

Wechselwirkungen zwischen Gelsolin und
Tropomyosin und deren Einfluss auf das
Aktinfilamentsystem des Cytoskeletts

Dissertation

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

vorgelegt von
Heiko Begemann
aus Bielefeld

Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld
Januar 2012

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1 Einleitung	1
1.1 Glattmuskulatur	2
1.2 Aktin	4
1.2.1 Monomeres Aktin (G-Aktin)	5
1.2.2 Aktin-Filamente (F-Aktin)	6
1.3 Aktin-bindende Proteine	9
1.4 Gelsolin	10
1.5 Tropomyosin	14
1.6 Ziel der Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Tiere und Gewebe	17
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.3 Enzyme und Proteine	17
2.1.4 Antibiotika	17
2.1.5 <i>E. coli</i> -Stämme	18
2.1.6 Plasmide und Vektoren	18
2.1.7 Verwendete Kits	18
2.1.8 Protein-Molekularmassenmarker und DNA-Längenmarker	19
2.1.9 Oligonucleotide	19
2.2 Proteinbiochemische Methoden	20
2.2.1 Herstellung von Schweinemuskel-Acetonpulver	20
2.2.2 Aufreinigung von Aktin aus Schweine-Skelettmuskel	20
2.2.3 Aufreinigung von Aktin aus Schweine-Glattmuskel	21
2.2.4 Aufreinigung von Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskel	21
2.2.5 Aufreinigung von Gelsolin aus Schweine-Glattmuskel	21
2.2.6 Aufreinigung von Tropomyosin aus Schweine-Glattmuskel	23
2.2.7 Aufreinigung von Tropomyosin aus Schweine-Skelettmuskel	24
2.2.8 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	25
2.2.9 Fällung von Proteinen mit verdünnter Trichloressigsäure	27

2.2.10 Protein-Konzentrationsbestimmung	27
2.2.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.2.12 Immunblot	30
2.2.13 Kosedimentation mit F-Aktin	32
2.2.14 Viskosimetrie	33
2.2.15 Fluorometrie	35
2.2.16 Quervernetzung mit EDC	36
2.2.17 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)	37
2.2.18 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR / Biacore®)	37
2.3 Molekularbiologische Methoden	39
2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben	39
2.3.2 Aufreinigung der mRNA	39
2.3.3 Reverse Transkription	39
2.3.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren	40
2.3.5 Isolierung von Plasmiden durch Ionenaustauscher-Säulen Kits	40
2.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA durch CTAB-Lyse	40
2.3.7 Elektrophorese von Nukleinsäuren	41
2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
2.3.9 DNA-Aufreinigung nach PCR und enzymatischen Reaktionen	41
2.3.10 Restriktion von DNA	41
2.3.11 Auffüllen von 5'-Überhängen und gleichzeitiger Abbau von 3'-Überhängen an Restriktionsfragmenten	42
2.3.12 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	42
2.3.13 Ligation	42
2.3.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.4 Mikrobiologische Methoden	45
2.4.1 Transformation und Herstellung von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	45
2.4.2 Anzucht und Lagerung von Bakterien	45
2.4.3 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	45
2.4.4 Blau-Weiß-Selektion	46
2.4.5 TOPO Cloning®-Methode	46
2.4.6 Colony Blot	47

2.4.7 Glycerinkulturen	48
3 Ergebnisse	49
3.1 Native Präparation von Proteinen	49
3.1.1 Gelsolin aus Schweinemagen	49
3.1.2 Tropomyosin aus Schweine-Glatt- und Skelettmuskel	54
3.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	57
3.2.1 Rekombinantes cytosolisches Wildtyp-Schweinegelsolin	57
3.2.2 Klonierung und Expression von pgs-Deletionsmutanten	60
3.2.3 Wildtyp-Glattemuskeltropomyosin α des Schweins	67
3.2.4 Klonierung und Expression von TM α -Deletionsmutanten	69
3.3 Untersuchung der Faltung der Proteine durch CD-Spektroskopie	73
3.4 Bestimmung der Aktivitäten der aufgereinigten Proteine	76
3.4.1 Untersuchung der Bindungsfähigkeit der Schweinegelsolin- Varianten an F-Aktin durch Kosedimentation	76
3.4.2 Bestimmung der G-Aktin-Nukleationsaktivität der Gelsolin- Varianten durch Viskosimetrie und Fluorometrie.	77
3.4.3 Bestimmung der F-Aktin-Fragmentationsaktivität der Gelsolin- Varianten durch Viskosimetrie	82
3.4.4 Bestimmung der F-Aktin-Fragmentationsaktivität von Gelsolin bei verschiedenen Aktinen durch Fluorometrie	98
3.4.5 Untersuchung der Bindungsfähigkeit der Tropomyosin α - Varianten an Aktin durch Kosedimentation	104
3.5 Nachweis und Charakterisierung der Wechselwirkung von Tropomyosin und Gelsolin	105
3.5.1 Untersuchung der Interaktion von Tropomyosin und Gelsolin durch chemische Quervernetzung	105
3.5.2 Untersuchung der Interaktion von Tropomyosin und Gelsolin durch Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie	107
3.6 Einfluss der Tropomyosin/Gelsolin-Wechselwirkung auf die Fragmentation von F-Aktin durch Gelsolin	116

4 Diskussion	121
4.1 Präparation der nativen und rekombinanten Proteine	121
4.2 Charakterisierung der Basisaktivitäten und Bindung von Gelsolin und Tropomyosin an Aktin	123
4.3 Nachweis der Bindung zwischen Gelsolin und Tropomyosin	125
4.4 Einfluss der Wechselwirkung zwischen Gelsolin und Tropomyosin auf die Aktindynamik	127
4.5 Bedeutung der nachgewiesenen Wechselwirkungen und Aktivitätsänderungen	131
Literaturverzeichnis	136
Abkürzungsverzeichnis	152

Zusammenfassung

Aktinfilamente sind ein wichtiger Bestandteil des Cytoskeletts eukaryotischer Zellen. Beim Auf- und Umbau dieser Strukturen übernehmen die Aktin-bindenden Proteine eine zentrale Rolle. Zu diesen Proteinen gehören Gelsolin und Tropomyosin. Gelsolin ist ein multifunktionales Aktin-modulierendes Protein. Es fördert zum einen die Polymerisation von filamentösem Aktin (F-Aktin) aus seinen Monomeren (G-Aktin), zum anderen schneidet es auch bestehende Aktinfilamente und blockiert danach das schnell wachsende Ende des Filaments, so dass keine Monomere mehr assoziieren oder dissoziieren können. Tropomyosine sind fadenförmige Strukturproteine, die als Teil des kontraktiven Systems vieler Zellen vorkommen. Beim Aufbau des Mikrofilamentsystems spielen sie eine wichtige Rolle, da sie sich seitlich an Aktinfilamente anlagern können und diese dadurch stabilisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das funktionelle Zusammenspiel der drei Proteine Aktin, Gelsolin und Tropomyosin untersucht.

Die zu untersuchenden Proteine wurden zunächst nativ aus der Glattmuskulatur des Schweinmagens aufgereinigt, da im Rahmen dieser Arbeit insbesondere die physiologischen Verhältnisse in glatter Muskulatur berücksichtigt werden sollten. Die Proteine wurden zunächst hinsichtlich ihrer Basisaktivitäten im Zusammenhang mit Aktin charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass Schweinegelsolin alle typischen Gelsolineigenschaften wie calciumabhängige Nukleationsbeschleunigung und Fragmentation von Aktinfilamenten zeigt. Das Glattmuskeltropomyosin wiederum zeigte die zu erwartende Fähigkeit an Aktinfilamente zu binden. Des Weiteren ließ sich eine direkte Wechselwirkung zwischen Gelsolin und Tropomyosin nachweisen. Um diese Interaktionen genauer untersuchen zu können, wurden Gelsolin und Tropomyosin rekombinant hergestellt und zu jedem der beiden Proteine eine Reihe von Mutanten konstruiert. Mit Hilfe der verschiedenen Mutanten konnten die Bindestellen von Tropomyosin und Gelsolin füreinander lokalisiert und charakterisiert werden. Die Tropomyosin-Bindestelle auf Gelsolin ließ sich dem ersten Drittel der zweiten Domäne zuordnen. Die Gelsolin-Bindestelle auf Tropomyosin liegt im Bereich der N-terminalen 34 Aminosäuren dieses Proteins. Die ermittelten Bindekonstanten von Gelsolin und Tropomyosin an Aktin, sowie von Gelsolin an Tropomyosin zeigten, dass diese Bindungen von vergleichbarer Stärke sind. Die ermittelten K_D -Werte lagen zwischen 10^{-10} und 10^{-11} M. Aktivitätstests mit verschiedenen Aktinen aus Glatt- und Skelettmuskeln zeigten keine unterschiedlichen Aktivitäten von Gelsolin und Tropomyosin in Abhängigkeit von der Art des verwendeten Aktins. Nachdem die Bindung zwischen Gelsolin und Tropomyosin untersucht worden war, wurde noch ermittelt, welche Auswirkungen diese auf die Aktinfilamentdynamik hat. Dabei wurde eine Veränderung der vorher ermittelten Basisaktivitäten gezeigt. Wenn Gelsolin zuerst mit Tropomyosin interagiert, wird die Fragmentationsaktivität deutlich verringert, wenn sich Tropomyosin jedoch zuerst an F-Aktin anlagert, kann dieses Filament ungehindert geschnitten werden. Durch diese Versuche konnte somit einerseits gezeigt werden, dass Tropomyosin die Gelsolinaktivität hemmen kann, andererseits kann man hieraus auch schließen, dass die Hemmwirkung nicht durch eine kompetitive Bindung an Aktin, sondern direkt durch die Gelsolin-Tropomyosin-Interaktion vermittelt wird.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen einige Möglichkeiten auf, wie durch das Zusammenspiel von Tropomyosin und Gelsolin der Aufbau des Mikrofilamentsystems einer Zelle beeinflusst werden kann und das Tropomyosin eine wichtige Rolle in der Regulation der Fragmentationsaktivität von Gelsolin spielt. Dies spielt sowohl bei der Aufrechterhaltung der Funktionalität von kontraktiven Zellen als auch bei Transformationsvorgängen bei der Entstehung von Krebszellen eine wichtige Rolle.

1 Einleitung

Bewegung und Veränderung der äußeren Gestalt sind grundlegende und wichtige Vorgänge, die für das Leben auf zellulärer Ebene von entscheidender Bedeutung sind. Aus diesem Grund ist jede lebende Zelle darauf angewiesen, über Mechanismen zu verfügen um diese Vorgänge möglichst effizient steuern zu können. Jede Zelle hat ein großes Repertoire an Proteinen, die diese Vorgänge beeinflussen. Zu den zellulären Prozessen, die mit Bewegung und Gestaltänderung zu tun haben, gehören der intrazelluläre Stofftransport, die Nahrungsaufnahme, die Lokomotion der Zelle, Signaltransduktion und Cytokinese. Die Grundlage für diese vielfältigen Prozesse wird durch die dynamischen Eigenschaften des Cytoskeletts gelegt. Dieses Netzwerk von Proteinen, welches einer Zelle Stabilität und Form gibt, besteht aus verschiedenen Typen von Proteinfilamenten, die von einer ganzen Reihe von assoziierten Proteinen beeinflusst werden.

In dieser Arbeit werden insbesondere die Aktinfilamente (auch Mikrofilamente genannt) untersucht, die einer von drei Hauptbestandteilen des Cytoskeletts sind und in jeder eukaryotischen Zelle vorkommen, sowie Proteine, die dieses Filamentsystem beeinflussen. An der Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente sind u.a. so genannte Aktin-bindende Proteine beteiligt. Zu diesen Proteinen, die die Eigenschaften des Aktin modulieren, gehören auch Tropomyosin und Gelsolin. Tropomyosin kann Aktinfilamente durch laterale Assoziation stabilisieren, während die Wirkung des Gelsolins u.a. darin besteht, Aktinfilamente zu schneiden und freie Enden zu blockieren, so dass dort keine Polymerisation mehr stattfinden kann. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Aktivitäten dieser beiden Proteine in Bezug auf Aktin näher untersucht. Des Weiteren wird der Fragestellung nachgegangen, ob sich diese beiden Proteine in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen können.

