.3.5 Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Vinculin, CapZ und CapZ/ β_2 in Gewebsschnitten und isolierten Zellen des *taenia coli*

Die bisherigen immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden an myogenen Zellen durchgeführt, da diese eine relativ übersichtliche cytoskeletale Organisation aufweisen. Die dort erzielten Ergebnisse lassen sich jedoch nur bedingt auf andere kontraktile Zellen übertragen. Daher wurden in den folgenden Lokalisationsstudien Gewebeschnitte und isolierte Einzelzellen des *taenia coli* eingesetzt, um auch in Glattmuskulzellen Aussagen über die Isoformverteilung von CapZ und β -Actin zu erhalten.

Zur weiteren Lokalisierung von CapZ und der CapZ/ β_2 -Untereinheit wurden Cryoschnitte vom *taenia coli* des Meerschweinchens hergestellt und mit monoklonalen α -Vinculin-, den affinitätsgereinigten CapZ-Antikörpern und dem CapZ/ β_2 -Antiserum sowie entsprechenden fluorochromgekoppelten Zweitantikörpern inkubiert (Abbildung 3.27).

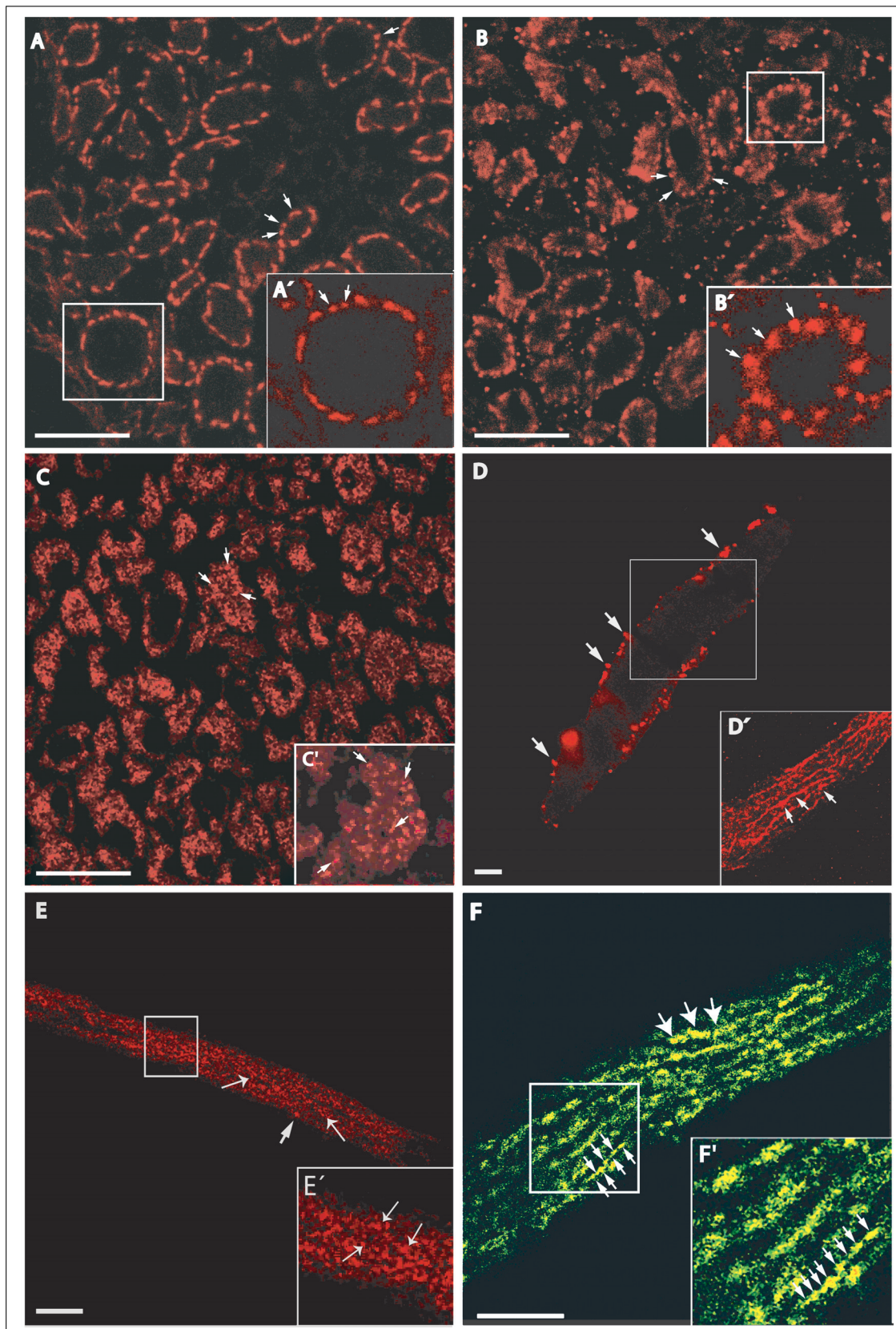


Abbildung 3.27: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Vinculin, CapZ und CapZ β_2 in Gewebsschnitten und isolierten Zellen des *taenia coli*.

3 Ergebnisse

Zu Abbildung 3.27: (A) Vinculin kann in membranständigen *dense plaques* lokalisiert werden (Pfeile). Die Detektion der CapZ β_2 -Untereinheit zeigt die gleiche Verteilung des Proteins (B). CapZ ist in *dense plaques* und *dense bodies*, die gleichmäßig in den Zellen verteilt vorliegen, lokalisiert (C, Pfeile). In der Medialebene einer isolierten Glattmuskelzelle kann die CapZ β_2 -Untereinheit ausschließlich an der Membran in punktierten Formationen mit perlschnurartiger Anordnung lokalisiert werden (D). Die Aufsicht verdeutlicht nochmals die perlschnurartige Aufreihung in longitudinal verlaufenden Bändern unterhalb der Plasmamembran (D'). CapZ liegt in der Medialebene von isolierten Glattmuskelzellen in *dense bodies* (lange Pfeile) und *dense plaques* (kurzer Pfeil) vor (E). Die Kolo-kalisation von β -Actin und CapZ β_2 zeigt β -Actin-Stränge, die unterhalb der Zellmembran entlang der Längsachse der Zelle verlaufen ((F), dicke Pfeile), wobei die CapZ β_2 -Untereinheit in punktierten Strukturen perlschnurartig auf diesen Bändern aufgereiht vorliegt (F'). (A') bis (C'), (E') und (F') Ausschnittsvergrößerungen; Balken: 5 μ m. cLSM-Aufnahmen.

Vinculin wurde bereits in den *dense plaques* von Glattmuskelzellen nachgewiesen ([170], [138]) und soll hier als Markerprotein für diese Strukturen dienen. In Abbildung 3.27 A ist deutlich eine punktierte Färbung im Bereich der Plasmamembranen der einzelnen Glattmuskelzellen zu erkennen (Pfeile). Die Ausschnittsvergrößerung A' zeigt eine einzelne Zelle im Querschnitt. Die regelmäßige Anordnung von Vinculin-haltigen *dense plaques* ist im Bereich der Cytoplasmamembran deutlich zu erkennen (Pfeile).

Bei der Lokalisation der CapZ β_2 -Untereinheit erscheint im Vergleich zum Vinculin ein identisches Fluoreszenzmuster, auch hier werden punktförmige Strukturen im Bereich der Cytoplasmamembran erkannt, bei denen es sich um *dense plaques* handelt (Abbildung 3.27 B, Pfeile). Im Cytoplasma der Zellen kann die CapZ β_2 -Untereinheit nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 3.27 C zeigt die Lokalisation von CapZ in quergeschnittenen *taenia coli*-Gewebe. CapZ ist im gesamten Cytoplasma und der Cytoplasmamembran in punktförmigen Strukturen lokalisiert, bei denen es sich um cytoplasmatische *dense bodies* und membranständige *dense plaques* handelt. Die Ausschnittsvergrößerung 3.27 C' zeigt nochmals deutlich die punktierte Färbung der o.g. Strukturen (Pfeile).

In isolierten Glattmuskelzellen des *taenia coli* ist die CapZ β_2 -Untereinheit in der Medialebene ebenfalls in membranständigen *dense plaques* lokalisiert (Abbildung 3.27 D). Beim Übereinanderlegen aller Schnittebenen zeigen sich an der Zelloberfläche bänderförmige Areale, die in ihrer Hauptorientierung apikal verlaufen (Abbildung 3.27 D', Pfeile) und leicht punktiert erscheinen.

Ein Schnitt durch die Medialebene von CapZ-gefärbten Glattmuskelzellen zeigt eine distinkte Verbreitung des Proteins über das gesamte Cytoplasma sowie die Plasmamembran (Abbildung 3.27 E, Pfeile). Bei den hier erkannten Strukturen handelt es sich um *dense*

bodies, die gleichmäßig über das Cytoplasma verteilt vorliegen (dünne Pfeile) und *dense plaques* (dicker Pfeil), die in der Plasmamembran lokalisiert sind (Abbildung 3.27 E').

In diesen CapZ β_2 -haltigen Bändern an der Plasmamembran kann neben Vinculin auch β -Actin nachgewiesen werden (Abbildung 3.27 F). Dieses liegt in bänderförmigen, longitudinal verlaufenden Fasern vor, während sich die CapZ β_2 -Untereinheit perlschnurartig auf diesen Strukturen verteilt.

3.3.6 Immunblotanalyse zum Nachweis der CapZ β_2 -Untereinheit in C₂C₁₂-Zellkernen

In den vorhergehenden fluoreszenzmikroskopischen Lokalisationsstudien der CapZ β_2 -Untereinheit zeigte sich eine Färbung der Zellkernperipherie in allen untersuchten Zelltypen. Zum biochemischen Nachweis der CapZ β_2 -Untereinheit in Kernen von C₂C₁₂-Zellen wurden diese isoliert und zu SDS-Proben verarbeitet. Die Proben wurden im 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit dem Peptidantikörper CapZ β_2 inkubiert (Abbildung 3.28). Es lässt sich im Immunblot eine deutliche Bandenfärbung im Bereich von ca. 32 kDa erkennen (Abbildung 3.28 (2) *).

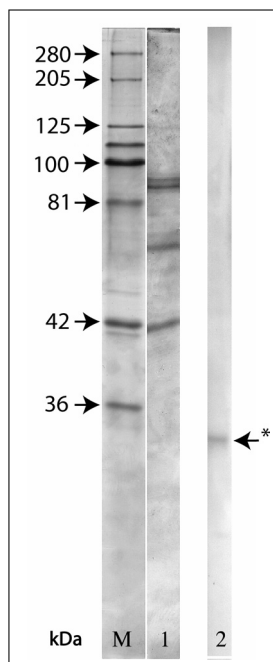


Abbildung 3.28: Immunblotanalyse zum Nachweis der CapZ β_2 -Untereinheit in C₂C₁₂-Zellkernen (M) Marker; (1) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von isolierten Zellkernen; (2) Immunblotanalyse. Der Immunblot wurde mit dem Peptidantikörper CapZ β_2 und entsprechendem Zweitantikörper inkubiert und mit NBT/BCIP entwickelt. Der mit * markierte Pfeil zeigt auf eine einzelne Bande im Molekularmassenbereich von ca. 32 kDa.

3.3.7 Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ, CapZ β_2 und Actin in Kernen aus Glattmuskel- und C₂C₁₂-Zellen

Zur Feinlokalisierung von CapZ bzw. der CapZ β_2 -Untereinheit in Nuklei wurden aus C₂C₁₂-Zellen und isolierten Glattmuskelzellen Zellkerne präpariert und nach Fixierung mit PFA

und Methanol mit affinitätsgereinigtem CapZ-Antikörper, dem CapZ β_2 -Antiserum und den entsprechenden Zweitantikörpern inkubiert (Abbildung 3.29).

Zur Kontrolle der strukturellen Integrität der isolierten Zellkerne wurden Phasenkontrast-aufnahmen durchgeführt (Abbildung 3.29 A). Außer amorphen Strukturen im Kerninnern lassen sich optisch dichte, punktförmige Bereiche beobachten (Pfeile), die mit der Kernmembran assoziiert zu sein scheinen.

Nach der Inkubation mit dem CapZ β_2 -Antiserum und entsprechendem Zweitantikörper läßt sich im fluoreszenzmikroskopischen Bild eine punktierte Färbung in Teilen der Peripherie der Kernmembran erkennen (Abbildung 3.29 B, Pfeile). Die Abstände der einzelnen fluoreszierenden Bereiche zueinander sind annähernd gleich. Innerhalb des Kerns ist, neben der Hintergrundfluoreszenz, nur eine schwache, ebenfalls punktierte Färbung zu erkennen, welche von Strukturen ober- und unterhalb der Fokusebene stammt.

Bei der immunocytochemischen Färbung von CapZ in Zellkernen aus C₂C₁₂- und isolierten Glattmuskelzellen werden ausschließlich membranständige Bereiche gefärbt (Abbildung 3.29 C und E, Pfeile). Ein ähnliches Muster ist auch nach Inkubation der Zellkerne mit dem CapZ β_2 -Antiserum und entsprechendem Zweitantikörper zu erkennen. Auch hier erscheint in der Medialebene eine spezifische, distinkte und punktierte Färbung im Bereich der Kernmembran (Abbildung 3.29 D und F, Pfeile).

Zur Lokalisierung von Actin in C₂C₁₂-Zellkernen wurde der monoklonale 2G2-anti-Actin-Antikörper eingesetzt. Dieser erkennt spezifische Actinkonformationen, die ausschließlich in Zellkernen präsent sind. Durch Koloalisationsaufnahmen sollte untersucht werden, ob das von diesem Antikörper detektierte Actin zusammen mit CapZ am Aufbau von Strukturen innerhalb des Nukleus' beteiligt ist (Abbildung 3.30).

Actin ist in diffusen Strukturen innerhalb des Zellkerns (Abbildung 3.30 A, B und C lange Pfeile) und in punkt- bzw. stabförmigen Strukturen in der Peripherie der Kernmembran lokalisiert (Abbildung A und B, kurze Pfeile). Die dreidimensionale Rekonstruktion der Färbung mit dem 2G2-Antikörper zeigt, dass Actin in der Kernperipherie in örtlich begrenzten, punktförmigen Arealen lokalisiert ist (Abbildung 3.30 B). In der Gesamtansicht des Kerns nach der Detektion der CapZ β_2 -Untereinheit erscheint ein ähnliches Bild der Kernmembran (Abbildung 3.30 D): Die punktiert erscheinenden Bereiche der Membran liegen jedoch nicht gleichmäßig über die Membranfläche verteilt vor, sondern konzentrieren sich in einem bandförmigen Areal, welches den Kern einmal umwickelt (Abbildung 3.30 D, Pfeile, linker Rand). In der Aufsicht sind nur wenige fluoreszierende Strukturen vorhanden.

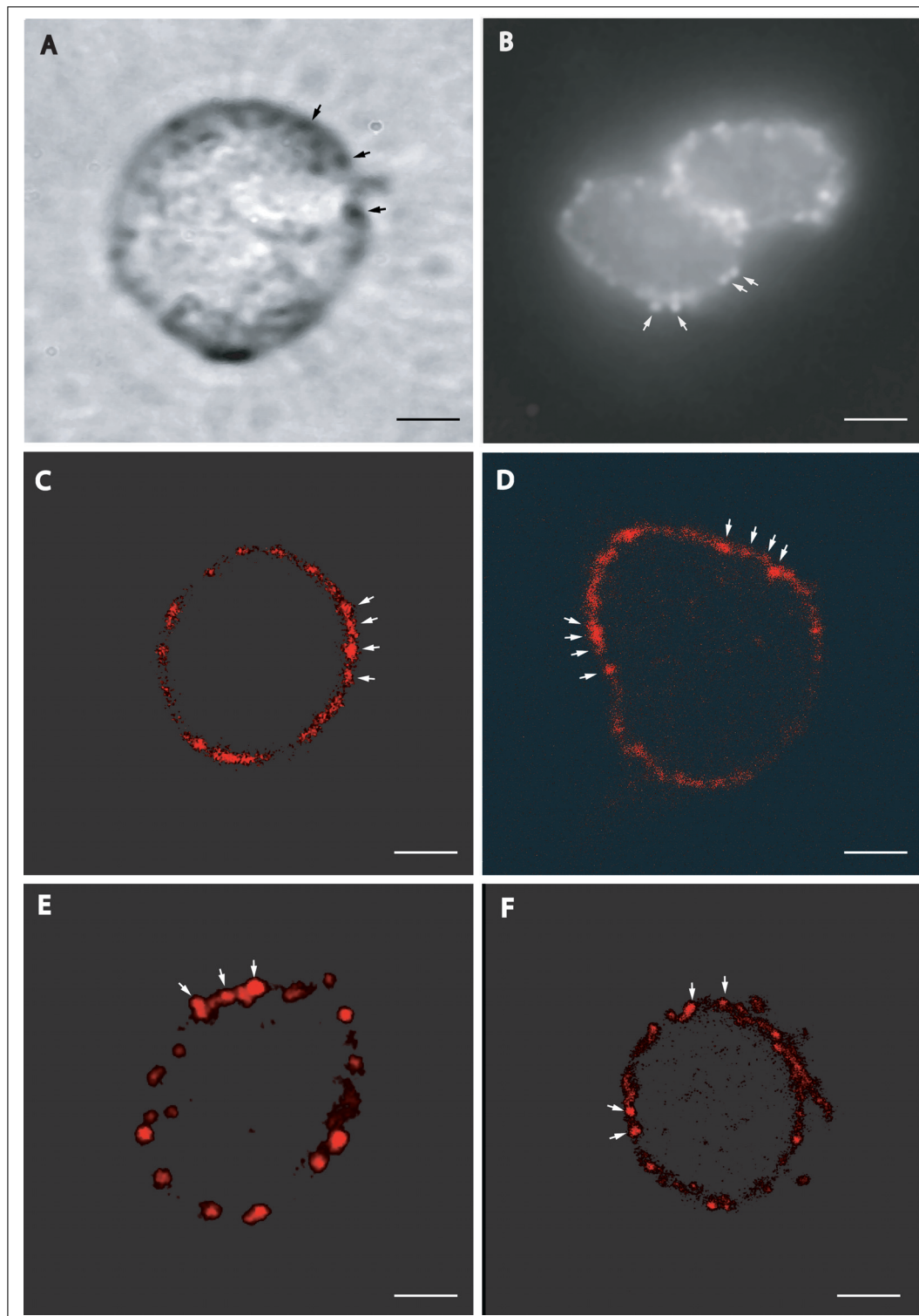


Abbildung 3.29: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ und CapZ β_2 in Kernen aus Glattmuskel- und C $_2$ C $_12$ -Zellen.

Zu Abbildung 3.29: (A) Isolierte C $_2$ C $_12$ -Zellkerne zeigen im Phasenkontrast neben amorphen Strukturen im Innern einzelne, optisch dichte Bereiche, die mit der Membran assoziiert zu sein scheinen (Pfeile). Die CapZ β_2 -Untereinheit lässt sich in der Medialebene von C $_2$ C $_12$ -Zellkernen fluoreszenzmikroskopisch (B) und im cLSM (D) in punktierten membranständigen Strukturen in der Membranperipherie nachwei-

3 Ergebnisse

sen. Das gleiche Lokalisationsmuster erscheint auch in Kernen von Glattmuskelzellen (F). Die Inkubation mit dem affinitätsgereinigten CapZ-Antikörper erzeugt das gleiche Fluoreszenzmuster in C₂C₁₂- (C) und Glattmuskelzellkernen (E). (A) Phasenkontrast-, (B) fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; (C) - (F) cLSM-Aufnahmen, Medialschnitte; Balken: 5 μ m.

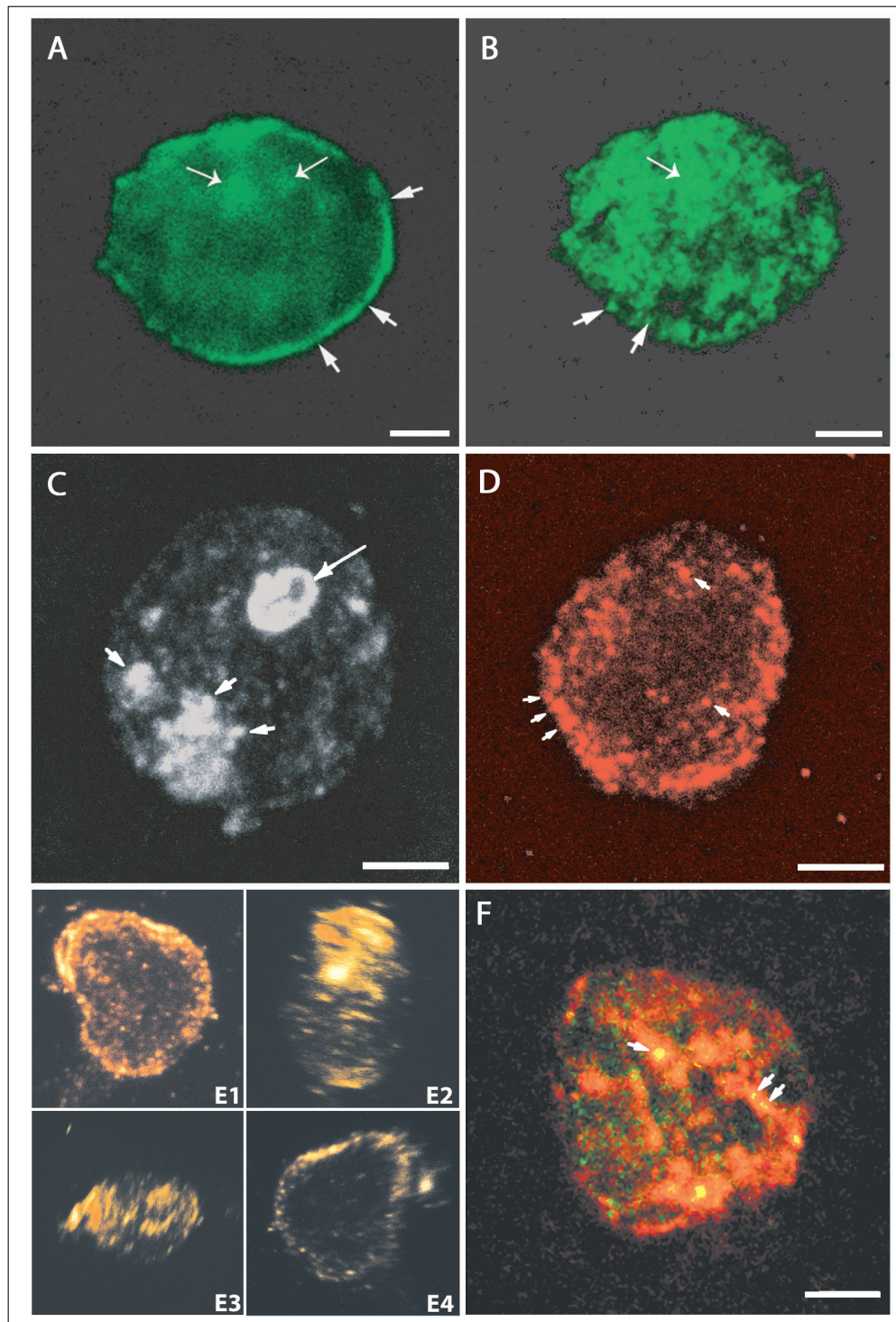


Abbildung 3.30: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CapZ β_2 und Actin in C₂C₁₂-Zellkernen.

3 Ergebnisse

Zu Abbildung 3.30: (A) Actin kann in der Nähe der Kernmembran und in diffusen Strukturen innerhalb der Medialebene des Kerns nachgewiesen werden. Eine 3D-Rekonstruktion der Kernfärbung mit 2G2-Antikörpern verdeutlicht die wolkige Strukturierung actinhaltiger Areale (B, langer Pfeil) und punktierte Bereiche in Membrannähe (kurze Pfeile). In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist eine weitere Struktur zu beobachten, bei der es sich um den Nucleolus handeln könnte (C, langer Pfeil). Eine 3D-Rekonstruktion von Kernen mit CapZ β_2 -Immunfärbung zeigt die Verteilung der β_2 -Untereinheit (D und E1) im gesamten Zellkern. Bei der Drehung des Kerns um 90° der Vertikal- (E2) oder Horizontalachse (E3) erscheinen die CapZ β_2 -haltigen, punktförmigen Strukturen in einem bandförmigen Areal liegend, während die Front- (E1) und Rückseite (E4) des Kerns weitgehend ungefärbt bleiben. Actin und CapZ β_2 können in der Kernperipherie kolokalisiert werden (F, Pfeile), während Actin im Kernlumen nicht mit CapZ kolokalisiert ist (3D-Rekonstruktion). Balken: 2 μm . cLSM-Aufnahmen.

Die dreidimensionale Rekonstruktion der durch die cLSM gewonnenen Einzelbilder verdeutlicht, dass die punktierten, CapZ β_2 -haltigen Areale hauptsächlich in einem bandförmigen Bereich vorliegen (Abbildung 3.30, E). Dabei ist E2 im Vergleich zu E1 (Frontansicht) vertikal um 90° in die Papierebene und E3 im Vergleich zu E1 horizontal um 90° in die Papierebene gedreht. E4 zeigt die Rückseite des Kerns. Da sowohl in der Frontal- als auch in der Rückansicht des Kerns nur wenige Stellen außerhalb der Randbereiche angefärbt werden, kann ausgeschlossen werden, dass die Bindung von Antikörpern aufgrund des Aufliegens des Kerns auf dem Deckgläschen sterisch behindert wurde. Wenn dem so wäre, dürfte nur eine Kernseite keine Färbungen aufweisen.

Bei der Kolokalisation von Kernactin und der CapZ β_2 -Untereinheit können beide Proteine membranständig in den gleichen Loci nachgewiesen werden (Abbildung 3.30 F, Pfeile). Die Aufsicht auf den Kern zeigt punktförmige Bereiche, in denen beide Proteine vertreten sind (Pfeile). Im Kernlumen ist Actin ohne CapZ lokalisiert (Pfeilspitzen).

Da CapZ in allen bisher untersuchten Zellen mit α -Actinin kolokalisiert vorlag, wurde versucht, α -Actinin in isolierten Zellkernen sowohl durch Immunblotanalysen als auch durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). In beiden Versuchsansätzen konnte diese Protein jedoch nicht detektiert werden. Bei der Anbindung des Zellkerns an das Cytoskelett sind daher entweder andere Proteine mit CapZ assoziiert oder der Anbindungsmechanismus funktioniert ohne Beteiligung von α -Actinin.

4 Diskussion

4.1 Rekombinantes CapZ

4.1.1 Das Expressionssystem

Zu Beginn der Arbeiten zur Herstellung der rekombinanten CapZ-Isoformen stellte sich die Frage, welches Expressionssystem am besten geeignet ist. Hohe Ausbeuten und eine einfache Möglichkeit, die Proteine schnell zu präparieren, waren von zentraler Bedeutung. Es wurde auf ein *E. coli*-Expressionssystem mit dem Stamm M15 zurückgegriffen. In Verbindung mit dem Expressionsvektor pQE60 ist es bereits erfolgreich bei der Expression der rekombinanten CapZ-Untereinheiten α_2 und β_1 aus dem Huhn eingesetzt worden (Remmert et al., 2000 [152]). Dieses System bietet die Möglichkeit, die rekombinanten Proteine mit einem Affinitäts-Anhang (affinity-tag) zu exprimieren. Bei diesem handelt es sich um sechs Histidinreste, die C-terminal an das Protein angehängt werden können. Über die Bindung dieser Histidinreste an eine Nickel-Agarose-Matrix lassen sich diese Proteine selektiv aufreinigen. Ein großer Nachteil ist der schwer einzuschätzende Einfluß des tags auf die Faltung und damit auch die Aktivität des rekombinanten Proteins. Allerdings kann das Anhängen des tags durch Klonieren von cDNA mit endogenem Stopcodon umgangen werden. Man erhält so Proteine ohne heterologen Proteinanteil.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vier cDNAs der einzelnen Untereinheiten zuerst in pQE60-Vektoren kloniert und diese in den Stamm M15 mit Repressorplasmid pREP4 transformiert. Die rekombinanten CapZ-Untereinheiten α_2 und β_2 konnten so in hohen Ausbeuten exprimiert werden. Die beiden anderen Isoformen α_1 und β_1 wurde allerdings in äußerst geringen Mengen exprimiert. Die Expressionsraten lagen an der Nachweisgrenze im Immunblot. Zur Steigerung der Expressionsraten wurden die Inkubationstemperaturen und Expressionszeiten sowie die Konzentration des Induktors variiert. Durch diese Maßnahmen konnte jedoch keine wesentliche Steigerung der Expressionsraten erzielt werden. Auch der Einsatz anderer Wachstumsmedien wie M9, ThymBroth oder TerrificBroth erwies sich als wenig hilfreich.

Die effiziente Produktion von heterologen Proteinen in *E. coli* ist häufig durch das Auftreten von bestimmten seltenen tRNAs limitiert, die allerdings in den Organismen, aus denen die zu exprimierenden Gene stammen, reichlich vorhanden sind. Bei der Expression

von heterologen Proteinen in großem Maßstab kann die gesamte Menge an vorhandenen seltenen tRNAs in der Bakterienzelle aufgebraucht werden, was zum Abbruch der Translation führt. Daher wurden Bakterienstämme entwickelt, die zusätzliche Kopien von Genen enthalten, welche für diejenigen seltenen tRNAs codieren, die in den meisten Fällen für die limitierte Translation verantwortlich sind. Durch die nun erhöhte Verfügbarkeit dieser tRNAs können viele heterologe rekombinante Gene in *E. coli* in großem Maßstab exprimiert werden.

Nach Analyse der *codon usage* von cDNAs der CapZ α_1 - und β_1 -Untereinheit stellte sich heraus, dass Codons in diesen Genen, die in nur sehr geringem Maße in *E. coli* verwendet werden, der Grund für die schlechten Expressionsraten im System M15[pREP4]pQE60 waren. Nach Umklonierung der cDNAs in den Expressionsvektor pET-3d und Transformation in den Expressionsstamm BL21(DE3) CodonPlus RIPL, der Zusatzkopien der tRNA-Gene argU, ileY, proL und leuW enthielt, zeigte sich eine wesentliche Steigerung der Expressionsraten.

In beiden Systemen wurden die exprimierten Proteine in *inclusion bodies* abgelagert. Untersuchungen zur Technik der rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* hatten ergeben, dass die Bildung von Einschlusskörpern sehr häufig auftritt (Marston, 1986 [112], Rudolph & Lilie, 1996 [155]; Clark, 1998 [35]; Misawa & Kumagai, 1999 [119] und Tsumoto et al., 2003, Übersichtsartikel [193]). Eine mögliche Ursache für die Ausbildung von *inclusion bodies* ist eine Selbstaggregation von partiell gefalteten Polypeptidketten (Speed et al., 1996 [183]), wobei weder Größe noch Hydrophobizität der exprimierten Proteine, sondern vielmehr deren Konzentration im Cytoplasma dafür ausschlaggebend sind (Gribskov & Burgess, 1983 [64]).

Die Formation von Einschlusskörpern beinhaltet neben dem Nachteil, dass die exprimierten Proteine in nicht funktionsfähigem Faltungszustand vorliegen, allerdings auch einige Vorteile (Li et al., 2003 [106]): (1) Die Expressionsraten sind oft sehr hoch (bis zu 30% des Gesamtproteins) mit bis zu 8,5 g pro Liter Expressionskultur. (2) Die Proteine sind weitgehend vor proteolytischer Degradation durch bakterielle Enzyme geschützt. (3) Die *inclusion bodies* können durch Zentrifugation, Filtration oder Größenausschlusschromatographie einfach und schnell von löslichen Proteinen der Bakterienzelle getrennt werden. (4) Falls das Expressionsprodukt für die Bakterienzelle toxisch ist, kann durch die Bildung inaktiver Einschlusskörper die Lebensfähigkeit der Zelle erhöht und so die Ausbeute an rekombinanten Proteinen gesteigert werden. (5) Die Bildung von Einschlusskörpern kann im Phasenkontrastmikroskop direkt beobachtet werden. So könnte auf eine elektrophoretische Analyse der Expression verzichtet werden.

In der Literatur ist eine Vielzahl von Möglichkeiten (z.B. der Zusatz niedermolekularer Additive oder die Kosekretion von Chaperonen (Schäffner et al., 2001 [165]); Blackwell

& Horgan, 1991 [11] etc.) beschrieben, durch welche die Bildung von *inclusion bodies* verhindert werden kann (Baneyx, 1999, Übersichtsartikel [9]). Allerdings wurden diese Strategien im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

Bei den eingesetzten Bakterienstämmen handelt es sich um weitgehend proteasedefiziente Stämme, die relativ lange Expressionszeiten und damit hohe Proteinausbeuten ermöglichen. Außerdem scheinen die exprimierten Untereinheiten nicht toxisch für die *E. coli*-Stämme zu sein, da hohe Wachstums- und Expressionsraten nach der Induktion beobachtet werden konnten.

Die rekombinanten Untereinheiten wurden separat kloniert und exprimiert. Dies sollte eine Charakterisierung der Funktion der einzelnen Untereinheiten bzw. Isoformen sowie der Rückfaltung der Heterodimere ermöglichen. Die Herstellung von funktionellen CapZ-Heterodimeren wurde ebenfalls von Soeno et al. durchgeführt (Soeno et al., 1998 [182]). Allerdings klonierte diese Gruppe die cDNA einer α - und eine β -Untereinheit zusammen in einen pET-3d-Vektor und exprimierten beide simultan. Das Expressionsprodukt war löslich und konnte durch mehrere Reinigungsschritte als aktives Heterodimer isoliert werden. Remmert klonierte im Jahre 1999 je eine α_2 - und β_1 -Untereinheit separat in pQE60, exprimierte beide einzeln, reinigte sie aus den *inclusion bodies* auf und renaturierte sie simultan zu einem funktionellen Heterodimer [150]. Außerdem konnte sie die β -Untereinheit separat rückfalten.

4.1.2 Die Renaturierungsstrategie

Wie erwähnt liegen exprimierte Proteine, die in *inclusion bodies* abgelagert werden, in nicht aktiver Konformation vor. Zur Charakterisierung dieser Proteine müssen sie in ihren nativen Zustand überführt werden. Für die Renaturierung von denaturierten Proteinen gibt es (noch) keine allgemein gültigen Vorschriften. Für jedes denaturierte Protein muss eine eigene Rückfaltungsstrategie entwickelt werden. Die in der Literatur aufgezeigten Verfahren beschreiben in der Regel nur die Renaturierung eines bestimmten Proteins und sind nicht universell anwendbar. Allerdings scheinen bestimmte Strategien auf die Renaturierung strukturell ähnliche Proteine übertragbar zu sein.

Generell wird für die Rückfaltung kleinerer Moleküle durch rasches Verdünnen *in vitro* folgendes Reaktionsschema angenommen (Dobson et al., 1994 [42]): (1) Wird das denaturierende Agens sehr schnell entfernt, so führt dies innerhalb weniger Millisekunden zum Kollaps der Polypeptidkette in eine kompakte Form. Dies geschieht hauptsächlich durch das Abschirmen hydrophober Reste vom wässrigen Medium, wobei sich Sekundärstrukturen ausbilden. (2) Sekundärstrukturen, die miteinander wechselwirken, bringen Tertiärstrukturen hervor. Das Protein kann dabei verschiedene Intermediärzustände

durchlaufen, wobei die energetisch günstigeren Konformationen erhalten bleiben. Diese Vorgänge laufen im Bereich von Sekunden bis Minuten ab. (3) Der langsamste Schritt bei der *in vitro*-Renaturierung ist die letzte Überführung in die native Form. Dabei lagern sich einzelne Proteindomänen oder Monomere zusammen. *In vivo* sind an der Faltung einzelner Proteine oft eine große Anzahl weiterer Proteine beteiligt, die ATP-abhängig bei der Faltung helfen oder falsch gefaltete Proteine partiell entfalten und rückfalten. Diese Proteine werden allgemein als Chaperone bezeichnet.

Die in den *inclusion bodies* vorliegenden, fehlgefalteten Proteine werden zunächst mit stark chaotrophen Reagenzien wie Harnstoff, Guanidinisothiocyanat oder Guanidinhydrochlorid solubilisiert. Zur Renaturierung muss das Chaotroph entfernt werden, was durch unterschiedliche Methoden erfolgen kann. Die gebräuchlichsten sind das rasche Verdünnen und eine anschließende Inkubation in einem geeigneten Puffer oder die (schrittweise) Dialyse gegen diesen, sowie verschiedene Chromatographietypen (Rudolph & Lilie, 1996 [155]). Remmert nutzte im Jahr 1999 die Renaturierung durch rasches Verdünnen und Inkubation in Rückfaltungspuffer. Mit dieser Methode konnte die CapZ- β_1 -Untereinheit sowie das funktionell intakte $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer renaturiert werden. Allerdings gelang es nicht, die α -Untereinheiten zu renaturieren. Außerdem war diese Methode relativ arbeits- und zeitintensiv. So wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Renaturierung durch Dialyse entwickelt, bei der größere Mengen an Heterodimeren in einem Schritt rückgefaltet werden konnten. Ebenso war es möglich, auch die beiden α -Untereinheiten einzeln zu renaturieren.