1.1 Glattmuskulatur

Die Glattmuskulatur ist ein kontraktiles Gewebe, welches in den Wänden der meisten inneren Organe und Hohlorgane wie z.B. Magen, Darm, Harnblase sowie Blut- und Lymphgefäßen vorkommt. Lichtmikroskopisch betrachtet scheint die Glattmuskulatur aus vielen spindelförmigen Einzelzellen mit einem zentral gelegenen Zellkern zu bestehen. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur besitzt die Glattmuskulatur keine sichtbare Querstreifung, da die Fibrillen, die ihrerseits aus Aktin- und Myosinfilamenten bestehen, eher netzförmig und nicht wie beim quergestreiften Skelettmuskel parallel angeordnet vorliegen. Die Kontraktion der Glattmuskulatur erfolgt unwillkürlich und wird hauptsächlich vom vegetativen Nervensystem kontrolliert. Dies geschieht z.T. durch wandständige vegetative Ganglien, die zwischen den glatten Muskelzellen verlaufen und Transmitter wie z.B. Noradrenalin über spezialisierte Nervenendigungen freisetzen können. Diese Botenstoffe wiederum können über membranständige Rezeptoren und Signaltransduktion in der Zelle z.B. über einen Calciueinstrom eine Kontraktion der glatten Muskelzelle auslösen. Die einzelnen Glattmuskelzellen arbeiten in Form eines funktionellen Syncytiums, d.h. die Gesamtheit aller Zellen kann über Kontraktionswellen als gemeinsames Ganzes wie z.B. als Ringmuskel des Darms arbeiten. Dieses ist z.B. für die Peristaltik des Darms von Bedeutung. Ähnliche Vorgänge in den Wänden von Blutgefäßen sorgen u.a. für eine Regulation des Blutdrucks.

Das Cytoskelett von Glattmuskelzellen besteht hauptsächlich aus zwei Komponenten: Aktin- und Intermediärfilamenten. Die Aktin- sowie die mit ihnen verbundenen Myosinfilamente sind hier in Bündeln organisiert, wobei ein einzelnes Myosinfilament von 13 bis 14 Aktinfilamenten umgeben ist. Diese Aktin/Myosin-Bündel werden zum einen an den sog. *dense bodies*, die den Z-Scheiben in der Skelettmuskulatur entsprechen, befestigt, andererseits an den sog. *dense plaques*, die an der Innenseite der Plasmamembran liegen. Mit den *dense bodies* sind auch die Intermediärfilamente verbunden, so dass das Cytoskelettnetzwerk aus verschiedenen Proteinen miteinander verbunden ist.

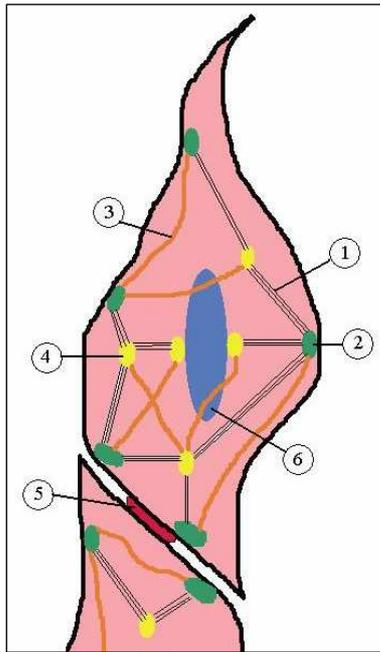


Abb. 1.1.1 Aufbau einer Glattmuskelzelle. Die glatte Muskelzelle hat zwei Filamentsysteme. Sie sind miteinander durch *dense bodies* und subsarkolemmale *dense plaques* verbunden. Die Kraftübertragung erfolgt von den *dense plaques* über Integrine, welche die Plasmamembran durchspannen. Außen binden sich diese an verschiedene extrazelluläre Komponenten. Die funktionelle Koppelung erfolgt über *gap junctions*. (1) Kontraktile Apparate aus Aktin- und Myosinfilamenten, (2) *dense plaques*, (3) Desmin, (4) *dense bodies*, (5) *gap junction*, (6) Zellkern.

Aufgrund der Tatsache, dass die Glattmuskelzellen weniger Myosin enthalten als die Skelettmuskelzellen und die kontraktile Einheiten auch nicht in so hoch organisierten Strukturen wie den Sarkomeren vorliegen, erfolgt die Muskelkontraktion meistens langsam, dafür jedoch oft lang anhaltender. Diese strukturellen Unterschiede spiegeln sich auch in einem funktionellen Unterschied in der Calciumregulation der Kontraktion wieder.

In Skelettmuskeln wird die Calcium-regulierte Aktivität durch den Troponin-Komplex vermittelt. Durch diesen Komplex wird bei Erhöhung des Calciumspiegels das Tropomyosin auf dem Aktinfilament verschoben, so dass nun Myosinköpfe mit dem Aktinfilament interagieren können, was zur Kontraktion des Muskels führt [Bremel et al., 1973; Gordon et al., 2000; Potter et al., 1995]. Im Glattmuskel läuft prinzipiell der gleiche Mechanismus ab, nur dass hier das Protein Calmodulin die Rolle des Troponin C übernimmt. Wenn dieses Protein Ca^{2+} -Ionen bindet, interagiert es seinerseits als Ca-Calmodulin mit dem Enzym MLCK (*myosin light chain kinase*). Dies führt dazu, dass die Kinase eine der leichten Ketten des Myosinmoleküls phosphoryliert, wodurch das Myosin eine veränderte Konformation einnimmt, in der es Tropomyosin von seiner Bindestelle am Aktin verdrängen kann. Dadurch wird nun der Querbrückenzyklus zwischen Aktin und Myosin ermöglicht [Sobieszek, 1977; Dabrowska et al., 1978].

Darüber hinaus sind weitere Regulationsmechanismen durch Calponin und Caldesmon bekannt [Gimona et al., 1990; Sobue et al., 1981, Frid et al., 1992, Takahashi et al., 1986]. Caldesmon bindet an Aktin und inhibiert die Aktomyosin-ATPase-Aktivität. Dies geschieht

durch Blockierung der Bindestellen für Myosin am Aktinfilament [Bartegi et al., 1990]. Ca-Calmodulin interagiert mit Caldesmon, wodurch eine Proteinkinase aktiviert und Caldesmon phosphoryliert wird. Dadurch wird seine inhibitorische Wirkung aufgehoben und die Bindestellen für Myosin freigegeben [Smith et al., 1987]. Man sieht, dass trotz einiger Detailunterschiede deutliche Ähnlichkeiten bei der Regulation der dünnen Filamente in Glatt- und Skelettmuskulatur gibt.

1.2 Aktin

Aktin ist ein hochkonserviertes Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt [Vandekerckhove & Weber, 1978]. Es ist, wie bereits erwähnt, ein Hauptbestandteil des Cytoskeletts und spielt eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen wie Muskelkontraktion und Zellmotilität. Es ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in eukaryotischen Zellen. Entdeckt wurde Aktin im Jahre 1942, wobei es aus Kaninchenmuskeln aufgereinigt und charakterisiert wurde [Straub, 1942]. Aktin aus Nichtmuskelzellen wurde erst wesentlich später nachgewiesen [Hatano & Oosawa, 1966]. Inzwischen sind mehrere Isoformen des Aktins bekannt, die in unterschiedlichen Organismen und Geweben gefunden wurden [Sheterline & Sparrow, 1994; Khaitlina, 2001]. Diese Proteine werden von einer Genfamilie codiert, wobei bei Mammaliern sechs Varianten existieren, die sich nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden und gewebespezifisch exprimiert werden; funktionell werden diese Isoformen in α -, β - und γ -Aktine unterschieden. Dabei kommen α -Aktine jeweils in Skelett-, Glatt- und Herzmuskulatur vor, β -Aktine findet man in Nichtmuskelzellen und Glattmuskelzellen, γ -Aktine nur in Nichtmuskelzellen [Vandekerckhove & Weber, 1978]. Die geringen Unterschiede zwischen den verschiedenen Aktin-Isoformen liegen im N-terminalen Bereich der Proteine [Hightower & Meagher, 1986]. Das Protein ist so hoch konserviert, dass sich seine Existenz bis auf die Entstehung des eukaryotischen Lebens vor ca. 2 Milliarden Jahren zurückverfolgen lässt [Doolittle, 1992]. Selbst ein Vergleich von Algen-Aktin und Menschen-Aktin liefert nur einen Sequenzunterschied von 15 %. Die zentrale Bedeutung des Aktins spiegelt sich auch darin wieder, dass für jedes bekannte Aktin-Gen diverse Erbkrankheiten im Falle einer Mutation dokumentiert sind. Zu diesen gehören diverse Erkrankungen der Muskulatur, inklusive Herzerkrankungen, aber auch so verschiedene Syndrome wie Anfälligkeit für Aortenaneurismen und Störungen der Sinnesorgane [Olson et al., 1998; Kaindl et al., 2004; Guo et al., 2007].

1.2.1 Monomeres Aktin (G-Aktin)

Liegt Aktin als einzelnes Molekül (Monomer) vor, wird es als G-Aktin (globuläres Aktin) bezeichnet und hat ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa (375 Aminosäuren bei Muskelaktinen und 374 Aminosäure bei Nichtmuskelaktinen). Aktin besitzt eine globuläre Struktur, die räumliche Ausdehnung beträgt dann 5,5 x 5,5 x 3,5 nm [Bremer & Aebi, 1992]. Untersuchungen des Aktinmoleküls mit Hilfe der Röntgenkristallographie ergaben, dass das Aktin aus fast gleich großen Domänen besteht, die ihrerseits wiederum in zwei Subdomänen unterteilt werden können [Kabsch et al., 1990; Kabsch & Vandekerckhove, 1992; McLaughlin et al., 1993]. Hauptdomäne 1 besteht aus den AS 1-144 und 338-375 und umfasst die Subdomänen 1 und 2, während die Hauptdomäne 2, die aus den AS 145-337 besteht, die Subdomänen 3 und 4 umfasst. Sowohl der N- als auch der C-Terminus sind in Domäne 1 lokalisiert. Zwischen den beiden Hauptdomänen bildet sich ein Spalt, in dem Bindestellen für divalente Kationen, sowie für Nucleotide enthalten sind [Carlier, 1991; Kinosian, 1993]. Das Kation wird über Aminosäurereste des Aktins sowie Phosphatgruppen des gebundenen Nucleotids in einer Koordinationsbindung fixiert. [Valentin-Ranc & Carlier, 1989; Kabsch, 1990]. Das Nucleotid stabilisiert durch Wasserstoffbrücken- sowie Ionenbindungen das Aktinmolekül. Entfernung des Nucleotids führt zur Denaturierung [Kabsch & Vandekerckhove, 1992; Holmes & Kabsch, 1991]. Die Nucleotidbindestelle wird durch ATP oder ADP besetzt. ATP bindet entweder als Komplex mit Mg^{2+} oder Ca^{2+} [De la Cruz, 1995; Strzelecka, 2001]. Darüber hinaus kann Aktin auch noch durch weitere Bindestellen mit niedriger Affinität sowohl ein- als auch zweiwertige Kationen binden. Diese spielen eine Rolle bei der durch erhöhte Salzkonzentrationen induzierten Aktivierung der Monomere, die dann Bindungen mit anderen Monomeren eingehen können [Carlier, 1991; Pollard, 1990; Dos Remedios & Barden, 1983]. Bindestellen für diese Aktin-Aktin-Wechselwirkungen finden sich in Subdomäne 1 und Subdomäne 4 [Kabsch et al., 1990; Kabsch & Vandekerckhove, 1992].

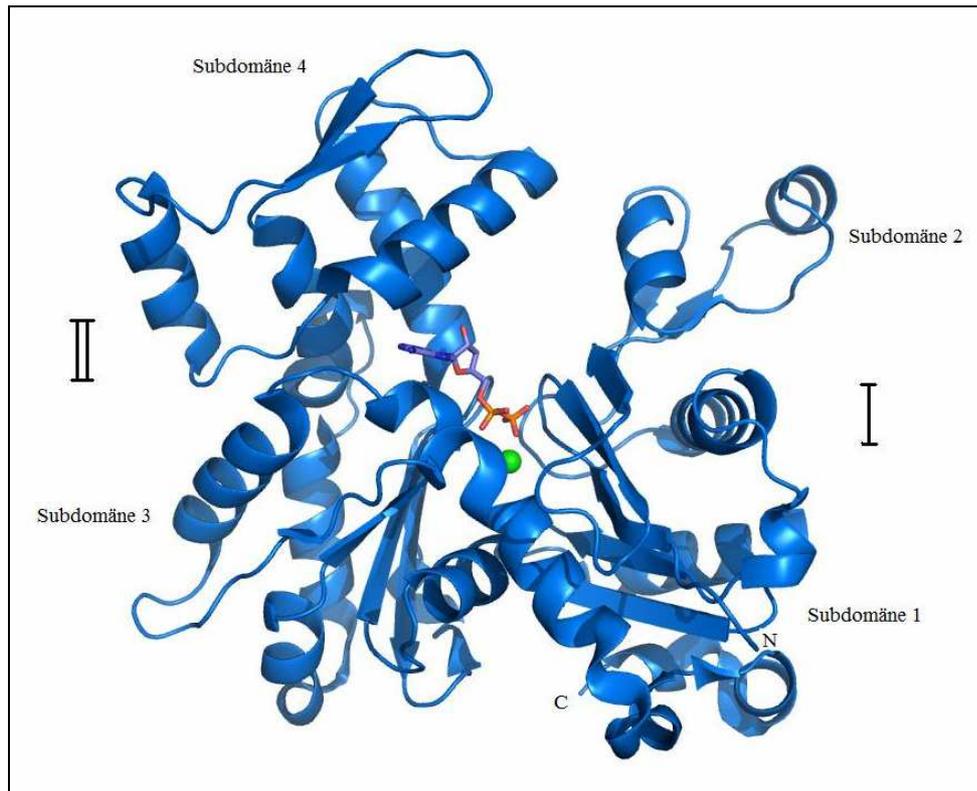


Abb. 1.2.1 Struktur des G-Aktin-Moleküls. Gezeigt ist ein G-Aktin mit seiner Unterteilung in die beiden Hauptdomänen I und II, sowie seiner Subdomänen 1-4. In Subdomäne 1 sind der N- und der C-Terminus des Proteins zu erkennen. Im Spalt zwischen den beiden Hauptdomänen in der Mitte des Moleküls sind ein ADP-Molekül als gebundenes Nucleotid, sowie ein gebundenes Kation als grüne Kugel zu erkennen. [Darstellung mit Hilfe der RasMol-Software unter Verwendung von PDB Code 1j6z]

1.2.2 Aktin-Filamente (F-Aktin)

Unter physiologischen Bedingungen polymerisieren freie G-Aktin Monomere leicht zu langen Aktinfilamenten, die auch als filamentöses Aktin bezeichnet oder kurz F-Aktin genannt werden [Pollard & Cooper, 1986; Holmes & Popp, 1990]. Ist die Zelle jedoch nicht aktiviert, wird die spontane Polymerisation durch Monomer-bindende Proteine inhibiert [Dos Remedios et al., 2003]. F-Aktin ist die eigentliche funktionell aktive Form im Innern einer Zelle. Das Aktinfilament bildet als Struktur eine rechtsgängige Doppelhelix mit einem Umgang von 72 nm mit 370 Untereinheiten pro Mikrometer [Steinmetz et al., 1997; Amann & Pollard, 2001]. Die Aktinfilamente haben einen Durchmesser von 6 - 10 nm [Milligan et al., 1990] bei einer maximalen Länge von 5 - 10 μm *in vitro* nach Einstellung des Gleichgewichtszustands [Rickard & Sheterline, 1988]. 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 sog. Plusende des Filaments wird von den Subdomänen 3 und 4

gebildet [Bremer & Aebi, 1992]. Die Anlagerung von weiteren G-Aktinen erfolgt an diesem Ende des Filaments schneller als am anderen, welches als Minus-Ende bezeichnet wird.

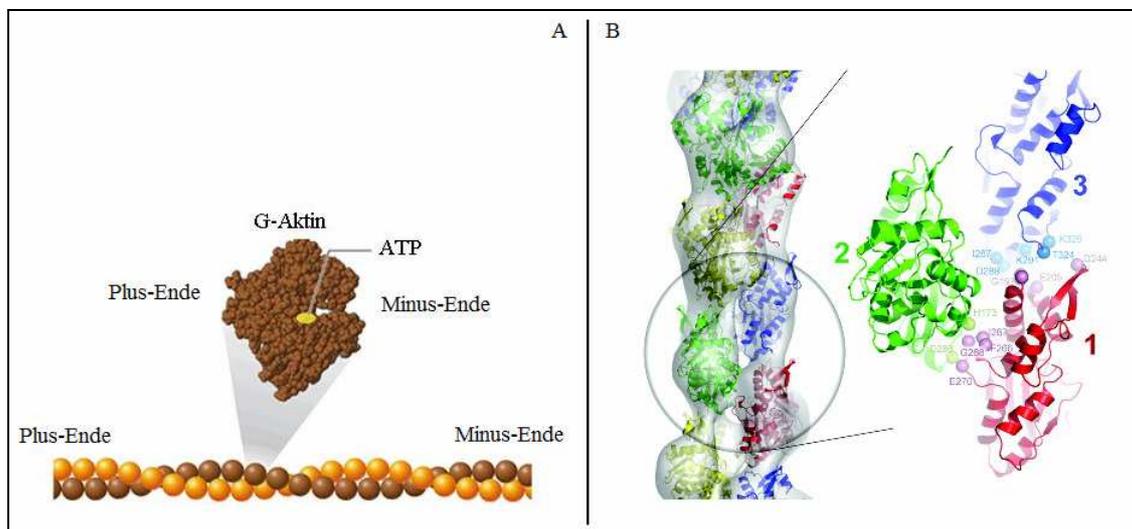


Abb. 1.2.2 Struktur von F-Aktin. (A) Schematische Darstellung eines Aktinfilaments und eines einzelnen hervorgehobenen G-Aktins. Da das G-Aktin ein polares Molekül ist, überträgt sich diese Polarität bei Bildung eines Filaments auf das F-Aktin, welches dadurch sein Plus- und Minus-Ende erhält. Im F-Aktin Molekül wiederholt sich eine Helixwindung alle 36 nm. (B) Dargestellt ist ein F-Aktin-Filament mit mehreren farbigen hervorgehobenen G-Aktin-Untereinheiten. In der Vergrößerung sieht man eine Detailansicht von drei G-Aktin-Monomeren im Filament. Aminosäurereste, die an der Interaktion der Monomere beteiligt sind, sind gekennzeichnet. (Abb. modifiziert nach [Kudryashov et al., 2005].)

Die Polymerisation von F-Aktin verläuft in einem mehrstufigen Prozess, der als „*self assembly*“ bezeichnet wird und in drei Phasen abläuft [Pollard & Cooper, 1986]. In der ersten Phase (Nukleationsphase), werden die G-Aktin-Monomere durch eine Erhöhung der Salzkonzentration aktiviert. Dabei kommt es zur Anlagerung von Kationen an Bindestellen mit niedriger Affinität zu ATP/ADP-G-Aktin, wodurch eine Konformationsänderung ausgelöst wird [Carrier, 1991]. Nach Aktivierung der Monomere kommt es zur Ausbildung von Nukleationskeimen. Die Nukleationskeime bestehen aus Aktin-Trimeren und bilden die kleinste stabile Einheit aus der ein F-Aktin-Filament bestehen kann. Bei diesem Vorgang handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Polymerisation, da es sich um eine thermodynamisch ungünstige Reaktion handelt, die nur mit einer recht geringen Wahrscheinlichkeit in einer gewissen Zeiteinheit abläuft (drei Monomere müssen praktisch zeitgleich miteinander in der Lösung interagieren). Dies ist auch die Ursache für die Verzögerungsphase in der Polymerisationskinetik [Pollard & Cooper, 1986]. Die Polymerisationsgeschwindigkeit ist auch von der Art des gebundenen Nucleotids abhängig. ATP-G-Aktin bildet schneller Trimere als ADP-G-Aktin. Des Weiteren sind die gebildeten

Aktin-Trimere in Mg^{2+} -haltigen Lösungen stabiler als in Ca^{2+} -haltigen, was zeigt, dass auch die Art des gebundenen divalenten Kations eine Rolle spielt.

Die nächste Phase der F-Aktin-Polymerisation ist die Elongationsphase. Dabei werden rasch Monomere an beide Enden des Polymers angelagert. Dieser Vorgang dauert so lange an, bis die Konzentration von freien Aktin-Monomeren unter die kritische Konzentration fällt. Ist dieser Punkt erreicht, stellt sich ein Fließgleichgewicht (*steady state*) ein. In diesem Zustand geschieht die Assoziation und Dissoziation der Monomere gleich schnell. Da es sich bei dem Fließgleichgewicht um einen dynamischen Zustand handelt, bei dem die Länge der Filamente sich lediglich im statistischen Mittel nicht mehr ändert, werden trotzdem ständig Monomere an das Filament angelagert und wieder abgespalten. Dabei weisen die Aktinfilamente eine strukturelle Polarität auf. Die Wachstumsrate ist am Plusende (auch „*barbed end*“) höher als am Minusende (auch „*pointed end*“) [Pollard & Cooper, 1986]. Die kritische Konzentration ist für die beiden Enden des Filaments unterschiedlich, sie beträgt für das Plusende ca. $0,1 \mu M$ und für das Minusende $0,7 \mu M$ [Amann & Pollard, 2000; Wegner, 1976]. Neben der Konzentration an G-Aktin, dem pH-Wert der Lösung und der Temperatur, ist die kritische Konzentration von der Art des gebundenen Kations und des Nucleotids sowie deren Konzentrationen abhängig [Gershman, 1989; Oosawa, 1983]. Diese Eigenschaften führen dazu, dass im Gleichgewichtszustand mit gleicher Geschwindigkeit Monomere am Plusende angefügt werden, wie am Minusende abgebaut werden. Die Länge des Filaments bleibt dabei konstant. Bei diesem als Tretmühlen- („*treadmilling*-,) Prozess bezeichneten Vorgang wird ATP-G-Aktin am Plusende in das Filament eingebaut und als ADP-G-Aktin am Minusende wieder entlassen. Nach einem Austausch von ADP gegen ATP kann das G-Aktin erneut assoziieren [Wegner, 1982]. Bedingt durch die ATPase-Aktivität des Aktins kommt es während der Anlagerung von G-Aktin an das Plusende des Filaments zur Hydrolyse des gebundenen ATP. Durch die Freisetzung des Phosphations wird die Aktin-Aktin-Wechselwirkung im Polymer destabilisiert, wodurch die Dissoziation von Monomeren vom Minusende erleichtert wird [Carlier, 1991]. Der Ablauf dieses dynamischen Gesamtprozesses wird durch eine Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen beeinflusst, die wiederum durch unterschiedliche Faktoren feinreguliert werden können.