Wie bereits erwähnt, gibt es keine allgemeingültigen Vorschriften zur Rückfaltung von denaturierten Proteinen. Alle möglichen faltungsfördernden bzw. Intermediärzustandstabilisierenden Faktoren müssen somit auf ihre Wirkung bei der Renaturierung getestet werden. Um den Arbeitsaufwand möglichst gering, die Anzahl der Faktoren aber so hoch wie möglich zu halten, wurden die einzelnen Komponenten nach dem Modell des *fractional factorial resolution III folding screens* zusammengestellt (nach Box et al., 1978 [14]). Dieser Screen ermöglicht den simultanen Test von Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke, polare Additive, Chaotropie usw..

Bei der Betrachtung der Ergebnisse für die Rückfaltung *in vitro* stellt sich die Frage, wie heterodimere Capping-Proteine *in vivo* in ihre funktionelle Form überführt werden. Wie erwähnt, wird die Faltung von Proteinen häufig durch ATP-abhängige Chaperone vermittelt. Die Koexpression von eukaryotischen rekombinanten Proteinen und bakteriellen Chaperonen kann zu einer verbesserten Löslichkeit der rekombinanten Proteine führen (z.B. Schöffner et al., 2001 [165]). Die Proteine werden nicht mehr in *inclusion bodies*, sondern löslich im Cytoplasma oder Periplasma angereichert und sind funktionell intakt. Denkbar ist, dass bei der Isolation der rekombinanten CapZ-Untereinheiten ein geringer Anteil an

bakteriellen Chaperonen als Verunreinigung mitisoliert wurde. Die zur Expression eingesetzten *E. coli*-Stämme exprimieren das bakterielle Chaperon GroEL und sein Koprotein GroES. GroEL ist ein Tetramer aus identischen Untereinheiten mit Molekularmassen von je 57 kDa. GroES ist ein Heptamer aus identischen 10,5 kDa schweren Untereinheiten, die eine Ringstruktur bilden, welche in zwei aufeinander gestapelten Ringen arrangiert vorliegen. Jede GroEL-Untereinheit besitzt eine Mg^{2+} -abhängige ATPase-Aktivität (Diamant et al., 1995 [40]). GroEL bildet zusammen mit GroES und ATP extrem stabile Komplexe mit fehlgefalteten Proteinen. Durch Konformationsänderungen, die durch ATP-Hydrolyse induziert wurden, liegt das fehlgefaltete Protein eingekapselt im GroEL-GroES-Komplex vor und wird nach „Zerren“ an seinen äußeren hydrophoben Bereichen wieder entlassen. Dies kann zur Ausbildung einer nativen Konformation führen, allerdings werden fehlgefaltete Proteine meist in mehreren Bindungszyklen rückgefaltet (z.B. Fenton et al., 1994 [53], Tagushi & Yoshida, 1995 [188], Ranson et al., 1997 [149]).

Untersuchungen zur Rückfaltung heterodimerer Proteine *in vitro* ergaben eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der Untereinheiten bei der Faltung. So führt die Faltung einzelner Untereinheiten der bakteriellen Luciferase zu Proteinen, die nicht in der Lage sind zu dimerisieren und ein funktionell intaktes Protein zu bilden, wobei die simultane Rückfaltung zu einem aktiven $\alpha\beta$ -Heterodimer führt (Ziegler et al., 1992 [215]; Baldwin et al., 1992 [8]).

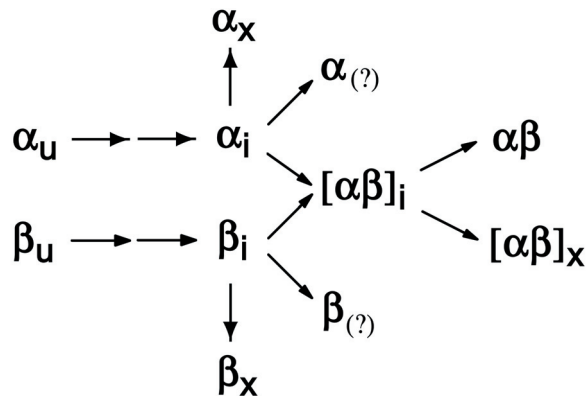


Abbildung 4.1: Modell der Reanturierung von rekombinanten CapZ-Untereinheiten und des Heterodimers. α_u und β_u stellen ungefaltete Untereinheiten dar, α_i und β_i repräsentieren partiell gefaltete Intermediate, die z.T. in der Lage sind zu interagieren, z.T. aber auch aggregieren können (α_x , β_x). Beide können $\alpha\beta$ -Intermediate bilden ($[\alpha\beta]_i$), welche sich weiter zum aktiven Heterodimer ($\alpha\beta$) oder zu inaktiven Dimeren ($[\alpha\beta]_x$) falten. Inwieweit bakterielle Chaperone an diesem Faltungsschema beteiligt sind und ob die separat renaturierten Untereinheiten eine native Konformation ($\alpha(?)$ und $\beta(?)$) einnehmen, kann aus den gewonnenen Daten nicht abgeleitet werden.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch in dieser Arbeit gemacht werden. So konnten ak-

tive Heterodimere rückgefaltet werden und auch die separate Rückfaltung einzelner Untereinheiten war erfolgreich. Obwohl diese separaten Untereinheiten Nukleations- und Cappingaktivität zeigen, kann aus den Daten nicht abgeleitet werden, ob sie die gleiche Konformation wie im renaturierten Heterodimer einnehmen. Die Zugabe von renaturierter β - zu renaturierter α -Untereinheit führte nur bedingt zu einem aktiven Heterodimer. Die Faltung der Untereinheiten und Heterodimere *in vitro* verläuft vermutlich ähnlich wie in Abbildung 4.1 dargestellt ab, wobei der β -Untereinheit die Rolle des Chaperons für die α -Untereinheit zukommen könnte.

Nach zweidimensionalen Gelelektrophorese von Gesamtproteinen verschiedener Gewebe zeigt sich häufig ein distinktes Mengenverhältnis von verschiedenen CapZ-Isoformen zueinander (z.B. Hart et al., 1999 [65]; Schafer et al., 1994 [160]; Hart et al., 1997 [66]). So sind im Skelettmuskel die $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimere vorherrschend, während man aus Erythrozyten ausschließlich $\alpha_1\beta_2$ -Heterodimere (ECapZ) isolieren konnte (Kuhlman & Fowler, 1997 [99]). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rückfaltungsexperimente durchgeführt, in denen bei einer simultanen Rückfaltung nach Remmert [150] der β -Untereinheit zwei α -Isoformen als potentielle Rückfaltungspartner angeboten wurden. Nach dieser Methode können α -Untereinheiten nicht oder in nur geringem Maße separat renaturieren, nur rückgefaltete Heterodimere bleiben in Lösung. Es konnte gezeigt werden, dass die β_1 -Untereinheit *in vitro* bevorzugt mit der α_2 -Untereinheit und die β_2 -Untereinheit bevorzugt mit der α_1 -Untereinheit renaturiert. Die Information, welche Isoformen der einzelnen Untereinheiten miteinander renaturieren, ist wohl u.a. in den Aminosäuresequenzen der Proteine festgelegt.

In vivo werden die Monomere von Proteinen mit mehreren Untereinheiten vermutlich erst einzeln mit Hilfe von Chaperonen separat rückgefaltet, bevor sie sich zu Di-, Oligo- oder Polymeren zusammenlagern. Dazu werden kotranslational die hydrophoben Reste der entstehenden Peptidkette abgeschirmt, um eine Aggregation zu verhindern. Danach, so die Annahme, falten sich einzelne Domänen bereits, während der Rest der Polypeptidkette noch translatiert wird (Hartl, 1996 [67]). Im Falle von CapZ kann allerdings eine partielle Faltung der einzelnen Untereinheiten und zusätzlich eine anschließende Überführung in ein aktives Heterodimer durch gegenseitige Beeinflussung der Untereinheiten angenommen werden. So wird gewährleistet, dass nur vollständige und aktive Heteromere im Cytoplasma vorhanden sind und eventuell auch, dass die Untereinheiten der „richtigen“ Isoformen zueinander finden. So würden die CapZ-Moleküle vor ihrem Einbau in zelluläre Strukturen bereits in der erforderlichen Isoformzusammensetzung vorliegen. Der Einbau erfolgte dann durch isoformspezifische Interaktion mit Zielproteinen.

4.1.3 Rekombinantes und natives CapZ

CapZ ist ein heterodimeres Capping-Protein, das die Plusenden von Actinfilamenten besetzt und außerdem nukleationsfördernde Eigenschaften besitzt (Casella et al. 1986 [28]). Es wurde erstmals aus der Brustmuskulatur des Huhns gewonnen, daher ist anzunehmen, dass es sich um ein $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer handelte. Ein Vergleich zwischen dem in dieser Arbeit hergestellten $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer und dem von Casella et al. isolierten ergab ähnliche Eigenschaften beider Proteine in Hinblick auf ihre Capping- und Nukleationsaktivität.

Die separate Expression der rekombinanten CapZ-Untereinheiten bietet klare Vorteile. So sind die Proteinausbeuten mit 35 - 90 mg pro Liter Expressionskultur relativ hoch. Nach simultaner Rückfaltung der Heterodimere nach der Dialysemethode lagen die Endausbeuten an funktionellem Protein noch bei ca. 20 - 40 mg pro Liter Kultur. Im Vergleich zur Präparation von CapZ aus Geweben, die sich über mindestens 5 Tage erstreckt, sehr arbeitsintensiv ist und nur ca. 10 mg Protein pro 500 g Muskulatur liefert, können durch die Expression, Aufreinigung und Rückfaltung rekombinanter Proteine in relativ kurzer Zeit große Mengen an aktiven Proteinen gewonnen werden. Ein weiterer Vorteil der rekombinanten Proteinexpression ist, dass die Untereinheiten separat gewonnen und rückgefaltet werden können. So war es möglich, die biochemischen Eigenschaften jeder Untereinheit einzeln zu untersuchen. Außerdem konnten Heterodimere mit verschiedener Isoformzusammenstellung erzeugt werden. Mit nativen Proteinen wäre dies nicht oder nur mit äußerst großem Aufwand und sehr geringen Ausbeuten möglich gewesen.

Die Expression und Aufreinigung aller rekombinanten Proteine kann innerhalb von 4 Tagen bewerkstelligt werden und erfordert einen relativ geringen Arbeitseinsatz. Die Renaturierung und weitere Aufreinigung von Heterodimeren bzw. separaten Untereinheiten dauert jeweils ca. einen Tag. Die transformierten Bakterien sind, als Glycerinkulturen bei -80°C gelagert, zudem jederzeit verfügbar.

Die Sequenzanalysen von cDNAs der α_1 - bzw. β_1 -Untereinheit ergaben einige Abweichungen zu publizierten cDNA-Sequenzen von CapZs anderer Mammalia, die aber im Rahmen der bestehenden Differenzen zwischen verschiedenen Spezies liegen. Da bisher keine Sequenzdaten für die in dieser Arbeit klonierten CapZ-Untereinheiten aus *sus scrofa* vorliegen, können keine endgültigen Aussagen über die Richtigkeit der ermittelten Sequenzen gemacht werden. Allerdings wurden die cDNAs der α_1 - und β_1 -Untereinheit mehrfach über verschiedene, voneinander unabhängige RT-PCR-Ansätze erzeugt und nachfolgend sequenziert, wobei immer die gleichen cDNA-Sequenzen ermittelt wurden. So kann eine Fehlinkorporation von Nukleotiden durch die DNA-Polymerase ausgeschlossen werden. Zum einen hatte die verwendete Polymerase $3' \rightarrow 5'$ -Korrekturlesefähigkeit, zum anderen sind Nukleotid-Fehlincorporationen bei verschiedenen RT-PCR-Ansätzen an jeweils im-

mer der gleichen Stelle extrem unwahrscheinlich. Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei den Unterschieden in den Aminosäuresequenzen um Mutationen handelt, die sich im Laufe der Evolution ereigneten und die keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivität der Proteine haben.

4.1.4 Die α -Untereinheit

Die rCapZ-Untereinheiten α_1 und α_2 konnten erstmals separat rückgefaltet werden und einzeln auf ihre Capping- und Nukleationsaktivität untersucht werden. Sie binden sowohl an monomeres als auch an polymeres Actin und zeigen schwache Nukleations- und Cappingaktivität. Die F-Actinbindungsstelle konnte durch Wear et al. 2003 [204] bzw. Kim et al. 2004 [91] identifiziert werden und umfasst die C-terminalen 28 Aminosäuren. Im Heterodimer scheint die α -Untereinheit für die Capping-Aktivität eine größere Rolle zu spielen als die β -Untereinheit. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass die α -Untereinheiten im Vergleich zu den β -Untereinheiten stärkere Capping- und Nukleationsaktivität besitzen.

Man geht davon aus, dass die C-terminalen Enden der α -Untereinheiten zwei Actin-Untereinheiten am Plusende des F-Actin binden und dieses so stabilisieren. Allerdings scheint diese Bindung für eine umfangreiche Stabilisierung des F-Actins nicht auszureichen. Bei der Actinpolymerisation ist die initiale Ausbildung von Trimeren der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Nukleationsfördernde Proteine beschleunigen diese Trimerbildung, indem sie mindestens zwei G-Actine so zusammenbringen, dass diese in eine für die Polymerisation günstige Orientierung zueinander gebracht werden. Wie in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten fluorometrischen Messungen gezeigt werden konnte, besitzen die rCapZ α -Untereinheiten nukleationsfördernde Eigenschaften. Daher müssten deren C-Termini der Theorie zufolge mindestens zwei G-Actine binden. Die durchgeführten Quervernetzungsreaktionen von separat renaturierten α -Untereinheiten mit G-Actin zeigten keine eindeutigen Resultate. Vermutlich liegt der C-Terminus der α -Untereinheit wie in der Röntgenstruktur überwiegend auf der Oberfläche des Moleküls auf, wobei diese Bindung nicht allzu stark ausgeprägt ist. Durch thermische Stöße bzw. Eigenbewegung richtet er sich vermutlich in fluktuierenden Abständen für kurze Zeit auf und kann dann an G-Actin binden. In Crosslinking-Versuchen könnte EDC den C-Terminus allerdings kovalent mit der Oberfläche des Proteins vernetzt haben, wobei dieser in seiner Position fixiert wurde und damit nicht mehr in der Lage war, mit G-Actin zu interagieren.

Die röntgenkristallographische Struktur, die von Yamashita et al. 2003 veröffentlicht wurde [213], zeigt den C-Terminus der α -Untereinheit (Arg259 - Ala286, „ α -Tentakel“) in einer auf der Proteinoberfläche aufliegenden Position (Abbildung 4.2). In dieser Position scheint der Tentakel jedoch nicht in der Lage zu sein, an Actin zu binden. Die ermittelte

Struktur gilt vermutlich nur für das kristallisierte CapZ, nicht jedoch für CapZ in Lösung.

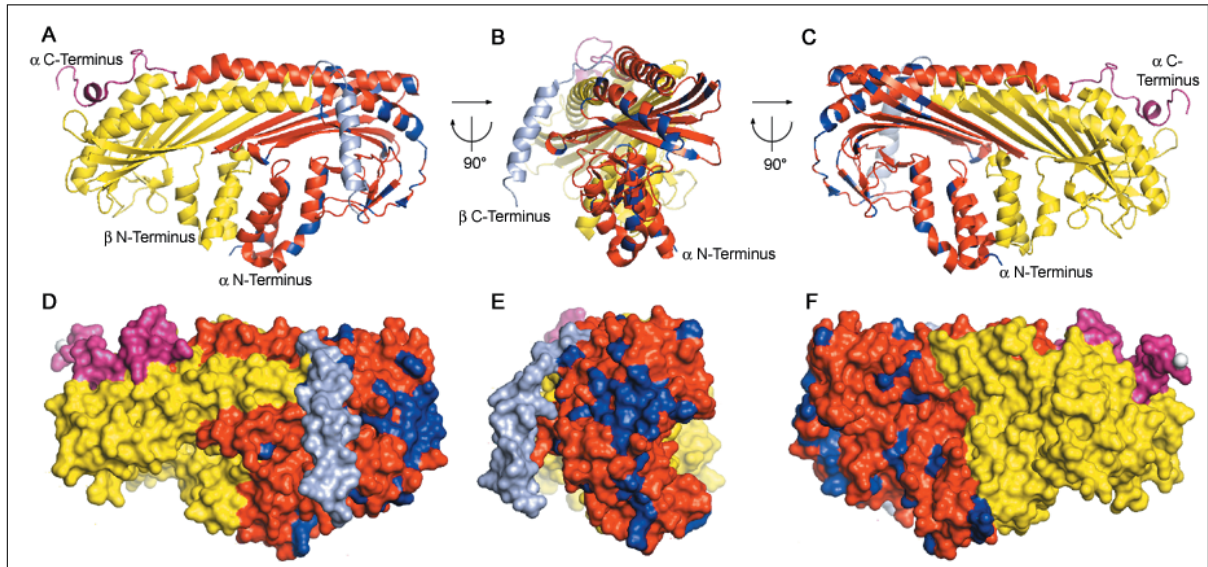


Abbildung 4.2: Sequenzunterschiede der CapZ-Isoformen. Auf Grundlage der gewonnen Sequenzdaten wurden die Bereiche, in denen sich die Isoformen unterscheiden, blau angefärbt. (A) bis (C) in „ribbon“- , (D) bis (F) „spacefill“-Darstellung. In (B) und (D) wurde die Struktur um 90° in die Papierebene gedreht. Die Aminosäureunterschiede (dunkelblau) der α -Untereinheiten (rot) liegen hauptsächlich am äußeren Seitenrand des Moleküls, die der β -Untereinheiten (gelb) beschränken sich auf den C-terminalen Bereich (hellblau). Zur besseren Übersicht ist der α -C-Terminus in pink dargestellt. Erstellt mit PyMol und dem Koordinatensatz 1IZN.pdb.

Obwohl sich die Isoformen CapZ α_1 und α_2 deutlich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden (ca. 15% AS-Differenzen), sind die Unterschiede in ihren im Rahmen dieser Arbeit untersuchten biochemischen Aktivitäten nicht besonders stark ausgeprägt. Bei Betrachtung der Differenzen in den AS-Sequenzen fällt auf, dass der Bereich der Actinbindestelle in beiden Isoformen gleich ist (Abbildung 4.2). Die aus den cDNA-Sequenzen abgeleiteten Unterschiede liegen vielmehr seitlich am äußeren Rand der Moleküle. Der Grund für die Existenz von zwei bzw. drei CapZ α -Isoformen liegt also vermutlich nicht in unterschiedlichen Actin-Interaktionsaktivitäten, sondern wohl in der differenzierten Interaktion mit anderen Proteinen. Die α -Isoformen sind in Zellen distinkt lokalisiert und werden unterschiedlich stark exprimiert (Hart et al., 1997 [66]). So ist im Skelettmuskel beispielsweise die α_2 -Untereinheit ausschließlich in den Z-Scheiben zu finden, während die α_1 -Untereinheit in membranahen Bereichen in Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Verbindungen lokalisiert werden kann. Auch dies spricht für die o.g. Hypothese von verschiedenen Bindungspartnern. Denkbar ist allerdings auch, dass die Aktivität beider Untereinheiten unterschiedlich reguliert wird, d.h., Untereinheit 1 reagiert z.B. auf ein Signal stärker als Untereinheit 2. Die möglichen Bindestellen für saure Phospholipide wie PIP₂ wurden jedoch in der β -Untereinheit lokalisiert, allerdings in der Nähe der actinbindenden Region der α -Untereinheit (Yamashita et al., 2003 [213]). Für eine Regulation durch PIP₂ muss

der α -Tentakel aber frei und flexibel in Lösung vorliegen; in der röntgenkristallographisch ermittelten Struktur erscheint eine Beeinflussung des Tentakels durch Phospholipide nicht möglich. Nach dem Modell der flexiblen Tentakel nach Wear & Cooper erscheint jedoch eine Regulation der α -Untereinheit durch Bindung von PIP₂ an die β -Untereinheit aus strukturellen Aspekten möglich. Abbildung 4.3 zeigt ein hypothetisches Modell zur Orientierung des α -Tentakels *in vivo* und seiner Bindung an F-Actin (Erklärung s. Abbildungstext).

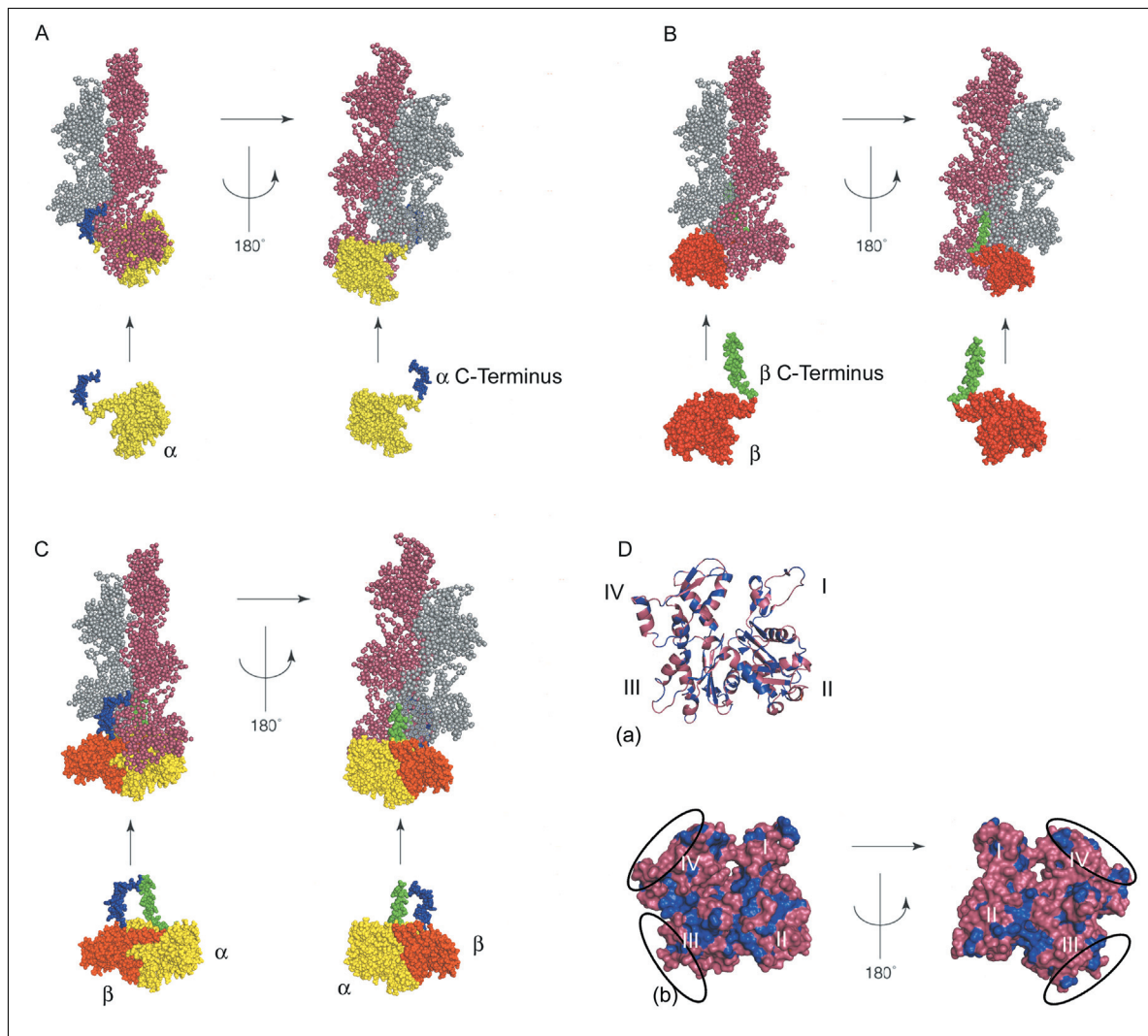


Abbildung 4.3: Hypothetisches Modell der Bindungsmechanismen von CapZ an F-Actin.

Zu Abbildung 4.3: Dieses spekulative Modell zeigt, wie die einzelnen CapZ-Untereinheiten an F-Actin binden könnten. Die einzelnen Aminosäuren des Filaments sind als Kugeln dargestellt (nach Mendelson & Morris, 1997 [116] und Holmes et al., 1990 [76]). Ein Actin-Filament mit fünf Untereinheiten ist in Frontansicht und durch Drehung um 180° in Rückansicht zu sehen, wobei jedes Protofilament unterschiedlich coloriert wurde (grau und rosa). Die röntgenkristallographische Struktur von CapZ ist in „spacefill“-Ansicht mit ähnlicher Skalierung und in der gleichen relativen Orientierung wie das Actin-

Filament dargestellt. Der C-Terminus (blau) der α -Untereinheit (gelb) und der C-Terminus (grün) der β -Untereinheit (rot) wurden manuell in die dargestellte Position aufgerichtet, um die mögliche Flexibilität beider C-Termini anzudeuten. Die CapZ-Untereinheiten und das gesamte CapZ-Molekül wurden manuell an das Actinfilament angelagert. Der C-Terminus der α -Untereinheit (A) bindet in der Furche zwischen den beiden Protofilamenten, indem er mit zwei Actinmolekülen über hydrophobe Wechselwirkungen interagiert. Der C-Terminus der β -Untereinheit bindet auf ähnliche Weise auf der anderen Seite des Filaments (B), indem er mit den gleichen Actinmolekülen interagiert. Das heterodimere CapZ würde nach diesem Modell wie in (C) dargestellt interagieren, indem die C-Termini auf verschiedenen Seiten des Filaments die gleichen Actinmoleküle binden, jeweils eines pro Protofilament. In (D) sind die hydrophoben Aminosäuren eines Actinmonomers in blau hervorgehoben. Die Röntgenstruktur (Kabsch, 1990 [86]) in „cartoon“-Ansicht (a) und mit generierter Oberfläche (b) zeigt größere hydrophobe Bereiche des Actinmoleküls. Mögliche Bindestellen für CapZ sind oval markiert. (B) nach Wear & Cooper, 2004 [205]. Die Abbildung wurde unter Verwendung von PyMol und den Koordinatensätzen 1IZN.pdb, 1ATN.pdb und 1ALM.pdb erstellt.

4.1.5 Die β -Untereinheit

Die rCapZ- β_1 -Untereinheit konnte erstmals von Remmert im Jahre 1999 separat rückgefaltet und teilweise biochemisch charakterisiert werden [150]. In dieser Arbeit gelang es, auch die rCapZ- β_2 -Untereinheit separat zu renaturieren. Ähnlich wie die α -Untereinheiten binden beide sowohl an G- als auch an F-Actin und zeigen ebenfalls geringe Nukleations- und Capping-Aktivität. Die F-Actinbindestelle liegt im C-Terminus (ab AS 247) (Barron-Casella et al., 1995 [10]; Schafer et al., 1996 [161]) und beinhaltet die stark konservierten hydrophoben Reste einer amphipatischen α -Helix. Die β -Isoformen zeigen bis zur Aminosäure 246 identische Sequenzen und unterscheiden sich exklusive in ihren C-terminalen Erweiterungen, welche die Bindung an Actin vermitteln (Abbildung 4.2). Die Aminosäurereste der hydrophoben Seite sind allerdings entweder weitgehend konserviert oder ähnlich substituiert. Unterschiedliche Actinbindungsaktivitäten erscheinen zwar aufgrund der Sequenzunterschiede theoretisch möglich, jedoch konnten in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine stark ausgeprägten Unterschiede in diesen Aktivitäten beobachtet werden. Untersuchungen zur Interaktion mit verschiedenen Actinen aus dem Glatt- und Skelettmuskel bzw. Nichtmuskelactinen ergaben ebenfalls annähernd identische Bindungsaktivitäten beider CapZ- β -Isoformen bzw. nativer heterodimerer CapZ-Isoformen (diese Arbeit; Schafer et al., 1996 [161]). Auch die Regulation durch PIP₂ beeinflusst beide Isoformen gleichermaßen. Wird jedoch eine Isoform überexprimiert, so dass sie die andere Isoform verdrängt, kann sie die Funktion der verdrängten Isoform nicht

vollständig übernehmen (Hart & Cooper, 1999 [65]). Die Organismen (in diesem Fall *gal-
lus gallus*) starben nach wenigen Tagen. Dies alles führt zu der Vermutung, dass nur die
Interaktion mit anderen Proteinen für die Existenz der β -Isoformen in Frage kommt.

Ebenso wie die separaten α -Untereinheiten ist die β -Untereinheit alleine nicht in der Lage,
die Plusenden von F-Actin stark zu stabilisieren. Vermutlich bindet das β -Tentakel mit
relativ niedriger Affinität zwei nebeneinander liegende Actinmoleküle. Auch die Beobach-
tung, dass diese Untereinheiten nukleationsfördernde Eigenschaften besitzen, bekräftigt
aus den o.g. Gründen die Hypothese, dass sie mit mindestens zwei Actinmolekülen in
Wechselwirkung treten. Allerdings konnten in dieser Arbeit durchgeführten die EDC-
Quervernetzungsexperimente die Bindung von zwei Actinen pro β -Untereinheit nicht be-
stätigen. Dieser Befund kann allerdings mit einer möglicherweise sehr schwachen Interak-
tion des zweiten Actinmoleküls mit dem β -Tentakel erklärt werden.

Die röntgenkristallographisch ermittelte Struktur der β_1 -Untereinheit zeigt den C-Termi-
nus in einer „eingeklappten“ Position, in der die Bindung an F-Actin nur schwer möglich
erscheint (Abbildung 4.2). Da sowohl der α - als auch der β -C-Terminus an der Interakti-
on mit F-Actin beteiligt sind, wird angenommen, dass sich der β -C-Terminus in Lösung
als flexibler „Tentakel“ vom Proteinkörper in die entgegengesetzte Richtung orientiert, da
sonst eine simultane Bindung beider Tentakel an das Actinfilament sterisch nicht möglich
wäre. Ob die Konformation der separat renaturierten β -Untereinheit mit der im heterodi-
meren Protein übereinstimmt, kann aus den gewonnenen Daten nicht abgeleitet werden.
Die Actinbindestelle dieser Untereinheit ist aber vermutlich frei zugänglich und kann mit
Actin interagieren. Zum vollständig aktiven Protein werden trotzdem beide Untereinhei-
ten benötigt.

Vermutlich dienen sich beide Untereinheiten *in vitro* als Chaperone, die sich gegenseitig
bei der korrekten Faltung unterstützen. Die beiden Tentakel werden so in eine Position
ausgerichtet, in der sie eine Bindung an Actin herstellen können (Abbildung 4.3, Erläu-
terungen s. Bildtext).

4.2 CapZ und seine Interaktionspartner

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von CapZ-interagierenden Proteinen ent-
deckt, deren Bindung an CapZ entweder regulatorischen oder verankernden Charakter
hat. Als eines der ersten CapZ-interagierenden Proteine wurden neben Actin α -Actinine
aus der Skelett- und Glattmuskulatur identifiziert (Papa et al., 1999 [136]). Diese Inter-
aktion mit CapZ aus der weißen Muskulatur von Fischen konnte von dieser Gruppe mit
Dissoziationskonstanten von $1,8 \pm 0,7$ bzw. $1,6 \pm 0,2$ nachgewiesen werden. Die Bin-

dung an CapZ erfolgt über die Spektrin-ähnliche Domäne des α -Actinins, welche durch Thermolysin-Spaltung und Trennung der erzeugten Fragmente in ein 55kDa-Fragment (Spektrin-ähnlich) und ein 27 kDa-Fragment gewonnen wurde (Papa et al., 1999 [136]). Allerdings wurden keine Aussagen über die Isoformen des isolierten CapZs und deren mögliche isoformspezifische Beteiligung an diesen Interaktionen getroffen. Das von Papa et al. veröffentlichte Modell zur Organisation von Z-Scheiben der weißen Muskulatur von Fischen kann durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten hinsichtlich der CapZ- α -Actinin-Interaktion bestätigt bzw. ergänzt werden. In diesem Modell interagiert je ein CapZ mit einem α -Actinin, wobei die so entstehende Anordnung von F-Actin, α -Actinin und CapZ der 3D-Rekonstruktion von Luther (1999) entspricht (Luther, 1991 [110]).

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten deuten auf eine CapZ-Isoform-unabhängige Gm- α -Actinin-Bindung hin. So binden die Isoformen der CapZ β -Untereinheit in Quervernetzungsexperimenten vornehmlich mit einer 1:1-Stöchiometrie an Gm- α -Actinin, während die rekombinanten CapZ-Heterodimere rCapZ $\alpha_1\beta_1$ und rCapZ $\alpha_2\beta_2$ ebenfalls vornehmlich mit 1:1-Stöchiometrie binden. Eine Interaktion der separat renaturierten rCapZ α -Untereinheiten konnte durch EDC-Quervernetzung nicht gezeigt werden und findet *in vivo* vermutlich nicht statt. Diese Interaktionen konnten durch analytische Gelfiltrationsassays verifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem Pull-Down-Assays mit KJ-Extrakten aus Aceton-getrocknetem Glattmuskelpulver und an NHS-aktivierter Sepharose gekoppeltem rCapZ durchgeführt. KJ wird als chaotrophes Agens zur Isolation von Proteinen der Z-Scheibe eingesetzt (Papa et al., 1999 [136]). Allerdings war diese Methode zur Suche nach möglichen CapZ-Interaktionspartnern wegen Präzipitatbildung von Extraktproteinen nicht geeignet (Daten nicht gezeigt). Auch eine mögliche Interaktion von CapZ mit Glattmuskel-Tropomyosinen wurde durch EDC-Quervernetzungsansätze untersucht, allerdings wechselwirken diese Proteine unter den gewählten Bedingungen *in vitro* nicht (Daten nicht gezeigt).

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine Bindung der CapZ β -Untereinheit an Lipide *in vivo* stattfinden könnte (Scott et al., 2006 [168]). Die Z-Scheiben im quergestreiften Muskel sowie Organell- und Zellmembranen bestehen zu einem Großteil diesen Molekülen. Allerdings wurde eine mögliche Lipidbindung nur theoretisch aufgrund verschiedener computergestützter Analysen postuliert und bedarf noch experimenteller Bestätigung.

4.3 Funktion von CapZ *in vivo*

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl möglicher Funktionen von heterodimeren Capping-Proteinen, vor allem von CapZ *in vitro* und *in vivo* aufgeklärt worden. Der Nachweis

von CapZ in den Z-Scheiben der quergestreiften Muskulatur und der Expressionsverlauf von CapZ während der Myofibrillogenese deuten auf eine Beteiligung an der Bildung der Sarkomerstruktur hin (Schafer et al., 1997 [163]). CapZ scheint dort die Actinfilamentenden zu verankern und diese durch Blockieren der Plusenden zu stabilisieren (Littlefield & Fowler 1998 [109]; Littlefield et al., 2001 [108]; Schafer et al., 1995 [159] etc.).

In Bäckerhefe scheinen Capping-Proteine eine Rolle beim polarisierten Wachstum zu spielen und vermittelt die Bindung von Twinfilin an Actin (Kim et al., 2004 [91]; Palmgren et al., 2001 [132]). In *Drosophila* sind Capping-Proteine wichtig für Entwicklung und Morphogenesis, allerdings kann die Wirkung von *loss-of-functions*-Mutationen im Capping-Protein durch Mutationen des Profilin-Gens unterdrückt werden (Kim et al., 2004 [91]). Dies führt zu der Vermutung, dass Profilin und Capping-Protein antagonistische Funktionen beim Actin-Zusammenschluss im *Drosophila*-Muskel haben.

Capping-Proteine stellen außerdem eine bedeutende Komponente im „Dendritischen Nukleationsmodell“ dar. Dieses beschreibt die Actinpolymerisation und die Generierung von vorantreibenden Kräften am Leitsaum von Zellen (Pollard & Borisy 2003 [143]). In diesem Modell wird durch den Arp2/3-Komplex die Actin-Nukleation initiiert, die Stabilisierung der neuen Filamentenden geschieht nach einiger Zeit durch Capping-Proteine. In dieser Arbeit konnte CapZ, vor allem die CapZ β_2 -Untereinheit, im Leitsaum von C₂C₁₂-Zellen nachgewiesen werden.