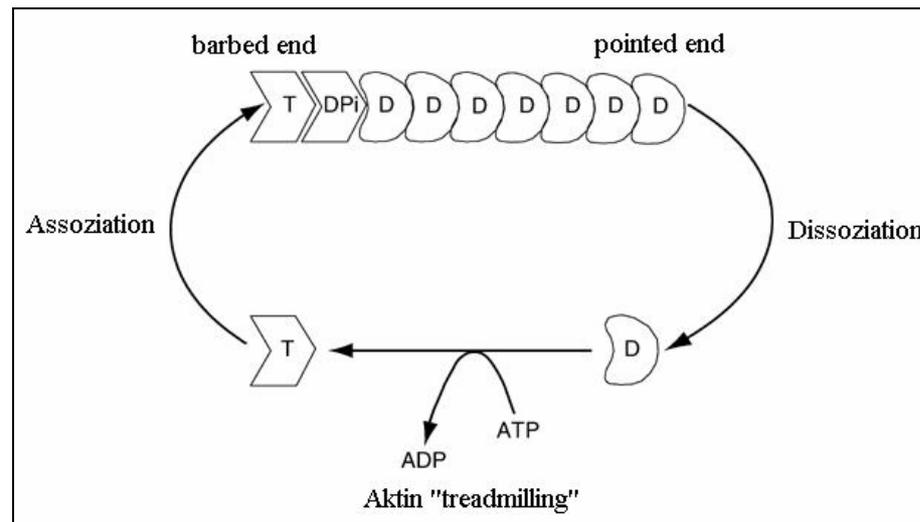


Abb. 1.2.3 F-Aktin im Fließgleichgewicht. Gezeigt ist die (De-)Polymerisation im dynamischen Gleichgewichtszustand und der Tretmühlen-Mechanismus. Ein T weist auf ATP/Aktin, ein D auf ADP/Aktin hin. Pi steht für anorganisches Phosphat. [In Anlehnung an: Hertzog & Carlier, 2005]

1.3 Aktin-bindende Proteine

Aktinfilamente sind in eukaryotischen Zellen für eine Vielzahl von Prozessen verantwortlich, die sowohl räumlich als auch zeitlich reguliert und aufeinander abgestimmt werden müssen. Dafür muss das Aktinfilament-System ständig umstrukturiert werden, da nur so Vorgänge wie eine gerichtete Zellbewegung geordnet ablaufen können [Welch et al., 1997]. Der Umbau des F-Aktins wird in der Zelle sowohl durch die Konzentrationen verschiedener Ionen als auch durch Aktin-bindende Proteine (ABPs) reguliert [Carlier & Pantaloni, 1997]. Dabei ist die cytosolische Calcium-Konzentration von besonderer Bedeutung, da viele Aktin-modulierende Proteine und auch diverse *second messenger* bei Signaltransduktionsvorgängen durch Ca^{2+} aktiviert werden können. Die Aktin-bindenden Proteine werden aufgrund ihrer verschiedenen Eigenschaften als auch der durch sie ausgeführten Funktionen in einige Untergruppen eingeteilt. Es sind inzwischen mehr als 80 verschiedene Typen von ABPs bekannt [Pollard, 1994]. Die Unterteilung der Aktin-bindenden Proteine geschieht meistens in sieben Gruppen [Dos Remedios, 2003; Stossel et al., 1985; Vandekerckhove, 1990; Hartwig & Kwiatkowski, 1991; Pollard, 1992; Weeds & Maciver, 1993; Schleicher et al., 1995; Sun, 1995]:

1. Monomer-bindende Proteine: Diese Proteine binden an G-Aktin und unterdrücken oder verhindern die Polymerisation zu F-Aktin.
2. Filament-depolymerisierende Proteine: Sie sorgen für eine Depolymerisation von F-Aktin zu G-Aktin-Monomeren.

3. Filamentenden-bindende Proteine (Capping-Proteine): Diese Proteine blockieren die Enden von Aktinfilamenten und verhindern so einen Austausch von Monomeren. Zu diesen Proteinen gehört z.B. Gelsolin.
4. Quervernetzende Proteine: Sie enthalten meist zwei Bindestellen für F-Aktin und können so Filamente bündeln, verzweigen oder aus ihnen dreidimensionale Netzwerke aufbauen.
5. Filament-fragmentierende (Schneide-) Proteine: Bekanntester Vertreter dieser Gruppe ist das Gelsolin. Es verkürzt Filamente durch Bindung an und Zerschneiden von F-Aktin.
6. Stabilisierende Proteine: Diese Proteine binden seitlich an ein F-Aktin-Filament und stabilisieren es auf diese Weise. Außerdem verhindern oder erschweren sie dadurch ein Depolymerisieren des Filaments. Hierzu gehört z.B. Tropomyosin.
7. Motorproteine: Sie nutzen die aus ATP-Hydrolyse gewonnene Energie um sich selbst oder auch weitere mit ihnen verbundene Stoffe entlang eines Aktinfilaments zu bewegen. Zu dieser Gruppe gehören vor allem die Myosinproteine.

Wie aus der Aufstellung ersichtlich ist, gibt es auch einige Proteine, wie z.B. Gelsolin, die mehrere Funktionen in der Zelle wahrnehmen und daher nicht eindeutig in eine Gruppe eingeordnet werden können [Weeds & Maciver, 1993; Carlier & Pantaloni, 1997; Hartwig & Kwiatkowski, 1991].

1.4 Gelsolin

Gelsolin ist ein Aktin-bindendes Protein, welches eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Auf- und Abbaus von Aktinfilamenten spielt. Gelsolin ist eines der aktivsten Mitglieder der Gruppe der Filament-schneidenden Proteine und Namensgeber der Gelsolin-Superfamilie der Aktin-schneidenden Proteine [Sun et al., 1999]. Es wurde erstmalig 1979 aus Makrophagen isoliert und charakterisiert [Yin & Stossel, 1979]. Gelsolin kommt sowohl intrazellulär (im Cytosol und in Mitochondrien) als auch extrazellulär im Blutplasma vor, wo es der Polymerisation von freiem Aktin entgegenwirkt, das aus zugrunde gegangenen Zellen stammt [Lee & Galbraith, 1992; Kwiatkowski et al., 1999]. Dabei kommt das Gelsolin an verschiedenen Stellen in verschiedenen Spleißvarianten vor. Die im Blutplasma vorkommende extrazelluläre Isoform unterscheidet sich von der cytosolischen Isoform durch

eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 188 und 201 [Wen et al., 1996] und durch zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus des Proteins. Die Länge dieser Extension ist von Art zu Art verschieden. Beim Menschen sind es 25 zusätzliche Aminosäuren [Kwiatkowski et al., 1986].

Das cytosolische Gelsolin mit dem in dieser Arbeit gearbeitet wurde, ist ein globuläres Protein (85 x 36 x 55 Å) mit einem Molekulargewicht von ca. 81 kDa, das aus 6 homologen Segmenten, die als S1-S6 bezeichnet werden, besteht. Insgesamt ist es aus 755 Aminosäuren aufgebaut. Jedes Segment besteht aus einem 5-strängigem β -Faltblatt, welches von 2 α -Helices flankiert wird. Eine der beiden Helices steht senkrecht, die andere parallel zum β -Faltblatt. Das Gesamtprotein bildet wiederum zwei homologe Hälften, welche aus den Domänen S1-S3 und S4-S6 bestehen. Zwischen den beiden Hälften liegt eine so genannte Linkerregion [Kwiatkowski et al., 1986; Burtnick et al., 1997; Burtnick et al., 2001]. In dieser Linkerregion gibt es eine Proteaseschnittstelle für Caspase-3, durch die das Protein selektiv in seine beide Hälften gespalten werden kann [Kothakota et al., 1997; Kamada et al., 1998].

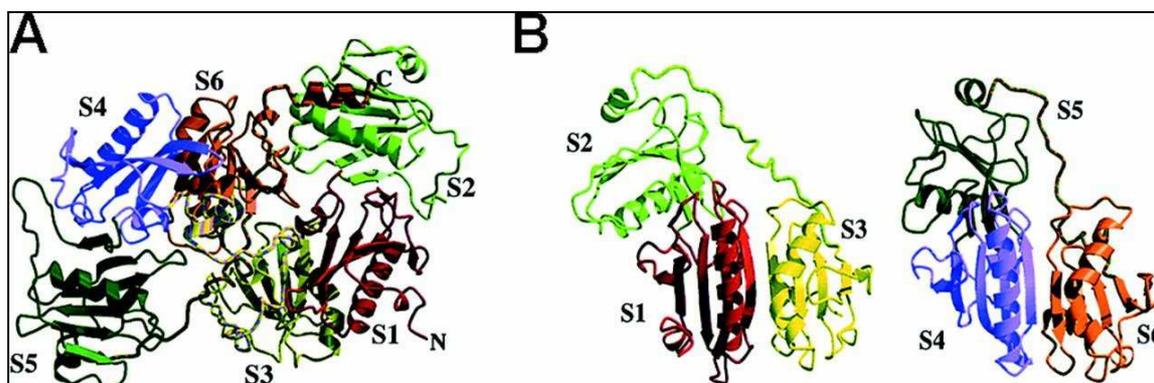


Abb. 1.4.1 Strukturmodell von Gelsolin. Gezeigt ist die Struktur von Gelsolin bei Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen. (A) Gezeigt ist das Gesamtmolekül mit seinen 6 Domänen. Der N- und der C-Terminus sind beschriftet. (B) Diese Darstellung zeigt die beiden homologen Gelsolinhälften bei vergleichbarer räumlicher Orientierung, um sowohl die Gemeinsamkeiten, als auch die Unterschiede besser erkennen zu können. [Modifiziert nach Sun et al., 1999].

Trotz der Homologie der sechs Gelsolindomänen unterscheiden diese sich doch deutlich in ihren biochemischen Eigenschaften und sind für sehr unterschiedliche Funktionen verantwortlich [Chaponnier et al., 1986; Bryan, 1988]. Das C-terminale Ende ist für die Detektion der intrazellulären Calciumkonzentration verantwortlich, was für die Regulierung des Gesamtproteins wichtig ist, da die Aktivität von Gelsolin durch Calciumionen stimuliert wird. Obwohl die Grundkonformation der einzelnen Subdomänen bei veränderter Ca^{2+} -

Konzentration prinzipiell gleich bleibt, bewegt sich der „Tail“ hinter der Subdomäne S6, so dass dieser eine Schalterfunktion ausüben kann. Wenn die Calciumkonzentration niedrig ist, blockiert S6 die F-Aktin-Bindungsstellen auf einer α -Helix der Domäne S2. Wenn sich jedoch ein Ca^{2+} -Ion an die Tail-Region von S6 bindet, durchläuft diese Subdomäne eine Konformationsänderung und gibt die Bindungsstellen frei [Yu et al., 1992]. Die N-terminale Hälfte kann Ca^{2+} -unabhängig zwei Aktinmoleküle binden, die C-terminale Hälfte bindet hingegen ein Aktinmonomer in Gegenwart von Calcium [Sun et al., 1999]. Die Bindestelle für Aktinmonomere befindet sich in S1, während Domäne S2 eine F-Aktin-Bindestelle besitzt [Way et al., 1989; Sun et al., 1994]. Die C-terminale Hälfte bindet G-Aktin mit der Domäne S4. Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Hälften besteht darin, dass die N-terminale Hälfte in der Lage ist, Ca^{2+} -unabhängig Aktinfilamente zu fragmentieren. Hierfür sind die beiden Domänen S1 und S2 verantwortlich [Way et al., 1992]. Diese Aktivität spielt physiologisch eine Rolle, da während der Apoptose einer Zelle, Gelsolin durch Caspase-3 an der bereits erwähnten Schnittstelle in der Linkerregion in seine beiden Hälften gespalten wird [Kothakota, 1997]. Dies führt dann dazu, dass die N-terminale Gelsolinhälfte (S1-S3) unkontrolliert F-Aktin fragmentiert, was schließlich zur Degradierung des Mikrofilamentsystems führt, wodurch die Zelle ihre definierte Gestalt verliert und eine kugelige Form annimmt. Dieser Vorgang kann gut mikroskopisch beobachtet werden.