Die Trichter-Hypothese („funneling hypothesis“) von Carlier & Pantaloni aus dem Jahr 1997 [25] nennt einen Grund für die zwingende Beteiligung von Capping-Proteinen an der Ausbildung des Leitsaums: Um dort eine Kraft zu erzeugen, die für den Vorrantrieb der Zellmembran ausreichend ist, müssen in ihrer Nähe möglichst kurze Actinfilamente gebildet werden. So werden die vom Arp2/3-Komplex nukleierten Filamente in stochastischer Weise gecappt, d.h. alte Filamente liegen größtenteils gecappt, neue Filamente ungecappt vor. So können letztere durch weitere Polymerisation die Membran vorrاندrücken, die Filamente bleiben kurz und es bleiben genug Actinmonomere zur weiteren Polymerisation von freien Enden in Membrannähe, ohne dass sie von älteren Filamenten inkorporiert werden. Der Fluss von polymerisierenden Actinmonomeren ist somit in Form eines mit der Öffnung nach außen gerichteten Trichters begrenzt („funneled“). Ob an diesen Prozessen ausschließlich Heterodimere mit β_2 -Untereinheit beteiligt sind, kann anhand der Lokalisation dieser Untereinheit in Myoblasten nicht beurteilt werden, erscheint aber durchaus möglich. So ist es wahrscheinlich, dass die CapZ-Isoformen an unterschiedlichen Prozesse in diesen Zellen beteiligt sind. Die β_2 -Isoform beteiligt sich danach an Mechanismen der Membrandynamik, während die β_1 -Untereinheit an der Ausbildung von Myofilamenten und deren Verknüpfung an weitere Myofilamente bzw. cytoskeletalen Strukturen involviert ist.

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse von Aktivitätsmessungen der CapZ-Isoformen

fällt auf, dass rCapZ $\alpha_1\beta_2$ -Heterodimere eine leicht stärkere Capping-Aktivitäten aufweisen als rCapZ $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimere. *In vivo* finden sich $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimere vor allem in Verbindung mit kontraktilen Systemen, welche in Hinblick auf den dynamischen Austausch ihrer Komponenten relativ stabile Strukturen bilden. Der Leitsaum von myogenen Zellen stellt jedoch ein hochdynamisches System dar, in welchem in kurzer Zeit große strukturelle Veränderungen vonstatten gehen. In diesen Strukturen wurden $\alpha_1\beta_2$ -Heterodimere nachgewiesen. Es liegt die Vermutung nahe, dass $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimere vor allem zur dauerhaften Stabilisierung von Actinfilamenten eingesetzt werden, während $\alpha_1\beta_2$ -Heterodimere zwar ebenfalls eine hohe Capping-Aktivität besitzen, aber auch verstärkt die Polymerisation von Actin vorantreiben.

4.3.1 Lokalisation von CapZ in Myoblasten

Actin ist in myogenen C₂C₁₂-Zellen in der gesamten Zelle präsent. Es ist als Hauptbestandteil des Cytoskeletts an wichtigen Prozessen wie der Stabilisierung der Zelle und der Ausbildung des Leitsaums beteiligt. In Hinblick auf die Verteilung der β -Isoform kann angenommen werden, dass sich diese Isoform hauptsächlich am Aufbau des Membranskeletts und des Leitsaumes beteiligt. Sie ist in hohem Maße in peripheren Bereichen der Zelle im Bereich der Plasmamembranen lokalisiert und liegt ebenso verstärkt in fokalen Kontakten vor.

CapZ konnte in myogenen C₂C₁₂-Zellen nachgewiesen werden. Es liegt dort in Bereichen vor, in denen Actinfilamente oder Actinbündel in andere Strukturen inserieren. Die Kolokalisation mit anderen ABPs unterstreicht, dass CapZ in diesen Zellen eine ähnliche Funktion wie im Skelettmuskel einnehmen könnte, nämlich die Stabilisierung von F-Actinfilamenten. Der Nachweis von CapZ am Leitsaum der Zellen bekräftigt das in Abbildung 1.4 dargestellte Modell von Wear & Cooper zum Einfluss des Proteins auf die Ausbildung verschiedener Actinfilament-Architekturen.

Vergleicht man die Lokalisation von β -Actin mit der der rCapZ β_2 -Untereinheit, so überschneiden sich beide stark. Dies führt zu der Annahme, dass an der Organisation des Membranskeletts sowohl β -Actin als auch CapZ-Heterodimere mit der β_2 -Untereinheit beteiligt sind. In diesen Zellen scheinen mindestens zwei Actinkompartimente zu existieren: Eines unter Beteiligung von β -Actin und CapZ $\alpha_x\beta_2$ und mindestens ein weiteres mit anderen Actin-Isoformen und CapZ $\alpha_x\beta_1$. Beide Systeme müssen als getrennt voneinander betrachtet werden. Auch wenn wegen des Fehlens eines isoformspezifischen CapZ α -Antikörpers keine Lokalisation dieser Untereinheiten vorgenommen werden konnte, kann angenommen werden, dass die Capping-Proteine *in vivo* als $\alpha_1\beta_2$ - bzw. $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimere vorliegen. Die isoformspezifische Rückfaltung der Heterodimere *in vitro* sowie die Lokalisation durch Hart et al. (1997, [66]) legt eine solche Isoformverteilung nahe.

Die Kolokalisation von α -Actinin mit CapZ bzw. der CapZ β_2 -Untereinheit zeigt keine CapZ-isoformabhängige Verteilung beider Proteine. Wie durch die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Experimenten bestätigt, ist CapZ *in situ* fast immer mit α -Actinin kolokalisiert. Die Interaktion von CapZ und α -Actinin scheint ein allgemeines Prinzip der Actinfilamentstabilisierung darzustellen. Eine Ausnahme bilden jedoch CapZ-haltige Strukturen des Nukleus. Hier konnte α -Actinin nicht nachgewiesen werden.

1989 gelang Ankenbauer et al. der Nachweis eines heterodimeren ABPs in Oocytenkernen des Krallenfroschs (*X. laevis*) [5], wobei dessen α -Untereinheit als hochhomolog zur CapZ α -Untereinheit aus Aves beschrieben wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte CapZ und die CapZ β -Untereinheit in der Peripherie von Zellkernen aus C₂C₁₂-Zellen und Glattmuskulzellen lokalisiert werden. Allerdings kann anhand der Daten keine Aussage darüber getroffen werden, auf welcher Kernmembranseite CapZ lokalisiert ist. Querschnitte durch die Zellkerne zeigten meist eine punktförmige Lokalisation von CapZ in Membrannähe, jedoch keine Färbung im Kernlumen. Diese Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu den Daten von Ankenbauer et al., die die α -Untereinheit im Kernlumen nachwiesen.

Oocytenkerne aus Amphibien enthalten hohe Konzentrationen von polymerisationsfähigem β - und γ -Actin (z.B. Clark & Merriam 1977 [36]; Vanderkerckhove et al., 1981 [198]), welches in einem nucleoplasmatischen Pool vorliegt (DeRobertis et al., 1978 [39]). Die Konformation dieser Actine unterscheidet sich von derjenigen cytoplasmatischer Actine. Kern-Actine können über einen spezifischen Antikörper detektiert werden (Gonsior et al., 1999 [62]). Der Zellkern ist, wie einige andere Zellorganelle, über Actinfilamente am Cytoskelett verankert, allerdings ist über die Assoziation der Filamente an die Kernmembran bisher wenig bekannt. Actine sind aber auch an der Kondensation von Chromosomen, der Ausbildung von chromosomalen Schleifen und der Transkription beteiligt (Lane, 1969 [103]; Rungger et al., 1979 [156]; Scheer et al., 1984 [164]). Inwieweit CapZ in diese Kernprozesse involviert ist, läßt sich schwer abschätzen. Allerdings steht aufgrund der Lokalisation von CapZ fast ausschließlich an der Membran zu vermuten, dass es an der cytosolischen Seite der Kernmembran assoziiert ist, dort die Enden von Actinfilamenten cappt und somit die Anbindung des Kerns an cytoskeletale Strukturen vermittelt. Das bandförmige Areal in der Kernmembranperipherie, in dem die punktierten, CapZ-haltigen Strukturen vorliegen, kann als ein „nukleoskeletaler Verankerungsring“ angesehen werden. In C₂C₁₂-Zellen ist der Abstand zwischen Kern und oberer bzw. unterer Plasmamembran sehr gering. An diesen Stellen scheint der Kern nicht mit dem Cytoskelett verbunden zu sein. In der Basalebene der Zellen sind unterhalb des Zellkerns außerdem vergleichsweise wenige actinhaltige Strukturen nachzuweisen. Der Kern wäre damit nur seitlich im Cytoskelett fixiert und würde bei Kriechbewegungen der Zellen mitgezogen. Es kann jedoch

nicht ausgeschlossen werden, dass CapZ auch oder sogar ausschließlich auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran in Kernprozesse involviert ist und mit Actinen interagiert.

Wie erwähnt sind Actine auch an der Organisation der Chromosomenstruktur und der Transkription beteiligt. So wurde β -Actin als Coaktivator der RNA-Polymerasen I - III und von Präinitiationskomplexen beschrieben (de Lanerolle et al., 2005, Übersichtsartikel [104]). Auch ein Protein aus der Familie der Myosinmotoren, das NMI (*nuclear myosin I*), konnte in Zellkernen als Komponente des RNA-PolymeraseII-Komplexes identifiziert werden (Pestic-Dragovic, 2000 [140]; Gillespie et al., 2001 [60]). Die Beobachtung, dass sich CapZ β_2 nicht in jedem untersuchten Zellkern im Kernlumen nachweisen ließ, läßt auf eine Beteiligung von CapZ an einigen Prozessen, die z.T. nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus' in größerem Umfang ablaufen, schliessen. Diese Beteiligung könnte ähnlich der von CARMIL und CapZ ablaufen, indem ein Komplex u.a. aus Actin, Myosin, CapZ, DNA und z.B. RNA-Polymerase gebildet wird, welcher dann im Nucleolus zu beobachten wäre.

Eine weitere Erklärung für die Existenz von CapZ in der Kernmembranperipherie kann die Entdeckung von actinhaltigen Filamenten, welche mit der Kernhülle assoziiert sind, geben (Kiseleva et al., 2004 [93]). Zusammen mit anderen Befunden (Dahl et al., 2004 [38]; Holaska et al., 2004 [73]; Libotte et al., 2005 [1]) erscheint es möglich, dass ein perinukleoplasmatischer, infranuklearer Actinkortex existiert, welcher dynamisch mit der Kernlamina und den Kernporenkomplexen interagiert und eine Rolle beim molekularen Export aus dem Kern oder bei nukleoplasmatischen Interaktionen spielt. Heterodimere Cappingproteine könnten in dynamischer Weise in diese Mechanismen involviert sein, allerdings befindet sich die Forschung auf dem Gebiet von Kernactinen noch in einem sehr frühen Stadium (Pederson & Aebi, 2005, Essay [139]).

4.3.2 Lokalisation von CapZ im Glattmuskel

Der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von CapZ in Glattmuskelzellen zeigte eine distinkte Verteilung des Proteins ausschließlich in *dense plaques* und *dense bodies*. Es scheint hier, wie in der Z-Scheibe des Skelettmuskels, durch Bindung an F-Actin den Austausch von Actinmonomeren zu verhindern und die Filamente dadurch zu stabilisieren. Die *dense bodies* können daher funktionell als Z-Scheiben-Analoga gesehen werden. Sowohl in *dense bodies* als auch *dense plaques* kann α -Actinin nachgewiesen werden (Geiger et al., 1981 [57]). Auch in diesen Strukturen scheint eine Wechselwirkung von CapZ und α -Actinin stattzufinden (s. 4.3.1).

Die Lokalisation der CapZ β_2 -Untereinheit ausschließlich in den membranständigen *dense*

plaques und die Kolokalisation mit Vinculin, einem Protein, welches die Actinfilamentbindung an Membranen vermittelt, führt zu der Vermutung, dass es sich bei diesen Strukturen um Kontaktstellen von Cytoskelett- bzw. Intermediärfilamentsystemen und der extrazellulären Matrix handelt. Diese Beobachtungen untermauern die Hypothese, dass Glattmuskelzellen zwei verschiedene Actinfilamentsysteme besitzen: Das eine Filamentsystem nimmt die Aufgaben eines typischen Cytoskeletts wahr: Es verleiht der Zelle mechanische Stabilität, verbindet Intermediärfilamente mit dem Actincytoskelett und vermittelt die Bindung an die extracelluläre Matrix bzw. andere Zellen. Das andere Filamentsystem ist für die Kontraktion der Zelle zuständig. Die Verbindungspunkte einzelner kontraktile Einheiten untereinander sind die cytoplasmatischen *dense bodies*. Möglicherweise existieren weitere Actinfilamente, die die *dense bodies* mit den *dense plaques* verbinden und damit den kontraktile Einheiten eine laterale mechanische Stabilität gegenüber zu starken Zugkräften zu gewähren. In Skelettmuskelzellen wird diese Aufgabe u.a. von Titin übernommen; dieses Protein wurde im Glattmuskel jedoch nicht nachgewiesen.

Isolierte Nuklei aus Glattmuskelzellen enthalten, wie myogene C₂C₁₂-Zellen, ebenfalls CapZ mit der β_2 -Isoform. Auch hier ist das Protein hauptsächlich in einem bandförmigen Areal in punktierten Strukturen lokalisiert und vermittelt vermutlich die Anbindung an das Cytoskelett. Es scheint sich somit um ein allgemeines Strukturprinzip zumindest von kontraktile Zellen zu handeln, welches die Kerne dieser Zellen hauptsächlich lateral mit dem Cytoskelett arrangiert. Bei der Kontraktion dieser Zellen bleiben die Nuklei in einer relativen Position innerhalb des Zelllumens, ohne in Randbereiche des Cytoplasmas abzuwandern.

Kontraktile Zellen enthalten mindestens zwei verschiedene cytoplasmatische Actinsysteme, die sich hinsichtlich ihrer Struktur, Funktion, Regulation und Proteinzusammensetzung unterscheiden. Diese Systeme beinhalten einige Gemeinsamkeiten wie z.B. die Beteiligung von α -Actinin an der Organisation von Actinfilamenten. Die CapZ-Isoformen sind Teil dieser Systeme, wobei sich eine distinkte, isoformspezifische Zugehörigkeit der Heteromere zu dem jeweiligen System nachweisen lässt. Auch die Beteiligung bestimmter Actin-Isoformen am Aufbau dieser Systeme und das Auftreten von Proteinen wie Vinculin in nur einem System sprechen für deren differentielle Existenz. Allerdings sind noch eine Reihe von experimentellen Ansätzen nötig, um weitere Einblicke in die Funktionsweise dieser Filamentsysteme zu erhalten.

4.4 Ausblick

Die rekombinante Herstellung von funktioneller CapZ-Heterodimere und ihrer separat renaturierten Untereinheiten bietet eine Reihe von Ansatzpunkten, das Wissen über die Funktion der Capping Proteine weiter zu steigern. So ist über die Funktion der Isoformen bisher wenig bekannt. Entsprechende biochemische Versuche scheitern meist an der Verfügbarkeit der Proteine. Außerdem konnten, mit Ausnahme von ECapZ, keine einzelnen Isoformen sondern nur Isoformgemische isoliert werden. Mit den rekombinanten Expressionssystemen ist nun jedoch die Möglichkeit gegeben, ausreichende Mengen einzelner Isoformen zu produzieren und diese weiter zu charakterisieren.

Gerade die verschiedenen Interaktionen von CapZ mit anderen Proteinen bedürfen weiterer Untersuchungen. So ist meist unklar, ob diese Interaktionen CapZ-isoformspezifischer Natur sind. Mit den hergestellten Expressionsvektoren bzw. deren cDNAs können nun *two hybride screens* durchgeführt werden, um weitere Interaktionspartner zu identifizieren. Auch die möglichen Interaktionen von CapZ mit Membranlipiden oder die Interaktion der CapZ α -Untereinheiten mit Proteinen der S100-Familie in isoformspezifischer Weise können nun aufgrund der Verfügbarkeit der Isoformen biochemisch untersucht werden.

Über die Lokalisation der α -Untereinheiten in Zellen ist wegen des Fehlens isoformspezifischer α -Antikörper noch wenig bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Expressionsvektoren könnten genutzt werden, um fluoreszierende Proteine wie das GFP (*green fluorescent protein*) mit den rekombinanten α -Untereinheiten zu fusionieren und diese rekombinanten Fusionsproteine in lebenden Zellen zu exprimieren. Der möglicherweise erfolgende Einbau dieser Proteine in bestimmte Zellstrukturen wird dann Informationen über die isoformspezifische Lokalisation der α -Untereinheiten geben.

Der Nachweis von CapZ in der Peripherie von Zellkernmembranen bedarf noch weiterer Klärung. So sollte auf elektronenmikroskopischer Basis eine Feinlokalisierung vorgenommen werden, um eine Aussage über mögliche Funktionen von CapZ im oder am Nukleus zu erhalten. In Zusammenhang mit der Lokalisation von Actin im Zellkern könnten sich daraus einige neue Aspekte zur Beteiligung von ABPs an nukleoplasmatischen Prozessen ergeben.

Die Herstellung eines isoformspezifischen CapZ β_2 -Antikörpers bietet weitere Möglichkeiten zur Untersuchung der β -Isoformen: Da der Antikörper gegen ein Peptid mit der Sequenz der Actinbindestelle gerichtet ist, kann durch Injektion des Serums in lebende Zellen die Interaktion der Untereinheit (oder sogar des ganzen Heterodimers) mit Actin unterbunden werden, woraus sich neue Aspekte zur Funktion der Isoform und der Substituierbarkeit einer Isoform durch die andere ergeben könnten. Die Herstellung eines β_1 -spezifischen Antiserums und dessen Nutzung für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen kann außerdem weitere Informationen der Isoformverteilung in Zellen geben.

5 Anhang

5.1 Sequenzen

5.1.1 CapZ α_1 -cDNA

Länge: 861 bp

Fett unterlegt: Start- und Stopcodon

```
1  atg  gcc  gac  ttc  gag  gat  cgg  gtg  tcg  gat  gag  gag  aag  gta  cgc
46  ata  gct  gct  aaa  ttc  atc  act  cat  gca  ccg  cca  ggg  gaa  ttt  aat
91  gaa  gtg  ttc  aat  gat  gtc  cgg  cta  cta  ctt  aat  aat  gac  aat  ctc
136 ctc  agg  gaa  ggg  gca  gca  cat  gca  ttt  gcc  cag  tat  aac  atg  gat
181 cag  ttc  aca  cct  gtg  aag  ata  gaa  gga  tat  gaa  gat  cag  gtc  tta
226 att  aca  gaa  cac  ggt  gac  ctg  ggt  aat  agc  aga  ttt  tta  gat  cca
271 aga  aat  aaa  att  tcc  ttt  aag  ttt  gat  cac  tta  cgg  aaa  gaa  gca
316 agt  gac  ccg  cag  cca  gag  gaa  gta  gat  gga  agt  ctg  aag  tct  tgg
361 aga  gaa  tcc  tgt  gac  agc  gct  cta  agg  gcc  tat  gtg  aaa  gat  cat
406 tat  tcc  aac  ggc  ttc  tgt  act  gtt  tat  gct  aaa  aat  att  gat  ggg
451 cag  cag  acc  att  att  gca  tgt  att  gaa  agc  cac  caa  ttt  cag  cct
496 aaa  aac  ttc  tgg  aat  ggt  cgt  tgg  aga  tcg  gag  tgg  aag  ttc  acc
541 atc  aca  cca  cct  aca  gcc  cag  gtg  gtt  gga  gta  ctt  aaa  att  cag
586 gtt  cac  tat  tat  gaa  gat  ggc  aat  gtt  cag  ttg  gtt  agt  cat  aaa
631 gac  gta  cag  gat  tca  gta  act  gtt  tcg  aat  gaa  gcc  caa  act  gcc
676 aag  gag  ttt  att  aaa  atc  ata  gag  cat  gca  gaa  aat  gag  tat  cag
721 aca  gca  att  agt  gaa  aac  tat  caa  aca  atg  tca  gac  acc  aca  ttc
766 aag  gcc  ttg  cgc  cgg  caa  ctt  cca  gtg  acc  cgc  acc  aaa  atc  gac
811 tgg  aac  aag  ata  ctc  agc  tac  aag  att  ggc  aaa  gaa  atg  cag  aat
856 gct  taa
```

5.1.2 CapZ α_2 -cDNA

Länge: 861 bp

Fett unterlegt: Start- und Stopcodon

```
1  atg  gcg  gat  ttg  gaa  gag  cag  ttg  tct  gat  gag  gag  aag  gta  cgt
46  ata  gca  gcg  aaa  ttc  atc  att  cat  gcc  cct  cct  gga  gaa  ttt  aat
91  gag  gtg  ttt  aat  gat  gtt  cgg  tta  ctg  ctt  aat  aat  gat  aat  ctt
```

5 Anhang

```

136  ctc  agg  gaa  gga  gca  gcc  cat  gca  ttt  gca  cag  tat  aac  ctg  gac
181  cag  ttt  act  cca  gta  aaa  att  gaa  ggt  tat  gaa  gat  cag  gta  ttg
226  ata  aca  gaa  cat  ggt  gac  ttg  gga  aat  gga  aag  ttt  ctg  gat  cca
271  aaa  aac  aga  atc  tgt  ttc  aaa  ttt  gat  cac  ttc  aga  aag  gaa  gca
316  act  gat  cca  aga  ccc  tat  gaa  gca  gaa  aat  gca  gtt  gaa  tca  tgg
361  aga  act  tca  gta  gaa  act  gct  ctg  cga  gct  tat  gta  aaa  gaa  cat
406  tat  ccg  aat  gga  gtc  tgc  act  gta  tat  ggt  aaa  aaa  ata  gat  ggg
451  cag  caa  acc  att  att  gca  tgc  ata  gaa  agc  cat  cag  ttt  caa  gca
496  aaa  aac  ttt  tgg  aat  ggt  cgt  tgg  agg  tca  gag  tgg  aag  ttt  aca
541  atc  act  cct  tca  acc  act  cag  gtg  gtt  ggc  atc  ttg  aaa  att  cag
586  gtt  cat  tat  tat  gaa  gat  ggt  aat  gtt  cag  cta  gtg  agt  cat  aaa
631  gat  ata  caa  gat  tcc  cta  aca  gtg  tct  aat  gag  gtg  caa  aca  gca
676  aaa  gaa  ttt  ata  aag  att  gta  gag  gct  gca  gaa  aat  gaa  tat  cag
721  act  gcc  atc  agt  gag  aat  tat  cag  aca  atg  tcg  gac  act  act  ttc
766  aaa  gcc  tta  cgt  cga  cag  ttg  cca  gtt  aca  cgc  act  aag  att  gat
811  tgg  aac  aag  atc  ctt  agc  tac  aag  att  ggc  aaa  gag  atg  cag  aat
856  gca  taa

```

5.1.3 CapZ β_1 -cDNA

Länge: 834 bp

Fett unterlegt: Start- und Stopcodon

```

1  atg  ggc  gat  cag  cag  ctg  gac  tgc  gcc  ttg  gac  ctg  atg  agg  cgc
46  ctg  cct  cca  cag  cag  att  gag  aag  aac  ctc  agc  gat  ctg  atc  gac
91  ctg  gtc  ccc  agt  ctg  tgt  gaa  gat  ctc  ctg  tca  tct  gtt  gac  cag
136 ccc  ctg  aaa  att  gcc  aga  gac  aag  gtg  gtg  ggc  aag  gat  tac  ctt
181 ttg  tgt  gac  tac  aac  aga  gac  ggg  gac  tcc  tat  agg  tca  ccg  tgg
226 agt  aac  aag  tat  gac  cct  cct  ttg  gaa  gat  ggg  gcc  atg  cca  tct
271 gct  cgg  ctc  aga  aag  ctg  gag  gta  gag  gcc  aac  aat  gcc  ttc  gac
316 caa  tac  cga  gac  ctg  tat  ttt  gaa  ggt  ggg  gtc  tca  tca  gtc  tac
361 ctc  tgg  gat  ctt  gat  cat  ggc  ttt  gct  gga  gtg  atc  ctc  ata  aag
406 aaa  gct  gga  gat  gga  tcc  aag  aag  atc  aaa  ggc  tgc  tgg  gat  tcc
451 atc  cac  gtg  gtg  gaa  gtg  cag  gag  aag  tcc  agc  ggc  cgt  act  gcc
496 cat  tac  aag  ttg  acc  tcc  acg  gtg  atg  cta  tgg  ctg  caa  acc  aac
541 aaa  tcc  ggc  tcg  ggc  acc  atg  aac  ctg  gga  ggc  agc  cta  acc  aga
586 cag  atg  gag  aaa  gac  gaa  act  gtg  agt  gac  tgt  tcc  cca  cac  ata
631 gcc  aac  atc  ggg  cgc  ctg  gtg  gag  gac  atg  gaa  aac  aaa  atc  cga
676 agc  acg  ctg  aat  gag  atc  tac  ttt  gga  aaa  aca  aag  gac  atc  gtc
721 aac  ggg  ctg  aga  tct  ctt  gat  get  atc  ccc  gac  aac  cac  aag  ttt
766 aag  cag  ttg  cag  agg  gaa  ctt  tct  caa  gtg  ctg  acc  cag  cgc  cag
811 gtc  tac  atc  cag  cct  gat  aat  tga  gcc  gac  cca  ggt  ctg  tgc  aga
856 cgt  ttg  cag  aca  aat  caa  agc  ttg  aag

```

5.1.4 CapZ β_2 -cDNA

Länge: 819 bp

Fett unterlegt: Start- und Stopcodon

```

1  atg agt gac cag cag ctg gat tgt gcc ttg gat ttg atg agg cgt
46 ctg cct ccg cag cag ata gag aag aat ctc agt gac ctc att gac
91 ttg gtc cca agc ctc tgt gaa gat ctc ctc tcc tct gtt gat cag
136 cca ttg aag att gca cga gat aag gtg gta gga aaa gac tat cta
181 ttg tgt gac tac aac aga gat gga gac tcg tat aga tca ccg tgg
226 agt aac aag tat gat cct ccc ctg gaa gac ggt gcc atg cca tct
271 gct cgc ctg cgc aag ctg gag gtg gaa gcc aac aat gcc ttt gac
316 cag tat aga gac ttg tat ttc gaa ggt gga gtc tcc tct gtc tac
361 ctc tgg gat ctg gat cat ggt ttt gcc ggt gtg atc ctc att aag
406 aaa gct gga gat gga tca aag aag att aag gga tgc tgg gat tcc
451 atc cac gtg gtg gag gtt cag gag aaa tcc agc ggc cgt act gct
496 cat tac aag ctg acc tcc aca gtg atg ctg tgg ctg cag act aat
541 aaa act ggt tct ggt acc atg aac ctt ggc ggg agc ctc acc aga
586 cag atg gag aaa gat gag act gtg agc gac tct tct ccg cac ata
631 gcc aat att gga cgc ttg gta gag gac atg gaa aac aaa atc aga
676 agt aca ctg aat gag att tat ttt gga aaa aca aag gac atc gtg
721 aat ggg ctg agg tct gtg cag act ttt gca gac aaa tca aaa caa
766 gaa gct ctt aaa aat gac ctg gtg gag gct ttg aag aga aag cag
811 caa agt taa agc ttt ctt cat gcc

```

5.2 Abkürzungen

a	anti	M	molar
A	Ampere	m	milli
ABP	Actinbindeprotein	MADB	Membran-assoziierte <i>dense bodies</i>
ADP	Adenosindiphosphat	min	Minute
Amp	Ampicillin	Mops	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
APB	Actinpolymerisationspuffer		
APS	Ammoniumpersulfat		
ATP	Adenosinriphosphat	mRNA	Boten-RNA
b	Base	μ	micro
BCA	Bicinchoninsäure	n	nano
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat-p-Toluidinsalz	NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
bp	Basenpaare	Ω	Ohm
BSA	bovine serum albumin	o.D.	Optische Dichte
c	Konzentration	p	pico
cDNA	komplementäre DNA	PCR	polymerase chain reaction
CHAPS	3-[(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanslfonat	PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
cLSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie	PMSF	Phenylmethan-sulfonylfluorid
Da	Dalton	Pyren	N-(1-pyrenyl)-iodacetamid
DEAE	Diethylaminoethyl	RNA	Ribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat	rpm	Umdrehungen pro Minute
DMAE	Dimethylaminoethyl	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT-PCR	Reverse Transkription
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat	PCR	Polymerase chain reaction
DTE	1,4-Dithioerythritol	SAP	Shrimp alkaline phosphatase
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol	Skm	Skelettmuskel
E	Extinktion	SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid	s	Sekunde
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TBE	Tris-Borat-EDTA
EGTA	Ethylenglycol-bis(b-aminoethyl-ether)N,N-tetraessigsäure	TBS	Tris-buffered saline
EtBr	Ethidiumbromid	TCA	Trichloressigsäure
EtOH	Ethanol	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
F	Farad	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
F-Actin	filamentöses Actin	Triton X-100	Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	TTBS	Tween-20-haltige TBS
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography	Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-monolaureat
g	Erdbeschleunigung	U	Internationale Unit
g	Gramm	Urea	Harnstoff
G-Actin	globuläres Actin	ü/N	über Nacht
Gm	Glattmuskel	UPM	Umdrehungen pro Minute
HMW	Molekulargewichtsmarker	UV	Ultraviolett
IPTG	Isopropylthiogalactosid	UZ	Ultrazentrifuge
Kan	Kanamycin	V bzw. v	Volumen
kb	Kilobasenpaare	V	Volt
kDa	Kilodalton	w	Gewicht (weight)
l	Liter		
LB	Luria-Broth		

Literaturverzeichnis

- [1] AL., L. ET: *Lamin A/C dependent localization of nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope.* Mol. Bio. Cell, 16:3411–3424, 2005.
- [2] AMANN, K. und T. POLLARD: *Cellular regulation of actin network assembly.* Curr. Biol., 10:728–730, 2001.
- [3] AMATRUDA, J. und J. COOPER: *Purification, characterization and immunofluorescence localization of Saccharomyces cerevisiae capping protein.* J. Cell Biol., 117:1067–1076, 1992.
- [4] ANG, A., G. TACHAS, J. CAMPBELL, J. BATEMAN und G. CAMPBELL: *Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth muscle cells: alteration with phenotype.* Biochem. J., 265:461–469, 1990.
- [5] ANKENBAUER, T., J. KLEINSCHMIDT, M. WALSH, O. WEINER und W. FRANKE: *Identification of a widespread nuclear actin binding protein.* Nature, 342:822–825, 1989.
- [6] ATTRI, A., M. LEWIS und E. KORN: *The formation of actin oligomers studied by analytical ultracentrifugation.* J. Biol. Chem., 266:6815–6824, 1991.
- [7] BAGBY, R.: *Biochemistry of smooth muscle.* CRC Press, Florida, 1983.
- [8] BALDWIN, T., M. ZIEGLER, A. CHAFFATTE und M. GOLDBERG: *Contribution of Folding Steps Involving the Individual Subunits of Bacterial Luciferase to the Assembly of the Active Heterodimeric Enzyme.* J. Biol. Chem., 268:10766–10772, 1992.
- [9] BANEYX, F.: *Rekombinant protein expression in Escherichia coli.* Curr. Opin. Biotechn., 10:411–421, 1999.
- [10] BARRON-CASELLA, E. A., M. A. TORRES, S. W. SCHERER, H. H. HENG, L. C. TSUI und J. F. CASELLA: *Sequence Analysis and Chromosomal Localization of Human Cap Z.* J.Biol.Chem., 270(37):21472–21479, Sep. 1995.

- [11] BLACKWELL, J. R. und R. HORGAN: *A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form.* FEBS Letters, 295(1-3):10–12, Dez. 1991.
- [12] BLANCHARD, A., O. V. und C. D.: *The structure and function of α -Actinin.* J. Muscle Res. Cell Motil., 10:280–289, 1989.
- [13] BOND, M. und A. SOMLOYO: *Dense bodies and actin polarity in vertebrate smooth muscle.* J. Cell Biol., 95:403–413, 1982.
- [14] BOX, G., W. HUNTER und J. HUNTER: *Statistics for Experimenters.* Wiley, New York, 1978.
- [15] BREMER, A. und U. AEBI: *The structure of the F-actin filament and the actin molecule.* Curr. Opin. Cell Biol., 4:20–26, 1992.
- [16] BREMER, A., R. MILLOING, R. SÜTTERLIN, A. ENGEL und T. POLLARS: *The structural basis of the intrinsic disorder of the actin filament: the „lateral slipping“ model.* J. Cell Biol., 1991.
- [17] BURRIDGE, K. und L. CONNELL: *Talin: a cytoskeletal component concentrated in adhesion plaques and other sites of actin-membran interaction.* Cell Motil., 3:405–417, 1983.
- [18] CALDWELL JE, HEISS SG, M. V. C. J.: *Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin.* Biochemistry, 28 (1)(28):8506–8514, 1989.
- [19] CAMPBELL, G. und J. CAMPBELL: *Phenotypic modulation of smooth muscle cells in primary culture..* In: Vascular Smooth Muscle in Culture. JH Campbell, GR Campbell (eds.), Boca Raton, FL: CRC Press, -:39–56, 1987.
- [20] CAMPBELL, G., J. CAMPBELL, J. MANDERSON, S. HERRIGAN und R. RENNICK: *Arterial smooth muscle: a multifunctional mesenchymal cell.* Arch. Pathol. Lab. Med., 112:977–986, 1988.
- [21] CAMPBELL, J. und G. CAMPBELL: *Cellular interactions in the artery wall.* In: The Peripheral Circulations. S. Hunyor, J. Ludbrook, M. McGrath, J. Shaw (eds). New York: Elsevier North Holland, 1:33–39, 1984.
- [22] CANTON, D. A., M. E. OLSTEN, K. KIM, A. DOHERTY-KIRBY, G. LAJOIE, J. A. COOPER und D. W. LITCHFIELD: *The Pleckstrin Homology Domain-Containing Protein CKIP-1 Is Involved in Regulation of Cell Morphology and the Actin Cytoskeleton and Interaction with Actin Capping Protein.* Mol.Cell.Biol., 25(9):3519–3534, Mai 2005.

- [23] CARLIER, M.: *Actin: protein structure and filament dynamics*. J.Biol.Chem., 266(1):1–4, Jan. 1991.
- [24] CARLIER, M., C. JEAN, K. RIEGER, M. LENFANT und D. PANTALONI: *Modulation of the interaction between G-actin and thymosin β_4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 90:5034–5038, 1993.
- [25] CARLIER, M. und D. PANTALONI: *Control of actin dynamics in cell motility*. J. Mol. Biol., 269:459–467, 1997.
- [26] CARLIER, M., D. PANTALONI und E. KORN: *The effects of Mg^{2+} at the high-affinity and low-affinity sites of the polymerization of actin and associated ATP-hydrolysis*. J. Biol. Chem., 261:10785–10792, 1986.
- [27] CASELLA, J., S. CASELLA, J. HOLLANDS, J. CALDWELL und J. COOPER: *Isolation and characterization of cDNA encoding the α -subunit of capZ_{32/36}, an actin capping protein from Z line of skeletal muscle*. Proc. Nat. Acad. Sci., 86:5800–5804, 1987.
- [28] CASELLA, J., D. MAACK und S. LIN: *Purification and initial characterization of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments*. J. Biol. Chem., 261:10915–10921, 1986.
- [29] CASELLA, J. und M. TORRES: *Interaction of Cap Z with actin. The NH₂-terminal domains of the alpha 1 and beta subunits are not required for actin capping, and alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers bind differentially to actin*. J.Biol.Chem., 269(9):6992–6998, März 1994.
- [30] CHAMLEY, J., G. CAMPBELL und G. BURNSTOCK: *Dedifferentiation, redifferentiation and bundle formation of smooth muscle cells in tissue culture: the influence of cell number and nerve fibres*. J. Embryol. Exp. Morph., 32:297–323, 1974.
- [31] CHAMLEY, J., G. CAMPBELL und G. BURNSTOCK: *Dedifferentiation, redifferentiation and bundle formation of smooth muscle cells in tissue culture: the influence of cell number and nerve fibres*. J. Embryol. Exp. Morph., 32:297–323, 1975.
- [32] CHAMLEY, J., G. CAMPBELL, J. MCCONNELL und U. GROSCHEL-STEWART: *Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and subculture*. Cell Tissue Res., 177:503–522, 1977.
- [33] CHAMLEY-CAMPBELL, J. und G. CAMPBELL: *The smooth muscle cell in culture*. Physiol. Rev., 59:1–61, 1979.