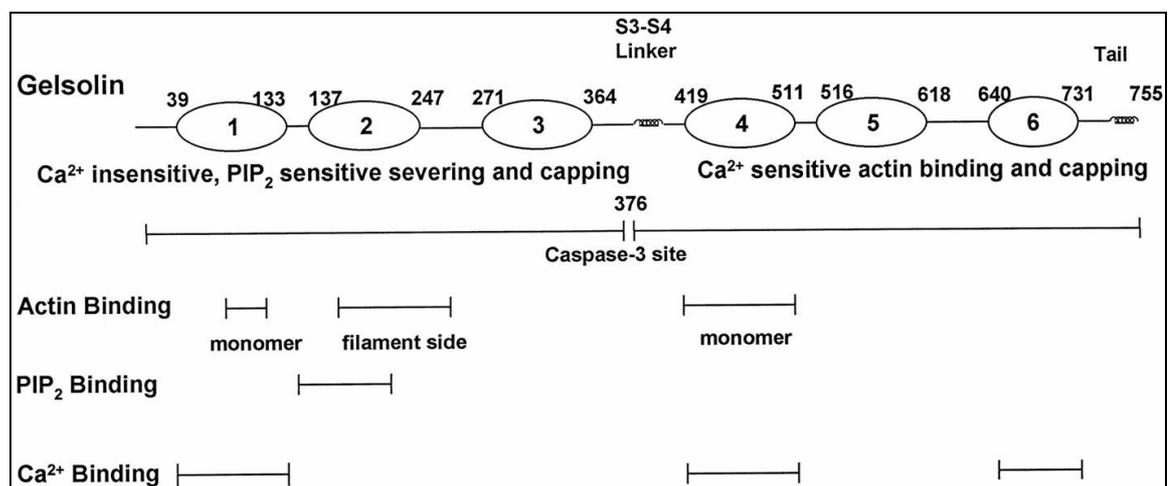


Abb. 1.4.2 Funktionelle Übersicht des Gelsolins. Gezeigt ist die Struktur mit den Domänen S1-S6, sowie die Lage verschiedener Bindestellen [Sun et al., 1999].

Gelsolin übt unter physiologischen Bedingungen mehrere Funktionen in Bezug auf Aktin aus. Dazu gehören die Förderung der Nukleation des Aktins, die Fragmentation von Aktinfilamenten und die Blockierung des Plusendes nach erfolgter Fragmentierung [Yin,

1987]. Aktiviert wird das Gelsolin wie erwähnt durch Bindung eines Ca^{2+} -Ions am C-terminalen Ende des Proteins, was zu einer Aktivierung durch Konformationsänderung führt [Hellweg et al., 1993]. Darüber hinaus wird die Aktivität des Gelsolins noch durch Phosphatidylinositide (z.B. PIP_2), den pH-Wert und durch Phosphorylierung von Tyrosinresten reguliert [Janmey & Stossel, 1987; McLaughlin et al., 1993; Yin & Janmey, 2003]. PIP_2 bindet an die in Abb. 1.4.2 gezeigte Bindestelle in der Domäne S2 und inhibiert die Filamentbindung und dadurch die Fragmentation. Dies liegt daran, dass sich die Bindestellen für F-Aktin und PIP_2 räumlich überschneiden [Janmey et al., 1992; Sun et al. 1994]. Darüber hinaus bewirken Phosphatidylinositide auch eine Ablösung des Gelsolins vom Aktinfilament. Ihre Wirkung ist unabhängig vom pH-Wert. Die Ca^{2+} -Konzentration, die für die Aktivierung des Gelsolins notwendig ist, verringert sich, wenn der pH-Wert von physiologischen Bedingungen zu sauren Bedingungen hin abgesenkt wird. Dies geht so weit, dass bei ausreichend saurem pH-Wert die Calcium-Abhängigkeit der Aktivierung verloren geht. Grundsätzlich unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration erfolgt die Aktivierung von Gelsolin durch Tyrosinkinase [Lamb et al., 1993].

Nachdem Gelsolin auf irgendeine Art und Weise aktiviert wurde, kann es nun entweder G-Aktine binden und die Nukleation fördern, oder F-Aktin binden und Filamente fragmentieren [Schoepper & Wegner, 1991]. Im Fall einer Fragmentation, bindet Gelsolin zunächst lateral mit der Domäne S2 an F-Aktin. Anschließend interagiert die S1-Domäne mit den einzelnen Monomeren und schiebt sich zwischen zwei G-Aktine [Way et al., 1992; Burtnick et al., 1997]. Dabei wird die hydrophobe Wechselwirkung zwischen zwei Aktinmonomeren abgeschwächt, so dass im Aktinfilament ein Bruch entsteht. Nach erfolgter Fragmentierung blockiert das Gelsolin das Plusende des Filaments („Capping“) und verhindert dadurch eine weitere Anlagerung oder Dissoziation von Monomeren. Die einzige bekannte Möglichkeit ein Gelsolinmolekül unter physiologischen Bedingungen wieder vom Filament zu trennen, besteht in der bereits erwähnten Wechselwirkung mit PIP_2 .

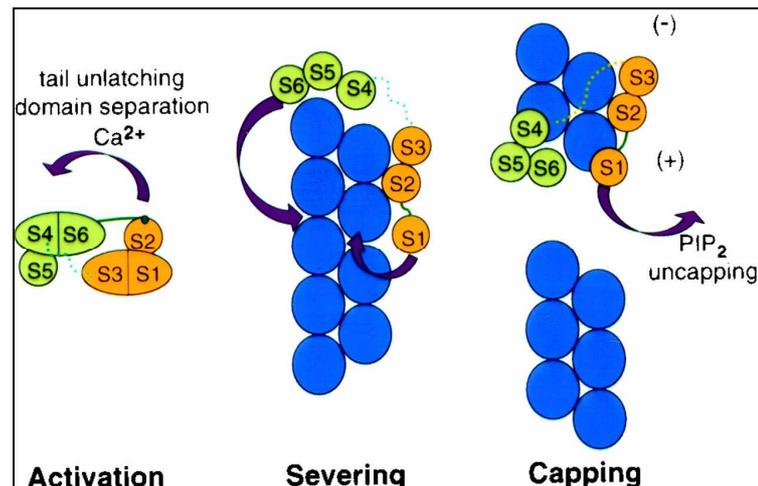


Abb. 1.4.3 Schematisches Modell der F-Aktin-Fragmentation durch Gelsolin. Gezeigt sind die Schritte der Aktivierung, Fragmentation und des Capping des Gelsolins an F-Aktin. [Sun et al., 1999].

Neben der Bindung an Aktin gibt es Hinweise auf weitere Proteine, die durch eine Bindung mit Gelsolin interagieren können. So wurde z.B. für Tropomyosin eine Bindestelle im Bereich der Domäne S2 vorausgesagt [Maciver et al., 2000].

1.5 Tropomyosin

Die Tropomyosine sind eine Gruppe von fadenförmigen Strukturproteinen. Auch sie gehören zu den Aktin-bindenden Proteinen und kommen als Teil des kontraktiven Systems vieler Zellen, sowohl in allen Muskel- als auch in Nichtmuskelzellen vor. Beim Aufbau des Mikrofilamentsystems spielen sie eine Rolle, da sie sich seitlich an Aktinfilamente anlagern können und diese dadurch stabilisieren. Diese Anlagerung an Aktinfilamente spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Muskelkontraktion. Tropomyosin ist ein stabförmiges Protein, das etwa 400 Å lang und 20 Å breit ist. Es hat je nach Isoform eine molekulare Masse von 65-70 kDa und besteht aus zwei α -helicalen Polypeptidketten als Untereinheiten (α und β), wobei es von α drei Isoformen gibt ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ / die Nummerierung hat historische Gründe und ist aus der Bezeichnung der Gene abgeleitet). Jede der beiden Untereinheiten hat ein Molekulargewicht von 33-35 kDa und besteht aus 284 Aminosäuren [Smillie, 1979; Perry, 2001]. Bei Mammaliern gibt es vier Tropomyosingene (TM1, 2, 3, 4). Dabei werden die α -Tropomyosine von TM1, 3 und 4 codiert und β -TM von TM2. Von den verschiedenen α -TMs und dem β -TM gibt es wiederum noch eine Reihe von Spleißvarianten, so dass bis heute etwa 20 Isoformen gibt, die sich aus verschiedenen α - und β -TMs zusammensetzen. Im

Skelettmuskel macht Tropomyosin etwa 3 % des Gesamt-Muskelproteins aus [Pittenger et al., 1994].

Die genaue Zusammensetzung der Heterodimere variiert mit den unterschiedlichen Geweben, aber auch mit der Temperatur. Während bei höheren Temperaturen meist $\alpha\beta$ -Heterodimere bevorzugt gebildet werden, so entstehen bei niedrigen Temperaturen hingegen eher $\alpha\alpha$ - und $\beta\beta$ -Homodimere [Lehrer et al., 1989; Lehrer & Stafford, 1991]. Das Vorkommen der unterschiedlichen Isoformen hängt von der Art, dem Gewebe und dem Entwicklungsstadium ab. In Muskelgeweben kommen $\alpha\beta$ -Heterodimere bevorzugt in langsamen Muskelfasern vor, während man in schnell kontrahierenden Muskelfasern eher $\alpha\alpha$ -Homodimere findet [Smillie, 1979]. In Glattmuskeln findet man hauptsächlich $\alpha\beta$ -Heterodimere, die sich in ihrer Zusammensetzung aber von den entsprechenden Dimeren der Skelettmuskeln unterscheiden [Cummins & Perry, 1974; Cummins & Perry 1973]. Das Vorkommen von $\beta\beta$ -Dimeren ist in allen Muskeltypen recht gering. Messungen haben ergeben, dass die Bindung der einzelnen Peptidketten in Homodimeren schwächer ist als in Heterodimeren, zudem ist die Bindung von Heterodimeren an F-Aktin in der Regel etwas stärker [Jansco & Graceffa, 1991]. Auch diese Faktoren spielen beim Vorkommen in den verschiedenen Geweben eine Rolle hinsichtlich der Tropomyosinfunktion. Beim Aufbau eines Tropomyosindimers lagern sich die beiden Untereinheiten in gleicher Orientierung in einer „coiled-coil Konformation aneinander.

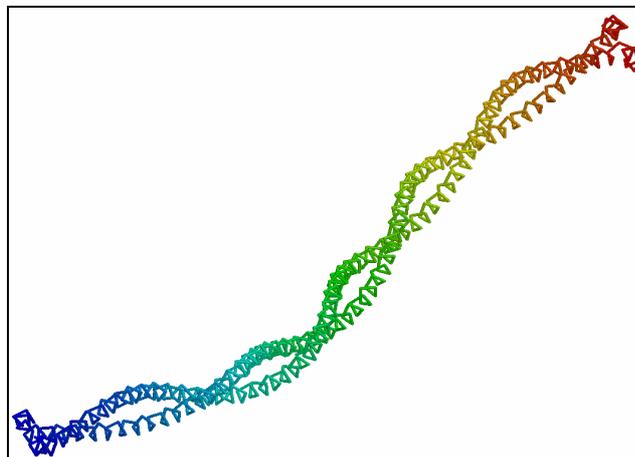


Abb. 1.5.1 Schematische Darstellung eines Tropomyosin-Dimers. Zu erkennen ist die Orientierung der beiden Polypeptidketten, die fast vollständig aus einer α -Helix bestehen, bei der Bildung eines Dimers. Dabei ist das N-terminale Ende jeweils rot und das C-terminale Ende blau gefärbt. Des Weiteren sieht man die entstehende coiled-coil-Struktur des Dimers. [Darstellung: RasMol mit PDB Code 2tma]

Entlang eines Aktinfilaments sind viele Tropomyosine hintereinander angelagert, die das F-Aktin kontinuierlich umlaufen und so ihrerseits ein Filament bilden. Dabei lagern sich die

einzelnen Tropomyosindimere nach dem Kopf-Schwanz-Prinzip aneinander, wobei je nach Isoform 8-9 Aminosäuren zwischen dem N-Terminus des einen und dem C-Terminus des anderen Moleküls überlappen [McLachlan & Steward, 1975]. Aufgrund dieser Überlappung unterscheidet sich die scheinbare Länge eines an ein Filament gebundenen Tropomyosinmoleküls (406 Å) von der eines freien Moleküls (423 Å) [Philipps et al., 1986; Smillie, 1977]. Durch verschiedene Messungen konnte gezeigt werden, dass sich Tropomyosin in der Art in der Furche eines Aktinfilaments anlagert, dass jedes Tropomyosin sieben Aktinmonomere bindet [Moore, 1970; Dabrowska, 1996].

1.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Wechselwirkungen zwischen den beschriebenen Proteinen Aktin, Gelsolin und Tropomyosin weiter charakterisiert werden. Dadurch soll geklärt werden, wie diese Proteine sich beim Auf- und Umbau des Aktinfilamentsystems gegenseitig beeinflussen. Dabei wird zunächst untersucht, wie Gelsolin und Tropomyosin durch ihre Funktionen das F-Aktin beeinflussen. Beide Proteine sind in der Lage an F-Aktin zu binden, wobei Gelsolin bestehende Filamente schneidet und blockiert und Tropomyosin durch Anlagerung an F-Aktin die bestehenden Filamente stabilisiert. Wie sich diese Eigenschaften verändern, wenn die beiden Aktin-bindenden Proteine Gelsolin und Tropomyosin miteinander interagieren, soll durch verschiedene Messungen geklärt werden. Andere Studien haben gezeigt, dass Gelsolin in der Zelle vorwiegend in der Nähe von Aktinfilamenten lokalisiert ist. Da die Aktinfilamente in der Zelle immer mit Tropomyosin gemeinsam auftreten, welches sich an die Filamente anlagert, ist häufig die Situation gegeben, dass sich Gelsolin und Tropomyosin beide in unmittelbarer Nähe zu den Aktinfilamenten befinden, dass Gelsolin aber nicht F-Aktin fragmentiert. Dies könnte ein erster Hinweis auf eine die Aktivität von Gelsolin modulierende Funktion von Tropomyosin sein. Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen sind in anderen Arbeiten bereits beschrieben worden [Koeppf & Burtnick, 1992; Maciver et al., 2000]. Wie diese Interaktion zu Stande kommt und welche Auswirkungen sie hat, ist aber noch unklar. Im Mittelpunkt der Arbeit stehen Untersuchungen der Proteine aus der glatten Muskulatur. Um eventuell nachweisbare Bindungen der Proteine zueinander besser charakterisieren zu können, werden neben Messungen mit präparierten Wildtyp-Proteinen auch eine Reihe von Untersuchungen mit Deletionsmutanten des Gelsolins und des Tropomyosins durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Gewebe

Skelett- und Glattmuskel vom Hausschwein (*sus scrofa*) wurden vom Schlachthof Gausepohl, Harsewinkel bezogen. Kaninchen zur Gewinnung von Skelettmuskeln wurden aus einer Kaninchenschlachtereie bezogen.

2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, werden Chemikalien der Qualität p.A. von den Firmen Sigma, Roche, Fluka, Roth oder Merck bezogen.

2.1.3 Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase	Roche
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4-Ligase	Invitrogen
RNase-Inhibitor	Roche
Taq DNA-Polymerase	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	NEB

2.1.4 Antibiotika

<i>Antibiotikum</i>	<i>Stammlösung</i>	<i>Arbeitslösung</i>
Ampicillin	100 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
Tetracyclin	12,5 mg/ml in Ethanol	12,5 µg/ml

2.1.5 *E. coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F^+ , $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, $recA1$, $endA1$, $hsdR17$ (r_k^- , m_k^+), $phoA$, $supE44$, thi^- , $gyrA96$, $relA1$, λ^-	Invitrogen 2003
XL1-Blue	$recA1$, $endA1$, $gyrA96$, thi^- , $hsdR17$, $supE44$, $relA1$, $lac[F'proAB lacI^q\Delta M15Tn10(Tet^r)]$	Stratagene 2002
BL21(DE3) CodonPlus RIPL	F^- , b , $ompT$, $hsdS(f_{BM}^-)$, dcm^+ , tet^r , $gal\lambda(DE3)$, $endA$, $hte[argU, proL, cam^r]$, $[argU, ileY, leuW, strep/spec^r]$	Jerpseth et al. 1998

2.1.6 Plasmide und Vektoren

Plasmid / Vektor	Art des Plasmids / Vektors	Hersteller
pBluescript KS	Klonierungsvektor	Stratagene
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Klonierungsvektor	Invitrogen
pET100-TOPO [®]	Expressionsvektor	Invitrogen
pGEM [®] -T Easy	Klonierungsvektor	Operon
pET21a(+)	Expressionsvektor	Invitrogen

2.1.7 Verwendete Kits

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
High Pure RNA Tissue Kit	Reinigung von Gesamt-RNA	Roche
Oligotex mRNA Mini Kit	Isolierung von mRNA	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Qiagen
NucleoBond [®] PC 100	Plasmidpräparation (Midi-Prep)	MN
NucleoSpin [®] Plasmid	Plasmidpräparation (Mini-Prep)	MN
MinElute Gel Extraction Kit	Extraktion von DNA aus Gelen	Qiagen

2.1.8 Protein-Molekularmassenmarker und DNA-Längenmarker

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Molmassenstandards verwendet. Der HMW-Marker (*high molecular weight*, 29 kDa bis 205 kDa) wurde von der Firma Sigma bezogen. Des weiteren wurde auch ein Marker verwendet, der aus im Labor präparierten Proteinen selbst zusammengemischt wurde. Dieser enthielt folgende Proteine: CapZ α 1-UE (36 kDa), Aktin (42 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Gelsolin (81 kDa), α -Actinin (100 kDa), Vinculin (117 kDa), Metavinculin (125 kDa), die schwere Kette des Myosins (205 kDa) und Filamin (280 kDa).

Als DNA-Längenstandard wurde der *GeneRulerTM DNA Ladder Mix* der Firma Fermentas verwendet.

2.1.9 Oligonucleotide

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonucleotide sind in der nachfolgenden Tabelle verzeichnet. Alle Oligonucleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>	<i>Annealingtemperatur</i>
pgs-fw	taccaccaccttggtgggctcaagg	67,9 °C
pgs-rev	agtccgtcggtcgagtcgctacc	67,8 °C
gsd2-fw	catatgggtctcaagtacaag	55,9 °C
gsd4-fw	catatgtggagaatcgaagc	57,9 °C
gsd3-rev	aagcttcacacgctccacgttg	64,2 °C
gsd2-rev	aagcttgctcctcagctcctcgg	62,4 °C
gsdf1-rev	aagctttagcctctcataccgattgc	63,2 °C
gsdf2-rev	aagcttgccgaccacacgcc	63,5 °C
gsd3-fw	catatgtacaaggctccaacg	58,4 °C
gsd1-rev	aagcttcaaggaaggtggctg	59,8 °C
tma-fw	gccatatggacgcgatcaagaag	62,4 °C
tma-rev	aagcttagatagaggtcatatcgctcag	62,2 °C
tmaf1-rev	aagcttacgctcgcttcgctcagc	64,4 °C
tmaf2-fw	catatggctgctgacgaaagcgag	64,4 °C
tma101-fw	catatggatgcaaagctcaagctcg	58,4 °C
tma150-fw	catatgcaggcggaggccgataag	59,8 °C

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Herstellung von Schweinemuskel-Acetonpulver

Es wurde zunächst 1 kg Skelettmuskelgewebe des Schweins von Sehnen und Fett befreit und im Fleischwolf zerkleinert. Das entstandene Hackfleisch wurde mit 3 Volumen kaltem Myosinextraktionspuffer (300 mM KCl, 3 mM ATP, 15 mM EDTA, 150 mM Na-phosphat, pH 6,5) versetzt und für 10 min bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde für 40 min bei 5.000 g zentrifugiert, das Pelett noch mal in 2 Volumen Extraktionspuffer resuspendiert und für 20 min bei 5.000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden in 8 Volumen H₂O resuspendiert, 5 min bei 4 °C gerührt und durch Gaze gefiltert. Der Rückstand wurde in 8 Volumen 0,4 % NaHCO₃-Lsg. aufgenommen, 5 min gerührt und durch eine Gaze gefiltert. Danach wurde der Rückstand 5 min bei 5.000 g zentrifugiert. Diese Schritte wurden einmal mit 8 Volumen H₂O und zweimal mit 4 Volumen Aceton wiederholt. Der danach verbliebene Rückstand wurde zerkleinert und in 5 Volumen Aceton aufgenommen, 10 min gerührt und durch Gaze gefiltert. Das Pulver wurde nun zur Trocknung ü/N auf Filterpapier unter den Laborabzug gelegt und danach bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Aufreinigung von Aktin aus der Skelettmuskulatur des Schweins

Skelettmuskel-Aktin vom Schwein wurde aus Aceton-getrocknetem Muskelpulver hergestellt [Spudich & Watt 1971]. Zunächst wurden 5 g Muskelpulver mit 50 Volumen 5xG-Puffer versetzt und 45 min bei 4 °C gerührt. Der entstehende Brei wurde für 1 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der sich bildende Überstand wurde mit 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ versetzt und 30 min bei 20 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Erhöhung der KCl-Konzentration auf 600 mM und die Lösung wurde darauf hin für 3 h bei 100.000 g und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml 5xG-Puffer aufgenommen, in einem Homogenisator resuspendiert und 2 Tage bei 4 °C gegen 20 Volumen 5xG-Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde für 1 h bei 100.000 g und 4 °C klarzentrifugiert und auf eine G-150 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die G-Aktin enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, auf ca. 3-4 mg/ml ankonzentriert und auf Eis gelagert. Das erhaltene Aktin wurde dann entweder lyophilisiert oder innerhalb von 2 Wochen aufgebraucht.

2.2.3 Aufreinigung von Aktin aus der Glattmuskulatur des Schweins

Das Glattmuskel-Aktin vom Schwein wurde aus Aceton-getrocknetem Muskelpulver hergestellt [Spudich & Watt 1971]. Zunächst wurden 5 g Muskelpulver mit 50 Volumen 5xG-Puffer versetzt, mit einem Ultraturrax homogenisiert und 1 h bei 4 °C gerührt. Der entstehende Brei wurde für 2 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der sich bildende Überstand wurde auf ca. 25 ml ankonzentriert für 2 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine G-150 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die G-Aktin enthaltenden Fraktionen wurden durch SDS-PAGE identifiziert und anschließend vereinigt, auf 30 ml ankonzentriert. Die Lösung wurde darauf hin mit 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ und 5 mM EGTA versetzt und für 2 h bei 20 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung für 3 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert, die Pellets in 10 ml 5xG-Puffer aufgenommen und in einem Dounce-Homogenisator resuspendiert. Die Lösung wurde dann 2 Tage bei 4 °C gegen 20 Volumen 5xG-Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde für 2 h bei 100.000 g und 4 °C klarzentrifugiert. Der Überstand enthielt nun das G-Aktin und wurde nun entweder auf Eis gelagert und innerhalb von 2 Wochen aufgebraucht oder lyophilisiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Aufreinigung von Aktin aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens

SKM-Aktin vom Kaninchen wurde aus acetonegetrockneten Muskelpulver (Herstellung wie oben) präpariert [Spudich & Watt, 1971]. Auch die Aufreinigung entsprach der Aktinaufreinigung aus Schweinemuskel. Das so gewonnene monomere G-Aktin wurde entweder in 2xG-Puffer (0,4 mM ATP, 1 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃, 0,4 mM β-Mercaptoethanol, pH 8,2) auf Eis gelagert und innerhalb von 2 Wochen aufgebraucht, oder mit 4 mg/ml Saccharose versetzt, lyophilisiert und bei -80 °C gelagert.

Pyren Aktin: Zur Herstellung von Pyren-Aktin wurde frisch präpariertes G-Aktin mit N-(1-pyrenyl)-iodoacetamid markiert [Kouyama & Mihashi, 1981], lyophilisiert und bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde das Pyren-Aktin in 2xG-Puffer aufgenommen und bei 100.000 g klarzentrifugiert.