- [34] CHAMLEY-CAMPBELL, J. und G. CAMPBELL: *What controls smooth muscle phenotype?*. Arteriosclerosis, 40:347–357, 1981.
- [35] CLARK, E.: .. Curr. Opin. Biotechnol., 9:157–163, 1998.
- [36] CLARK, T. und R. MERRIAM: *Diffusible and bound actin nuclei of Xenopus laevis oocytes*. Cell, 12:883–891, 1977.
- [37] COOPER, J. und *et al.*: *Capping Protein*. IRL Press, -:62–64, 1999.
- [38] DAHL, K. N., S. M. KAHN, K. L. WILSON und D. E. DISCHER: *The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber*. J. Cell Sci., 117:4779–4786, 2004.
- [39] DEROBERTIS, R. LONGHORN und J. GURDON: *Intracellular migration of nuclear proteins in Xenopus oocytes*. Nature, 272:254–256, 1978.
- [40] DIAMANT, S., C. WEISS, A. AZEM und P. GOLOUBINOFF: *Effecto of free and bound magnesium ions on the ATPase activity of chaperonin GroEL₁₄*. Biochemistry, 32:273–277, 1995.
- [41] DINUBILE, M., L. CASSIMERIS, M. JOYCE und S. ZIGMOND: *Actin filament barbed-end capping activity in neutrophil lysates: the role of capping protein-beta 2*. Mol.Biol.Cell, 6(12):1659–1671, Dez. 1995.
- [42] DOBSON, C.: *Protein folding. Solid evidence for molten globules*. Curr Biol., 7:636–640, 1994.
- [43] DOOLITTLE, R.: *Reconstructing history with amino acid sequences*. Protein Science, 1:191–200, 1992.
- [44] DOS REMEDIOS, C. und J. BARDEN: *Actin Structure and Function in Muscle and Nonmuscle Cells*. Academic Press, Sydney, S. 1–336, 1983.
- [45] DOS REMEDIOS, C., D. CHHABRA, M. KEKIC, I. DEDOVA, M. TSUBAKIHARA, D. BERRY und N. NOSWORTHY: *Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments*. Physiol.Rev., 83(2):433–473, Apr. 2003.
- [46] DRAEGER, A., W. AMOS, M. IKEBE und J. SMALL: *The cytoskeletal and contractile apparatus of smooth muscle: Contraction bands and segmentation of the contractile elements*. J. Cell Biol., 111:2463–2473, 1990.
- [47] DRAEGER, A., E. STELZER, M. HERZOG und J. SMALL: *Unique geometry of actin-membrane anchorage sites in avian gizzard smooth muscle cells*. J Cell Sci, 94(4):703–711, 1989.

- [48] *et al.*, A.: *Molekularbiologie der Zelle*. VHC, 4, 2002.
- [49] ESTES, J., L. SELDEN, H. KINOSIAN und L. GERSHMAN: *Tightly-bound divalent cation of actin*. J. Muscle Res. Cell Motil., 13:272–284, 1992.
- [50] EVANGELISTA, M. und *et al.*: *Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments*. J. Cell Sci., 116:2603–2611, 2003.
- [51] EYERS, C., H. MCNEILL, A. KNEBEL, N. MORRICE, S. ARTHUR, A. CUENDA und P. COHEN: *The phosphorylation of CapZ-interacting protein (CapZIP) by stress-activated protein kinases triggers its dissociation from CapZ*. Biochem. J., 389:127–135, 2005.
- [52] FAY, F., K. FUJIWARA, D. REES und K. FOGARTY: *Distribution of α -Actinin in single isolated smooth muscle cells*. J. Cell Biol., 96:783–795, 1983.
- [53] FENTON, W., Y. KASHI, K. FURTAK und A. HORWICH: *Residues in chaperonin GroEL required for polypeptid binding and release*. Nature, 371:614–619, 1997.
- [54] FERAMISCO, J. und K. BURRIDGE: *A rapid purification of alpha-actinin, filamin, and a 130,000-dalton protein from smooth muscle*. J. Biol. Chem., 255(3):1194–1199, Feb. 1980.
- [55] FRID, M., B. SHEKHONIN, V. KETELIANSKY und M. GLUKHOVA: *Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin*. Dev. Biol., 153:185–193, 1992.
- [56] GEIGER, B.: *Microfilament-membran interaction*. Trends Biochem. Sci., 10:456–460, 1985.
- [57] GEIGER, B., A. H. DUTTON, K. T. TOKUYASU und S. SINGER: *Immunoelectron microscope studies of membran-microfilament interactions: distributions of α -Actinin, tropomyosin and vinculin in intestinal brush border and chicken gizzard smooth muscle cells*. J. Cell Biol., 91:614–628, 1981.
- [58] GERSHMAN, L., L. SEIDEN und J. ESTES: *High affinity binding of divalent cation to actin monomer is much stronger than previously reported*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 135:607–614, 1986.
- [59] GERSHMAN, L., L. SELDEN, H. KINOSIAN und J. ESTES: *Preparation and polymerization properties of monomeric ADP-actin*. Biochim. Biophys. Acta, 995:109–115, 1989.
- [60] GILLESPIE, P. E. A.: *Myosin-I-nomenclature*. J. Cell Biol., 155:703–704, 2001.

- [61] GIMONA, M., M. HERZOG, J. VANDERKERCKHOVE und J. SMALL: *Smooth muscle specific expression of calponin*. FEBS Lett., 274:159–162, 1990.
- [62] GONSIOR, S., S. PLATZ, S. BUCHMEIER, U. SCHEER, B. JOCKUSCH und H. HINSSEN: *Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody*. J Cell Sci, 112(6):797–809, März 1999.
- [63] GOTTESMAN, S., E. HALPERN und P. TRISLER: *Role of sulA and sulB in filamentation by ion mutants of Escherichia coli K-12*. J. Bacteriol., 148:265–273, 1981.
- [64] GRIBSKOV, M. und R. BURGESS: *Overexpression and purification of the sigma subunit of Escherichia coli RNA-polymerase*. Gene, 26:109–118, 1983.
- [65] HART, M. C. und J. A. COOPER: *Vertebrate Isoforms of Actin Capping Protein beta Have Distinct Functions In Vivo*. J.Cell Biol., 147(6):1287–1298, Dez. 1999.
- [66] HART MC, KORSHUNOVA YO, C. J.: *Vertebrates have conserved capping protein (alpha) isoforms with specific expression patterns*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 38(2):120–132, Apr. 1997.
- [67] HARTL, F.: *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature, 381:571–580, 1996.
- [68] HARTWIG, J. und D. KWIATKOWSKI: *Actin-binding proteins*. Curr. Opin. Cell Biol., 3:87–97, 1991.
- [69] HATANO, S. und F. OOSAWA: *Isolation and characterisation of plasmodium actin*. Biochim. Biophys. Acta, 127:488–498, 1966.
- [70] HAYDEN, S., P. MILLER, A. BRAUWEILER und J. BAMBURG: *Analysis of the interaction of actin depolymerization factor with G-Actin and F-actin*. Biochemistry, 32:9994–10004, 1993.
- [71] HERMAN, I. M.: *Actin isoforms*. Current Opinion in Cell Biology, 5(1):48–55, Feb. 1993.
- [72] HIGHTOWER, R. und R. B. MEAGHER: *The molecular evolution of actin*. Genetics, 144:315–332, 1986.
- [73] HOLASKA, J. M., A. K. KOWALSKI und K. L. WILSON: *Emerin Caps the Pointed End of Actin Filaments: Evidence for an Actin Cortical Network at the Nuclear Inner Membrane*. PLoS Biology, 2(9):e231–, Sep. 2004.

- [74] HOLMES, K., I. ANGERT, F. KULL, W. JAHN und R. SCHRODER: *Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide*. Nature, 425:423–437, 2003.
- [75] HOLMES, K. und W. KABSCH: *Muscle Proteins: actin*. Curr. Opin. Struct. Biol., 1:270–280, 1991.
- [76] HOLMES, K., D. POPP, W. GEBHARD und W. KABSCH: *The atomic model of the actin filament*. Nature, 347:44–49, 1990.
- [77] HOPMANN, R., J. COOPER und K. MILLER: *Actin organization, bristle morphology and variability are affected by actin capping protein mutations in Drosophila*. J. Cell Biol., 133:1293–1305, 1995.
- [78] HOPMANN, R. und K. G. MILLER: *A Balance of Capping Protein and Profilin Functions Is Required to Regulate Actin Polymerization in Drosophila Bristle*. Mol.Biol.Cell, 14:118–128, Jan. 2003.
- [79] HUANG, M. und *et al.*: *Cdc42-induced actin filaments are protected from capping protein*. Curr. Biol., 9:979–982, 1999.
- [80] HUXLEY, H.: *Electronmicroscopic studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle*. J. Mol. Biol., 7:281–308, 1963.
- [81] ISENBERG, G., U. AEBI und T. POLLARD: *An actin-binding protein from Acanthamoebae regulates actin filament polymerization and interactions*. Nature, 288:455–459, 1980.
- [82] IVANENKOV, V., R. DIMLICH und J. JAMIESON: *Interaction of S100a0 Protein with the Actin Capping Protein, CapZ: Characterization of a Putative S100a0 Binding Site in CapZ α -Subunit*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 221(1):46–50, Apr. 1996.
- [83] JERPSETH, M., B. JERPSETH, L. BRIESTER und A. GREENER: -. Stratagies, 11(1):3–4, 1998.
- [84] JOCKUSCH, B. und H. HINSSEN: *Nonmuscle motility and the actin-based cytoskeleton*. Comprehensive Human Physiology, Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 225–243, 1996.
- [85] JUNG, G., K. REMMERT, X. WU, J. M. VOLOSKY und J. A. III: *The Dictyostelium CARMIL Protein Links Capping Protein and the Arp2/3 Complex to Type I Myosins through Their SH3 Domains*. J.Cell Biol., 153(7):1479–1498, Juni 2001.

- [86] KABSCH, W., H. MANNHERZ, D. SUCK, E. PAI und K. HOLMES: *Atomic structure of the actin:DNaseI complex*. Nature, 347:37–44, 1990.
- [87] KABSCH, W. und J. VANDERKERCKHOVE: *Structure and function of actin*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 21:49–76, 1992.
- [88] KARPOVA, T., T. K. und J. COOPER: *Actin filaments in yeast are unstable in the absence of capping protein or fimbrin*. J. Cell Biol., 73:929–937, 1995.
- [89] KILBY, P., L. VAN ELDIK und G. ROBERTS: *Identification of the binding site on S100B protein for the actin capping protein CapZ*. Protein Sci, 6(12):2494–2503, Dez. 1997.
- [90] KILIMANN, M. und G. ISENBERG: *Actin filament capping protein from bovine brain*. EMBO J., 1:889–894, 1982.
- [91] KIM, K., A. YAMASHITA, M. A. WEAR, Y. MAEDA und J. A. COOPER: *Capping protein binding to actin in yeast: biochemical mechanism and physiological relevance*. J. Cell Biol., 164(4):567–580, Feb. 2004.
- [92] KINOSIAN, H., L. SELDEN, J. ESTES und L. GERSHMAN: *Nucleotide binding to actin. Cation dependence of nucleotide dissociation and exchange rates*. J. Biol. Chem., 286:8683–8691, 1993.
- [93] KISELEVA, E., S. P. DRUMMOND, M. W. GOLDBERG, S. A. RUTHERFORD, T. D. ALLEN und K. L. WILSON: *Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in Xenopus oocyte nuclei*. J Cell Sci, 117(12):2481–2490, Mai 2004.
- [94] KONDO, H.: *Unidirectional growth of F-actin*. J. Biochem., 79:159–171, 1976.
- [95] KORN, E.: *Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells*. Phys. Reviews, 62:672–737, 1982.
- [96] KOUYAMA, T. und K. MIHASHI: *Fluorometry study of N-(pyrenyl)-iodoacetamid-labelled F-Actin*. Eur. J. Biochem., 114:33–38, 1981.
- [97] KREIS, T. und R. VALE (Hrsg.): *Actin and actin-binding proteins*, Bd. 1. Oxford university press, 1993.
- [98] KUDRYASHOV, D., M. SAWAYA, H. ADISETIYO, T. NORCOSS, G. HEGYL, E. REISLER und T. YEATES: *The crystal structure of a cross-linked actin dimer suggests a detailed molecular interface in F-actin*. PNAS, 102:1310513110, 2005.

- [99] KUHLMAN, P. und V. FOWLER: *Purification and characterization of an $\alpha_1\beta_2$ isoform of capZ from human erythrocytes: Cytosolic location and inability to bind Mg^{2+} ghosts suggest that erythrocyte actin filaments are capped by adductin.* Biochem., 36:13461–13472, 1997.
- [100] KURISU, K., Y. OHSAKI, K. NAGATA, T. KUKITA, H. YOSHIKAWA und T. INAI: *Immunoelectron microscopic localization of fibronectin in the smooth muscle layer of mouse intestine.* J. Histochem. Cytochem., 35:411–417, 1987.
- [101] KYHSE-ANDERSON, J.: *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose.* J. Biochem. Biophys. Met., 10:203–209, 1984.
- [102] LAHAM, L., J. LAMB, P. ALLEN und P. JANMEY: *Selective binding of gelsolin with different sensitivities to adenin nucleotids.* Eur. J. Biochem., 234:1–7, 1993.
- [103] LANE, N.: *Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes.* J. cell biol., 40:286–291, 1969.
- [104] LANEROLLE, P. DE, T. JOHNSON und W. A. HOFMANN: *Actin and myosin I in the nucleus: what next?* Nature Structural & Molecular Biology, 12:742–746, 2005.
- [105] LEHMAN, W., A. SHELDON und W. MADONIA: *Diversity in smooth muscle thin filament composition.* Biochim. Biophys. Acta, 914:35–39, 1987.
- [106] LI, F. und H. HIGGS: *The mouse formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition.* Curr. Biol., 13:1335–1340, 2003.
- [107] LINDERKAMP, O. und H. MEISELMANN: *Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties of density-separated human red cells.* Blood, 59:1121–1127, 1982.
- [108] LITTLEFIELD, R., A. ALMENAR-QUERALT und V. FOWLER: *Actin Dynamics at pointed ends regulates thin filament length in straited muscle.* Nature Cell Biology, 3:544–551, Juni 2001.
- [109] LITTLEFIELD, R. und V. FOWLER: *DEFINING ACTIN FILAMENT LENGTH IN STRIATED MUSCLE: Rulers and Caps or Dynamic Stability?* Annual Review of Cell and Developmental Biology, 14:487–525, Nov. 1998.
- [110] LUTHER, P.: *Three-dimensional reconstruction of a simple Z-band in fish muscle.* J. Cell Biol., 113:1043–1055, 1991.
- [111] MACIVER, S. und A. WEEDS: *Actophorin preferentially binds monomeric ADP-actin over ATP-bound actin: Consequences for the cell locomotion.* FEBS Lett., 347:251–256, 1994.

- [112] MARSTON, F.: *The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli*. Biochem. J., 240:1–12, 1986.
- [113] MARUYAMA, K.: *Effects of trace amounts of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the polymerization of actin*. Biochim. Biophys. Acta, 667:139–142, 1981.
- [114] MARUYAMA, K., H. KUROKAWA, M. OOSAWA, S. SHIMAOKA, H. YAMAMOTO, M. ITO und K. MARUYAMA: *Beta-actinin is equivalent to Cap Z protein*. J.Biol.Chem., 265(15):8712–8715, Mai 1990.
- [115] McLAUGHLIN, P., J. GOOCH, H. MANNHERZ und A. WEEDS: *Structure of Gelsolin segment I:actin complex and the mechanism of filament severing*. Nature, 364:685–692, 1993.
- [116] MENDELSON, R. und E. MORRIS: *THE STRUCTURE OF THE ACTO-MYOSIN SUBFRAGMENT 1 COMPLEX: RESULTS OF SEARCHES USING DATA FROM ELECTRON MICROSCOPY AND X-RAY CRYSTALLOGRAPHY*. PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, 94:8533, 1997.
- [117] MERRILEES, M., G. CAMPBELL, J. CAMPBELL und E. SPANIDIS: *Glycosaminoglycan synthesis by smooth muscle cells of differing phenotype and their response to endothelial cell conditioned medium*. Artherosclerosis, 81:245–254, 1990.
- [118] MILLIGAN, R., M. WHITTAKER und D. SAFER: *Molecular structure of F-actin and location surface binding site*. Nature, 348:217–228, 1990.
- [119] MISAWA, S. und I. KUMAGAI: .. Biopolymers, 51:297–307, 1999.
- [120] MIYAGAWA, Y., H. TANAKA, N. IGUCHI, K. KITAMURA, Y. NAKAMURA, T. TAKAHASHI, K. MATSUMIYA, A. OKUYAMA und Y. NISHIMUNE: *Molecular cloning and characterization of the human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein α_3 ($cp\alpha_3$)*. Mol.Hum.Reprod., 8(6):531–539, Juni 2002.
- [121] MOSSE, P., G. CAMPBELL und J. CAMPBELL: *Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. II. Artherosclerosis-free diffuse intimal thickenings compares with the media*. Artherosclerosis, 6:664–669, 1986.
- [122] MOSSE, P., G. CAMPBELL und Z. WANG: *Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal adjacent to atheromatous plaques with those of the media*. Lab. Invest., 53:556–562, 1985.

- [123] NOEL, A., D. W. MAUN, M. J. SPEICHER, DINUBILE und F. S. SOUTHWICK: *Purification and Properties of a Ca²⁺-Independent Barbed-End Actin Filament Capping Protein, CapZ, from Human Polymorphonuclear Leukocytes*. *Biochemistry*, 11(35):3518–3524, 1996.
- [124] NORTH, A., M. GIMONA, R. CROSS und J. SMALL: *Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells*. *J Cell Sci*, 107(3):437–444, März 1994.
- [125] NORTH, A., M. GIMONA, Z. LANDO und J. SMALL: *Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells*. *J Cell Sci*, 107(3):445–455, März 1994.
- [126] OOSAWA, F.: *Macromolecular assembly of actin*. *Muscle and Nonmuscle Motility*, Academic Press, NY, 1:151–216, 1983.
- [127] OOSAWA, F., S. ASAKURA, K. HOTTA, N. IMAI und T. OOI: *G-F transformation of actin as a fibrous condensation*. *J. Polymer Sci.*, 37:323–336, 1959.
- [128] ORLOVA, A., V. GALKIN, M. VANLOOCK, E. KIM, A. SHVETSOV, E. REISLER und E. EGELMAN: *Probing the structure of F-actin: cross-links constrain atomic models and modify actin dynamics*. *J. Mol. Biol.*, 312:95–106, 2001.
- [129] OTTERBEIN, L. und *et al.*: *Crystal structure of the vitamin D-binding protein and its complex with actin: structural basis of the actin-scavenger system*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:8003–8008, 2002.
- [130] OTTO, J.: *Actin-bundling proteins*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:105–109, 1994.
- [131] PALMBERG, L. und J. THYBERG: *Uterine smooth muscle cells in primary culture. Alterations in fine structure, cytoskeletal organisation and growth characteristics*. *Cell Tissue Res.*, 246:253–262, 1986.
- [132] PALMGREN, S., P. J. OJALA, M. A. WEAR, J. A. COOPER und P. LAPPALAINEN: *Interactions with PIP₂, ADP-actin monomers, and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin*. *J. Cell Biol.*, 155(2):251–260, Okt. 2001.
- [133] PALMGREN, S., M. VARTIAINEN und P. LAPPALAINEN: *Twinfilin, a molecular mailman for actin monomers*. *J Cell Sci*, 115(5):881–886, März 2002.
- [134] PANTALONI, D. und M. CARLIER: *How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β_4* . *Cell*, 75:1007–1014, 1993.
- [135] PANTALONI, D., T. HILL, M. CARLIER und E. KORN: *A model for actin polymerization and the kinetic effect of ATP-hydrolysis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:7207–7211, 1985.