2.2.5 Aufreinigung von Gelsolin aus der Glattmuskulatur des Schweins

Zunächst wurden 800 g frisch zerkleinertes Schweinemagen-Muskelgewebe im Fleischwolf zerkleinert. Der entstehende Fleischbrei wurde mit 3 l Puffer 1 versetzt und für 3 min im Mixer verrührt. Die Masse wurde danach für 3 min mit Hilfe des Ultraturrax homogenisiert

und danach für 30 min bei 4 °C in einem Becherglas mit Rührfisch gerührt. Als Nächstes erfolgt eine Zentrifugation für 1 h bei 10.000 g und 4 °C, der Überstand wurde gesammelt. Nach Zugabe von Ammoniumsulfat auf 37% Sättigung bei 0°C lässt man 30 min rühren und anschließend wurde 45 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, das Sediment verworfen. Der Überstand wurde weiter mit Ammoniumsulfat versetzt bis 53 % Sättigung. Dann wurde 45 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in wenig Wasser aufgenommen und mit Puffer 1 auf 250 ml aufgefüllt. Danach wurde mehrfach gegen 5 l Puffer 2 dialysiert (1. 4 h, 2. 8 h, 3. 5 h). Als nächstes wurde 2 h bei 150.000 g zentrifugiert, der Überstand gesammelt und der Überstand verworfen.

Bevor nun die weitere Aufreinigung mit Hilfe diverser Säulen vorgenommen wurde, wurde an dieser Stelle eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Mikro-Biuret-Methode vorgenommen. Als nächstes erfolgt eine Aufreinigung durch die DEAE-Sepharose CL6B Säule, die vorab mit 5 Volumen Puffer 1 äquilibriert wurde. Danach wurde die Probe aufgetragen und 1 h mit Puffer 1 nachgewaschen (600 ml/h), bis ungebundene Proteine eluiert waren. Man lässt dann einen 6 h Gradienten laufen: Startpuffer A 50 mM KCl bis 350 mM KCl (Puffer B) [jeweils Puffer 1 mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen]. Es werden Fraktionen zu je 2:30 min aufgefangen; bei 600 ml/h: ca. 23 ml pro Fraktion. Fraktionen, die einem Schreiberpeak zugeordnet werden können, werden mittels einer SDS-PAGE kontrolliert.

Die Fraktionen im Bereich des Peaks wurden gesammelt (ca. 185 ml) und auf ca. 30 ml aufkonzentriert. Anschließend wurde für 35 min bei 50.000 g klarzentrifugiert. Danach wurde die Sephacryl S-300 HR Säule mit 5 Volumen Puffer 2 äquilibriert (5x 750 ml). Die klarzentrifugierte und aufkonzentrierte Probe wurde mit einer Geschwindigkeit von 33 ml/h aufgetragen. Es wurden Fraktionen zu je 20 min (ca. 11ml) aufgefangen. Die Fraktionen im Bereich des Schreiberpeaks wurden durch SDS-PAGE untersucht.

Als nächstes erfolgte eine Aufreinigung durch eine DEAE-SHR Säule. Diese wurde vorab mit Puffer 3 äquilibriert. Die Probe wurde auf die Säule aufgetragen und mit 4 ml/min eingewaschen. Es wurde ca. 20 min mit Puffer 3 nachgewaschen, bis eine stabile Basislinie erreicht wurde. Danach wurde ein 2 h Gradient mit Puffer 3 von 70 mM KCl bis 350 mM KCl gestartet. Es wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE der Fraktionen im Bereich der Schreiberpeaks.

Die positiv getesteten Fraktionen wurden gesammelt (ca. 35 ml) und anschließend auf 10 ml ankonzentriert. Danach wurde die DEAE-SHR Säule mit Puffer 4 äquilibriert. Die Probe wurde auf die Säule aufgetragen und mit 4 ml/min eingewaschen. Man ließ ca. 20 min mit Puffer 4 nachwaschen bis man eine Basislinie erhielt. Anschließend startete man einen Konzentrations-Gradienten mit Startpuffer 4 von 0,05 – 0,35 M KCl.

Es wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Die Fraktionen im Bereich des Schreiberpeaks wurden zusammen in ein Gefäß gegeben. Darin befand sich nun das gereinigte Gelsolin. Die Reinheit des Proteins wurde durch eine SDS-PAGE kontrolliert, in der verschiedene Mengen der Proteinlösung aufgetragen wurden.

Puffer 1: 20 mM KCl, 7 mM EGTA, 25 mM MgCl₂, 40 mM Imidazol, 2 mM β-Mercaptoethanol, 5 ml Entschäumer Antifoam A, 5 mg/l Leupeptin, 10 mg/l Pepstatin, 20 mg/l TPCK, 1 mM PMSF, 3 g/l Benzamidin, pH 7

Puffer 2: 50 mM KCl, 20 mM Imidazol, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 0,2 mM DTT, 0,2 mM PMSF, pH 7

Puffer 3: 70 mM KCl, 20 mM Imidazol, 0,5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM PMSF, 1 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,2

Puffer 4: 50 mM KCl, 20 mM Imidazol, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 0,2 mM DTT, 0,2 mM PMSF, pH 7,6

2.2.6 Aufreinigung von Tropomyosin aus der Glattmuskulatur des Schweins

Von frischen Schweinemägen wurden zunächst Mucosa, Fett und Bindegewebe entfernt. Danach wurden die Schweinemägen entweder frisch verwendet oder bei -80 °C gelagert. Für die Präparation selbst wurden zunächst 300 g Glattmuskel aus Schweinemagen im Fleischwolf zerkleinert und in 1,5 l Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mM Benzamidin, 1 mM PMSF, 1 mM ε-Aminocaprinsäure, pH 7,5) im Mixer homogenisiert. Das entstehende Gemisch wurde für 45 min bei 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Waschpuffer resuspendiert und noch einmal bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschriff wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Als nächstes wurde das Pellet in 600 ml Puffer 1 (1 M KCl, 1 mM DTT, pH 7) homogenisiert und 1 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde eine isoelektrische Fällung durchgeführt. Hierfür wurde der Überstand der

Zentrifugation filtriert und anschließend mit 1 M HCl auf pH 4,6 eingestellt. Nach 15 min Rühren bei 4 °C wurde für 30 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 ml 0,5 mM DTT aufgenommen, resuspendiert und mit Tris auf pH 7 eingestellt. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 100.000 g und 4 °C wurde der Überstand mit Ammoniumsulfat auf 40 % Sättigung eingestellt. Es wurde danach für 30 min unter Rühren bei 4 °C gefällt. Das Präzipitat der ersten Fällung wurde für 30 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit Ammoniumsulfat auf 65 % Sättigung eingestellt und 30 min bei 4 °C gerührt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 100.000 g und 4 °C wurde das Präzipitat der zweiten Fällung in 50 ml DEAE-Puffer (20 mM Imidazol, 20 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT) aufgenommen und zweimal gegen 1 l DEAE-Puffer bei 4 °C dialysiert. Das Dialysat wurde für 1 h bei 150.000 g und 4 °C klarzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand auf eine TMAE-Säule (EMD TMAE Fractogel) aufgetragen und mit 1 Volumen DEAE-Puffer gewaschen. Eluiert wurde dann mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,05 – 0,35 M NaCl) bei einer Laufgeschwindigkeit von 75 ml/h. Die Trennung der Proteine wurde durch eine SDS-PAGE überprüft. Die Tropomyosin enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, in einer Ultrafiltrationszelle ankonzentriert und gegen Puffer 2 (10 mM Tris, 30 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM DTT, pH 7,4) dialysiert.

2.2.7 Aufreinigung von Tropomyosin aus der Skelettmuskulatur des Schweins

Für die Aufreinigung von Skelettmuskel-Tropomyosin wurde auf acetongetrocknetes Muskelpulver als Ausgangsmaterial zurückgegriffen. Es wurden zunächst 10 g Muskelpulver in 10 Volumen Extraktionspuffer (1 M KCl, 0,5 mM DTT) für 16 h bei 4 °C gerührt. Der Extrakt wurde durch ein Tuch ausgepresst und aufgefangen. Der Rückstand wurde in 7 Volumen Extraktionspuffer aufgenommen und 2 h bei 4 °C gerührt. Nach erneutem Auspressen durch ein Tuch wurde der Rückstand verworfen und beide Extrakte vereinigt. Der Extrakt wurde dann mit HCl auf pH 4,6 eingestellt und 30 min gerührt. Anschließend wurde 20 min bei 6.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 Volumen Extraktionspuffer aufgenommen und mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Nach 20 minütigem Rühren wurde für 10 min bei 6.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit HCl auf pH 4,6 eingestellt, 20 min gerührt und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Die beiden Extraktionsschritte wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 15 Volumen 0,5 mM DTT gelöst und auf pH 7 eingestellt.

Als nächstes folgte nun die erste Ammoniumsulfat-Fällung bis zu einer Sättigung von 53 %. Nach 30 min Rühren und Zentrifugation für 30 min bei 11.000 g und 4 °C wurde der Überstand ein zweites Mal mit Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 65 % gefällt. Das Präzipitat der 2. Fällung wurde nach Zentrifugation für 30 min bei 100.000 g und 4 °C in Dialysepuffer (20 mM Imidazol, 20 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT) aufgenommen und gegen diesen Puffer ü/N dialysiert. Die anschließende Reinigung mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen erfolgt wie bei der Aufreinigung von Glattmuskel-Tropomyosin.

2.2.8 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

- Expressionskultur:

Zur Herstellung rekombinanter Proteine wurden zunächst 5 ml einer Vorkultur, die aus einer gepickten Bakterienkolonie (siehe Methode unten) hergestellt wurde, zu 250 ml eines antibiotikahaltigen LB-Mediums gegeben und ü/N bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Art der eingesetzten Antibiotika richtete sich nach den eingesetzten Bakterienstämmen und den transfizierten Plasmiden. Nachdem die Bakterien eine ausreichende Dichte erreicht hatten (OD_{600} 0,5 - 0,6) wurden noch einmal 1750 ml antibiotikahaltiges LB-Medium hinzugegeben um einen Gesamtansatz von ca. 2 l zu erhalten. Nachdem die Bakterienkultur unter Schütteln bei 37 °C erneut eine OD_{600} von ca. 0,6 erreicht hatte, wurde die Expression durch Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM gestartet. Nach 3 h wurde die Expression durch Herunterkühlen der Bakteriensuspension auf Eis gestoppt. Anschließend wurde für 20 min bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert. Zur Analyse der Expression wurden vor der Induktion und nach 1 h, 2 h und 3 h je 1 ml Proben entnommen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 g in einer Eppendorfszentrifuge pelletiert 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 5 minütiges Kochen lysiert. Anschließend wurde noch einmal für 20 s bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die bakteriellen Proteine und konnte in der SDS-Page analysiert werden.

- Präparation von Proteinen aus Einschlusskörpern:

Einige der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine wurden während der Expression im Innern der Bakterien in „inclusion bodies“ abgelagert. Dies hat auf der einen

Seite den Vorteil, dass das gewünschte Protein im Innern dieser Partikel in großer Menge und hoher Reinheit vorliegt, auf der anderen Seite sind die Proteine aber in der Regel denaturiert und müssen zu Beginn der speziellen Aufreinigung erst wieder renaturiert werden. Die Sedimente der Expressionskultur (hier ca. 2 l) wurden zunächst in ca. 75 ml Puffer A (10 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 % Triton X-100, 0,2 mM DTT, pH 7,6) aufgenommen, und mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators lysiert (ca. 3 min bei 0 °C). Anschließend wurde die Suspension für 20 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 150 ml Puffer B (20 mM Tris, 1 mM EGTA, 0,1 % Triton X-100, 0,2 mM DTT, pH 7,6) resuspendiert. Nach erneuter Ultraschallbehandlung und Zentrifugation (wie oben) wurde das entstandene Sediment in 8 M Harnstoff-Lsg. aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde der Harnstoff durch dreimaliges Dialysieren gegen 5 l B10-Puffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 7,6) stufenweise entfernt. Dabei wurde das Protein aus den „inclusion bodies“ renaturiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 100.000 g enthielt der Überstand das gewünschte Protein, welches nun weiter aufgereinigt werden konnte.