- [136] PAPA, I., C. ASTIER, O. KWIATEK, M. C. LEBART, F. RAYNAUD, Y. BENYAMIN und C. ROUSTAN: *Use of a Chaotropic Anion Iodide in the Purification of Z-Line Proteins: Isolation of CapZ from Fish White Muscle*. Protein Expression and Purification, 17(1):1–7, Okt. 1999.
- [137] PAPA, I., C. ASTIER, O. KWIATEK, F. RAYNAUD, C. BONNAL, M. LEBART, C. ROUSTAN und Y. BENYAMIN: *Alpha actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line*. J Muscle Res Cell Motil., 20(2):187–197, 1999.
- [138] PARDO, J., J. SILICIANO und S. CRAIG: *Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers*. J.Cell Biol., 97:1081–1088, 1983.
- [139] PEDERSON, T. und U. AEBI: *Nuclear Actin Extends, with No Contraction in Sight*. Mol.Biol.Cell, 16(11):5055–5060, Nov. 2005.
- [140] PESTIC-DRAGOVIC, L. E. A.: *A myosin I isoform in the nucleus*. Science, 290:337–341, 2000.
- [141] POLLARD, T.: *Actin and actin-binding proteins*, Bd. 1. Oxford university press, 1993.
- [142] POLLARD, T.: *Formins coming into focus*. Dev. Cell, 6:312–314, 2004.
- [143] POLLARD, T. und G. BORISY: *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, 112:453–465, 2003.
- [144] POLLARD, T. und J. COOPER: *Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions*. Annu. Rev. Biochem., 55:987–1035, 1986.
- [145] PRING, M. und *et al.*: *Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments*. Biochemistry, 42:486–496, 2003.
- [146] PRUYENE, D. und *et al.*: *Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association*. Science, 297:612–615, 2002.
- [147] PULUS, Y., N. MAHONEY und S. ALMO: *The modular structure of actin-regulatory proteins*. Curr. Opin. Cell Biol., 10:23–34, 1998.
- [148] PYLE, W.: *Searching for the missing link: a role for the actin capping protein in heart failure*. Can. J. Cardiol., 20:1429–1432, Dec 2004.
- [149] RANSON, N., S. BURSTON und A. CLARKE: *Binding, encapsulation and ejection; substrat dynamics in a chaperonin-assisted folding reaction*. J. Mol. Biol., 266:565–664, 1997.

- [150] REMMERT, K.: *Aktin-modulierende Proteine des Muskels: Reinigung und Charakterisierung von Gelsolin aus Mollusken und von rekombinantem CapZ aus Vertebraten*. Doktorarbeit, Universität Bielefeld, März 1999.
- [151] REMMERT, K., T. E. OLSZEWSKI, M. BOWERS, M. DIMITROVA, A. GINSBURG und I. HAMMER, JOHN A.: *CARMIL Is a Bona Fide Capping Protein Interactant*. J.Biol.Chem., 279(4):3068–3077, Jan. 2004.
- [152] REMMERT, K., D. VULLHORST und H. HINSSEN: *In Vitro Refolding of Heterodimeric CapZ Expressed in E. coli as Inclusion Body Protein*. Protein Expression and Purification, 18(1):11–19, Feb. 2000.
- [153] RICKARD, J. und P. SHETERLINE: *Effect of ATP removal and inorganic phosphate on length redistribution of sheared actin filaments populations. Evidence for a mechanism of end-to-end annealing*. J. Mol. Biol., 201:675–681, 1988.
- [154] RUBENSTEIN, P. A.: *The functional importance of multiple actin isoforms*. Bioassays, 2:309–315, 1990.
- [155] RUDOLPH, R. und H. LILIE: *In vitro folding of inclusion body proteins*. FASEB J., 10(1):49–56, Jan. 1996.
- [156] RUNGGER, D., E. RUNGGER-BRANDLE, C. CHAPONNIER und G. GABBIANI: *Intranuclear injection of anti-actin-antibodies into Xenopus oocytes blocks chromosome condensation*. Nature, 282:320–321, 1979.
- [157] SAGOT, I. und *et al.*: *An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin*. Nat. Cell Biol., 4:626–631, 2002.
- [158] SAMBROCK, J., E. FRITSCH und T. MANIATIS: *Molecular cloning. A laboratory handbook. 2nd Ed.*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY, 2(-):-, - 1989.
- [159] SCHAFER, D. und J. COOPER: *Control of actin assembly at filament ends*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 11:497–518, 1995.
- [160] SCHAFER, D., S. GILL, J. COOPER, J. HEUSER und T. SCHROER: *Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin related protein is a component of a filament that resembles F-actin*. J. Cell Biol., 126:403–412, 1994.
- [161] SCHAFER, D., P. JENNINGS und J. COOPER: *Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides*. J.Cell Biol., 135(1):169–179, Okt. 1996.
- [162] SCHAFER, D., J. WADDLE und J. COOPER: *Localization of CapZ during myofibrillogenesis in cultured chicken muscle*. Cell Motil. Cytoskel., 25:317–335, 1993.

- [163] SCHAFFER DA, KORSHUNOVA YO, S. T. C. J.: *Differential localization and sequence analysis of capping protein beta-subunit isoforms of vertebrates*. J. Cell Biol., 127 (2)(Journal of Cell Biology):453–465, 1997.
- [164] SCHEER, U., H. HINSSEN, W. FRANKE und B. JOCKUSCH: *Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes*. Cell, 39:111–122, 1984.
- [165] SCHÄFFNER, J., J. WINTER, R. RUDOLPH und E. SCHWARZ: *Cosecretion of Chaperones and Low-Molecular-Size Medium Additives Increases the Yield of Rekombinat Disulfid-Bridged Proteins*. Appl. and Environ. Microbiol., S. 3994–4000, 2001.
- [166] SCHLEICHER, M., B. ANDRE, C. ANDREOLI, L. EICHINGER, M. HAUGWITZ, A. HOFMANN, J. KARAKESIOGLOU, M. STÖCKELHUBER und A. NOEGEL: *Structure/function studies on cytoskeletal proteins in Dictyostelium amoebae as a paradigm*. FEBS Lett., 369:38–42, 1995.
- [167] SCHLEICHER, M., G. GERISCH und G. ISENBERG: *New actin-binding proteins from Dictyostelium discoideum*. EMBO J., 3:2095–2100, 1984.
- [168] SCOTT, D., G. DIEZ und W. GOLDMANN: *Protein-lipid interactions: correlation of a predictive algorithm for lipid-binding sites with three-dimensional structural data*. Theoretical Biology and Medical Modelling, 17, 2006.
- [169] SEPT, D., J. XU, T. D. POLLARD und J. MCCAMMON: *Annealing Accounts for the Length of Actin Filaments Formed by Spontaneous Polymerization*. Biophys.J., 77(6):2911–2919, Dez. 1999.
- [170] SHEAR, C. und R. BLOCH: *Vinculin in subsarcolemmal densities in chicken skeletal muscle: localization and relationship to intracellular and extracellular structures*. J.Cell Biol., 101:240–256, 1985.
- [171] SHETERLINE, P. und J. SPARROW: *Protein profile: Actins*. Academic Press, London, S. 1–121, 1994.
- [172] SHUMILINA, E. V., Y. A. NEGULYAEV, E. A. MORACHEVSKAYA, H. HINSSEN und S. Y. KHAITLINA: *Regulation of Sodium Channel Activity by Capping of Actin Filaments*. Mol.Biol.Cell, 14(4):1709–1716, Apr. 2003.
- [173] SICILIANO, J. und S. CRAIG: *Meta-Vinculin – a vinculin-related protein with solubility of a membrane system*. Nature, 300:533–534, 1982.
- [174] SMALL, J.: *Studies on isolated smooth muscle cells: the contractile apparatus*. Journal of Cell Sciences, 24:327–349, 1977.

- [175] SMALL, J.: *Unique geometrie of actin-membrane anchorage sites in avian gizzard smooth muscle*. EMBO J., 4:45–49, 1985.
- [176] SMALL, J.: *Structure-function relationships in smooth muscle: the missing links*. BioAssays, 17:785–792, 1995.
- [177] SMALL, J., D. FÜRST und J. DE MEY: *Localization of filamin in smooth muscle*. J. Cell Biol., 102:210–220, 1986.
- [178] SMALL, J., D. FÜRST und L.-E. THORNELL: *The cytoskeletal lattice of muscle cells*. Eur. J. Biochem., 208:572–559, 1992.
- [179] SMALL, J. und GIMONA: *The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell*. Acta Physiologica Scandinavica, 164(4):341–348, Dez. 1998.
- [180] SMITH, P., R. KROHN, G. HERMANSON, A. MALLIA, F. GARTNER, M. PROVENZANO, E. FUJIMOTO, N. GOEKE, B. OLSON und D. KLENK: *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal. Biochem., 150:76–85, 1985.
- [181] SOBUE, K., Y. MURAMOTO, M. FUJITA und S. KAKIUCHI: *Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78:5652–5655, 1981.
- [182] SOENO, Y., H. ABE, S. KIMURA, K. MARUYAMA und T. OBINATA: *Generation of functional β -Actinin (CapZ) in an E. coli expression system*. J. Muscle Res. Cell motil., 19:639–646, 1998.
- [183] SPEED, M., D. WANG und J. KING: *Specific aggregation of partially folded polypeptid chains: the molecular basis of inclusion body composition*. Nature Biotechn., 14:1283–1287, 1996.
- [184] SPUDICH, J. A. und S. WATT: *The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction. I. BIOCHEMICAL STUDIES OF THE INTERACTION OF THE TROPOMYOSIN-TROPONIN COMPLEX WITH ACTIN AND THE PROTEOLYTIC FRAGMENTS OF MYOSIN*. J.Biol.Chem., 246(15):4866–4871, Aug. 1971.
- [185] STEINMETZ, M., D. STOFFLER, A. HOENGER, A. BREMER und U. AEBI: *Actin: From cell to atomic detail*. J. Struct. Biol., 119:295–320, 1997.
- [186] STRAUB, F.: *Actin*. Studies Med. Inst. Szeged, 2:3–15, 1942.
- [187] SUN, H., K. KWIATKOWSKA und H. YIN: *Actin monomer binding proteins*. Curr. Opin. Cell Biol., 7:102–110, 1995.

- [188] TAGUSHI, H. und M. YOSHIDA: *Chaperonin releases the substrat protein in a form with a tendency to aggregate and ability to rebind to chaperonin.* FEBS Lett., 359:195–198, 1995.
- [189] TAKAHASHI, K., K. HIWADA und T. KOKUBU: *Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 141:20–26, 1986.
- [190] TANAKA, H., Y. YOSHIMURA, Y. NISHINA, M. NOZAKI, H. NOJIMA und Y. NISHIMUNE: *Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells.* FEBS Lett., 355:4–10, 1994.
- [191] TAOKA, M., T. ICHIMURA, A. WAKAMIYA-TSURUTA, Y. KUBOTA, T. ARAKI, T. OBINATA und T. ISOBE: *V-1, a Protein Expressed Transiently during Murine Cerebellar Development, Regulates Actin Polymerization via Interaction with Capping Protein.* J.Biol.Chem., 278(8):5864–5870, Feb. 2003.
- [192] TSUKITA, S., S. TSUKITA und H. ISHIKAWA: *Association of actin and 10 nm filaments with the dense body in smooth muscle cells of the chicken gizzard.* Cell Tissue Res., 229:233–242, 1983.
- [193] TSUMOTO, K., D. EJIMA, I. KUMAGAI und T. ARAKAWA: *Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies.* Prot. Expres. Purif., 28:1–8, 2003.
- [194] URUNO, T. REMMERT, K. und J. HAMMER III: *CARMIL is a Potent Capping Protein Antagonist: Identification of a Conserved CARMIL Domain That Inhibits the Activity of Capping Protein and Uncaps Capped Actin Filaments.* J. Biol. Chem., in press, 2006.
- [195] VAN TROYS, M., J. VANDERKERCKHOVE und C. AMPE: *Structural modules in actin-binding proteins: Towards a new classification.* Biochim. Biophys. Acta, 1448:323–348, 1999.
- [196] VANDERKERCKHOVE, J.: *Actin-binding proteins.* Curr. Opin. Cell Biol., 2:41–50, 1990.
- [197] VANDERKERCKHOVE, J. und K. WEBER: *At least six different actin isoforms are expressed in higher mammals. An analysis based on the aminoterminal tryptic peptide.* J. Mol. Biol., 126:783–802, 1978.
- [198] VANDERKERCKHOVE, J. und K. WEBER: *Actin typing on total cellular extracts: a highly sensitive protein-chemical procedure able to distinguish different actins.* Eur. J. Biochem., 113:595–603, 1981.

- [199] VILLAREJO, M. und I. ZABIN: *Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains*. J. Bacteriol., 120:466–477, 1974.
- [200] VISEGRADY, B., D. LORINCZY, G. HILD, B. SORNOGYI und M. NYITRAI: *A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide*. FEBS Lett., 579:6–10, 2005.
- [201] VOLBERG, T., H. SABANAY und B. GEIGER: *Spatial and temporal relationships between vinculin and talin in the developing chicken gizzard smooth muscle*. Differentiation, 32:34–43, 1986.
- [202] VONBÜLOW, M., H.-R. RACKWITZ, R. ZIMBELMANN und W. FRANKE: *CP β 3, a novel isoform of an Actin-Binding Protein, Is a Component of the Cytoskeletal Calyx of the Mammalian Sperm Head*. Exper. Cell Res., 233:216–224, 1997.
- [203] WALLAR, B. und A. ALBERTS: *The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton*. Trends Cell Biol., 13:435–446, 2003.
- [204] WEAR, M. A.: *How Capping Protein Binds the Barbed End of the Actin Filament*. Current Biology, 13(17):1531–1537, 2003.
- [205] WEAR, M. A. und J. A. COOPER: *Capping protein binding to S100B: Implications for the tentaclemodel for capping the actin filament barbed end*. J. Biol. Chem., S. 14382–14390, Jan. 2004.
- [206] WEAR, M. A. und J. A. COOPER: *Capping protein: new insights into mechanism and regulation*. Trends in Biochemical Sciences, 29(8):418–428, Aug. 2004.
- [207] WEEDS, A. und S. MACIVER: *F-actin capping proteins*. Curr. Opin. Cell Biol., 5:63–69, 1993.
- [208] WEGNER, A.: *Head to tail polymerization of actin*. J. Mol. Biol., 108:139–150, 1976.
- [209] WEGNER, A.: *Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments*. J. Mol. Biol., 161:607–615, 1976.
- [210] WELTMAN, J., R. SZARO, A. FRACKELTON, R. DOWBEN, J. BUNTING und B. CATHON: *N-(3-pyrene)-maleimid: A long life fluorescent sulfhydryl reagent*. J. Biol. Chem., 248:3173–3177, 1973.
- [211] WRIGHT, N., K. VARNEY, K. ELLIS, J. MARKOWITZ, R. GITTI, D. ZIMMER und D. WEBER: *The three-dimensional solution structure of Ca(2+)-bound S100A1 as determined by NMR spectroscopy*. J Mol Biol., 253:410–426, Oct 2005.

- [212] YAFFE, D. und O. SAXEL: *Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle*. Nature, 270:725–727, 1977.
- [213] YAMASHITA, A., K. MAEDA und Y. MAEDA: *Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping*. EMBO J., 22(7):1529–1538, Apr. 2003.
- [214] YOSHIMURA, Y., H. TANAKA, M. NOZAKI, K. YOMOGIDA, K. SHIMAMURA, T. YASUNAGA und Y. NISHIMUNE: *Genomic analysis of male germ cell-specific actin capping protein [alpha]*. Gene, 237(1):193–199, Sep. 1999.
- [215] ZIEGLER, M., M. GOLDBERG, A. CHAFFOTTE und T. BALDWIN: *Refolding of Luciferase Subunits from Urea and Assambly of the Active Heterodimer*. J. Biol. Chem., 268:10760–10765, 1992.
- [216] ZIMMERLE, C., K. PATANE und C. FRIEDEN: *Divalent cation binding to the high- and low-affinity sites on G-actin*. Biochem., 26:6545–6552, 1987.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der AG Biochemische Zellbiologie der Fakultät für Biologie an der Universität Bielefeld in der Zeit von Januar 2002 bis Juni 2006 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. H. Hinssen angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen, besonders gekennzeichneten Hilfsmittel angefertigt habe. Außerdem erkläre ich hiermit, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Bielefeld, den 29. Mai 2006

Martin H. Glenz

6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der AG Biochemische Zellbiologie der Fakultät für Biologie an der Universität Bielefeld in der Zeit vom Januar 2002 bis Juni 2006 angefertigt. Der Konrad-Adenauer-Stiftung danke ich für die finanzielle und ideelle Unterstützung im Rahmen eines Graduiertenstipendiums.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Hinssen, danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas. Ich bedanke mich für sein stetes Interesse an meiner Arbeit sowie für seine fortwährende Bereitschaft, die Ergebnisse meiner Arbeit zu diskutieren.

Frau PD Dr. Eichenlaub-Ritter danke ich für ihre Bereitschaft, meine Arbeit als Zweitgutachterin zu referieren.

Den Mitarbeitern der AG Biochemische Zellbiologie möchte ich ein herzliches „Danke“ aussprechen. Ein besonderer Dank gilt dabei Andreas Unger, der Freud und Leid des Laboralltags mit mir teilte und mir während meines Doktorandendaseins nicht nur ein geschätzter Kollege, sondern auch ein guter Freund war und ist.

Aysel Alici aus dem Lehrstuhl für Genetik danke ich für Tips und Hinweise zum Thema 2D-PAGE.

Auch meinen außeruniversitären Freunden ein großes „Danke“. Sie sind mir in jeder Situation und Verfassung zur Seite gestanden.

Meiner Familie möchte ich einen besonders herzlichen Dank aussprechen. Ohne Euch, Eure Hilfe und Unterstützung in jeder nur erdenklichen Hinsicht wäre die Durchführung dieser Arbeit niemals möglich gewesen.