- Aufreinigung der rekombinanten Proteine durch Chromatographie:

Sowohl die löslichen Proteine, die direkt aus den lysierten Bakterien gewonnen wurden, als auch die Proteine die durch Aufschluss der Einschlusskörper gewonnen wurden, wurden durch chromatographische Verfahren weiter aufgereinigt. Die Proteine wurden gegen B10-Puffer dialysiert und anschließend auf die DEAE-CL6B- Anionenaustauschersäule aufgetragen. Das Auftragen der Proteine auf die Säule geschah mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min. Nachdem die Proteine, die sich nicht an die Säule binden separat aufgefangen wurden und sich erneut eine Basislinie gebildet hatte, wurde der eigentliche Säulenlauf mit einem linearen KCl-Gradienten von 50 – 500 mM KCl mit einer Laufgeschwindigkeit von 4 ml/min durchgeführt. Als Laufpuffer wurde wieder B10-Puffer mit dem erwähnten Gradienten verwendet. Es wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt und durch SDS-PAGE analysiert. Bei manchen rekombinanten Proteinen wurde bereits nach dieser Chromatographie eine gute Reinheit erzielt. War dies nicht der Fall, schloss sich ein weiterer Chromatographieschritt in Form einer Aufreinigung durch eine MonoQ-Säule an. Der Säulenlauf wurde dann im Prinzip wie bei der DEAE-CL6B-Säule durchgeführt, nur wurde der KCl-Gradient dann von 10 – 400 mM KCl gewählt und mit einer Laufgeschwindigkeit

von 1 ml/min durchgeführt. Es wurden dann Fraktionen zu je 2 ml gesammelt und erneut durch SDS-PAGE analysiert. Als nächste Reinigungsstufe schloss sich danach bei Bedarf ein Säulenlauf mit einer TMAE-Säule an, der wie die Chromatographie mit der MonoQ-Säule durchgeführt wurde, nur wurde der Gradient dann von 50 – 350 mM KCl gewählt. Anschließend wurde bei Bedarf ein Säulenlauf mit einer MonoS-Säule durchgeführt. Die Bedingungen entsprachen denen beim vorherigen Lauf mit der TMAE-Säule. Wenn die Reinheit des Proteins an dieser Stelle noch weiter erhöht werden musste, wurde bei Bedarf als letzte Chromatographie eine Gelfiltration mit einer Sephacryl S-300 Säule durchgeführt. Die klarzentrifugierte und auf maximal 10 ml aufkonzentrierte Probe wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgetragen. Es wurden Fraktionen zu je 5 ml aufgefangen. Die Fraktionen im Bereich des Schreiberpeaks wurden durch SDS-PAGE untersucht. Die bei einem rekombinanten Protein angewandte Abfolge von Chromatographieschritten war von Protein zu Protein verschieden und wurde bei jeder Aufreinigungsprozedur für das spezielle Protein zusammengestellt.

2.2.9 Fällung von Proteinen mit verdünnter Trichloressigsäure

Um SDS-Proben von Proteinen auch aus konzentrierten Harnstofflösungen (bis 8 M) herstellen zu können, wurden diese mit konzentrierter Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Die Proben mit dem zu fällenden Protein wurden mit dem gleichen Volumen 10% TCA versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets zweimal mit je 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 200 µl 1xSDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben noch mal für 10 min bei 10.000 g klarzentrifugiert.

2.2.10 Protein-Konzentrationsbestimmung

- Biuret-Methode:

Die Bestimmung der Proteinkonzentration durch die Biuret-Methode beruht auf der Bildung von violetten Komplexen von Cu^{2+} -Ionen mit N-Atomen der Peptidbindungen der Proteine. Die Komplexe lassen sich spektralphotometrisch bei 545 nm nachweisen.

Lösungen:

- Biuret A: 173 g/l Natriumcitrat, 100 g/l NaCO₃ und 17,3 g/l CuSO₄ in H₂O
- Biuret B: 9 % (w/v) NaOH

Zu 300 µl Probe wurden 300 µl Biuret-Lsg. B und 30 µl Biuret-Lsg. A gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nullwert wurde eine Probe mit H₂O anstelle der Proteinlösung verwendet. Beide Lösungen wurden in Mikroküvetten gegeben und die Extinktion im Photometer bei 545 nm gemessen. Die Proteinkonzentration konnte anhand eines Umrechnungsfaktors, der zuvor mit Hilfe einer Lösung bekannter Konzentration ermittelt wurde, errechnet werden. Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode bei ca. 0,1 mg/ml [Goa, 1953].

- BCA-Methode:

Eine weitere Methode, die speziell bei niedrig konzentrierten Proteinlösungen verwendet wurde, ist die BCA-Methode. Bei dieser Methode wird ausgenutzt, dass Bicichoninsäure in alkalischer Lösung einen violetten Komplex mit Cu⁺-Ionen bildet, welche zuvor durch Reduktion der im Ansatz enthaltenen Cu²⁺-Ionen an Peptidbindungen der Proteine entstanden sind. Der entstehende Farbkomplex wird photometrisch bei 562 nm gemessen.

Lösungen:

- Lösung A: Bicichoninlösung (fertig angesetzt, geliefert von Fluka)
- Lösung B: 4 % (w/v) CuSO₄ · 5H₂O

Es wurden 50 µl Proteinlösung mit 1 ml Nachweislösung (50 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben im Photometer gegen einen Nullwert (1 ml Nachweislösung + 50 µl H₂O) bei 562 nm gemessen. Der Umrechnungsfaktor zur Berechnung der Endkonzentration, wurde wie bei der Biuret-Methode beschrieben ermittelt.

- Bradford-Methode:

Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 bildet mit Proteinen Komplexe. Durch die Komplexbildung wird der Farbstoff in seiner blauen, anionischen Form stabilisiert. Das

Absorptionsmaximum verschiebt sich dadurch von 470 nm zu 595 nm [Compton, 1985]. Durch die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann die Bildung des Protein-Farbstoff-Komplexes sehr empfindlich detektiert werden. Die Methode eignet sich auch für die Bestimmung von sehr geringen Konzentrationen bis zu 1 µg/ml. Salzkonzentrationen beeinflussen das Ergebnis nicht, wohl jedoch Detergenzien wie SDS und denaturierende Agenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid.

Zur Messung wurden 100 µl Probe mit 400 µl H₂O verdünnt und mit 100 µl Bradfordreagenz (Rotiquant[®]) versetzt. Die Proben wurden im Photometer gegen einen Nullwert (100 µl Bradfordreagenz + 500 µl H₂O) bei 595 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer Eichgerade, die durch Vermessung von Proteinlösungen bekannter Konzentration ermittelt wurde, wurde schließlich die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt [Laemmli, 1970]. Die Trennmatrix wird durch die Polymerisation von Acrylamid mit dem quervernetzenden Agens N,N'-Methylenbisacrylamid erzeugt. Durch Variation des Mengenverhältnisses dieser beiden Stoffe, können die Porengröße und damit die Trenneigenschaften des Gels beeinflusst werden. Die Polymerisation selbst wird durch den Radikalbildner Ammoniumpersulfat induziert und durch TEMED katalysiert.

Die SDS-PAGE wurde unter Verwendung eines Sammelgels (5 % Acrylamid) und Trenngels (15 % Acrylamid) durchgeführt. Das Sammelgel wurde direkt vor der Elektrophorese über das bereits vorbereitete Trenngel gegossen.

Probenvorbereitung:

20 µl Proteinlösung wurden mit 5 µl 5xSDS-Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht. Vor dem Auftragen wurden die Proben noch einmal für 1 min bei voller Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um nicht lösliche Aggregate abzutrennen. Der Überstand wurde dann auf das Gel aufgetragen.

Elektrophorese:

Die elektrophoretische Trennung erfolgte für 2 h bei 25 mA und einer Spannung von 220 V in SDS-Laufpuffer. Nach Austritt der Bromphenolblaubande aus der unteren Kante des Gels

wurde der Lauf beendet und die Glasplatten entfernt. Das Gel wurde nun gefärbt oder in einem Western Blot weiter verwendet.

Färbung:

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel in Coomassie-Blau Färbelösung gegeben, für 1 min bei 900 W in der Mikrowelle erhitzt und unter Schütteln für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung weggegossen, das Gel einmal mit Wasser gespült und dann in Entfärbelösung gegen, in welcher es auch zunächst 1 min bei 900 W in der Mikrowelle erhitzt wird und danach für 15 min geschüttelt wird. Zur endgültigen Entfärbung wurden die Gele ü/N in deionisiertem Wasser geschüttelt.

<i>Lösung für 15%-Gele</i>	<i>5xSDS-Probenpuffer</i>	<i>1xLaufpuffer</i>
15 % Acrylamid	10 % SDS	25 mM Tris-Glycin
0,1 % Bisacrylamid	50 mM DTT	0,1 % SDS
0,1 % SDS	20 % Glycerin	pH 8,35
370 mM Tris, pH 8,7	20 mM EDTA	
0,03 % APS	0,05 % Bromphenolblau	
0,03 % TEMED	320 mM Tris, pH 6,9	

<i>Coomassie-Blau-Färbelösung</i>	<i>Entfärbelösung</i>
10 % Essigsäure	10 % Essigsäure
25 % Isopropanol	10 % Isopropanol
0,5 % Coomassie Brilliant Blau R-250	

2.2.12 Immunblot

Diese Methode dient dazu, Proteine über spezifische Wechselwirkungen mit Antikörpern nachzuweisen. Dazu werden die zu untersuchenden Proteine auf Nitrocellulosemembranen transferiert [Kyhse-Anderson, 1984]. Der Nachweis von spezifischen Bindungen erfolgte durch einen gegen den ersten Antikörper gerichteten, enzymgekoppelten Zweitantikörper. Durch das gekoppelte Enzym wird ein unlösliches, gefärbtes Produkt hergestellt.

- Elektrotransfer:

Um die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch eine Antikörpervermittelte Nachweisreaktion zugänglich zu machen, wurden diese aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dies geschieht durch Elektroblooming, wobei die Proteine im elektrischen Feld senkrecht zu ihrer Laufrichtung bei der SDS-PAGE wandern. Hierdurch gelangen sie auf die Membran, wo sie gebunden werden. Auf die Anode eines Elektroblooters mit Graphitplatten-Elektroden wird folgendes in der genannten Reihenfolge geschichtet:

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

Schließlich wurde obenauf die Graphitplatte gelegt, die als Kathode diente.

Der Transfer wurde bei 150 mA und einer Spannung von 30 V über 2 h durchgeführt. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau-Rot-Lösung (0,3 % Ponceau S, 3 % Trichloressigsäure, 3 % Sulfosalicylsäure) inkubiert. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden hierdurch reversibel rot angefärbt. War der Test positiv, wurden die Banden anschließend durch Waschen in Wasser und 2 M Tris-Lösung entfärbt.

- Abblocken unspezifischer Bindestellen und Inkubation mit Antikörpern:

Um die unspezifischen Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde die Nitrocellulosemembran für 2h in 5 %-iger Lösung von BSA in TTBS bei RT inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt. Die Membran wurde für 10 min in TTBS gewaschen und dann mit dem Erstantikörper, welcher in TTBS gelöst war, für 2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TTBS für jeweils 10 min wurde die Nitrocellulose für 2 h mit dem in TTBS gelösten Zweitantikörper inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal mit TTBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran 5 min in AP-Puffer gegeben und der Blot entwickelt.

Lösungen:

- TTBS: 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
- Blockier-Lösung: 5 % BSA in TTBS
- AP-Puffer: 50 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 9,5

Verwendete Antikörper:

m-a-Gelsolin (eigene Herstellung und GS2C4 Sigma), m-a-Aktin (Sigma), m-a-Tropomyosin (Sigma), g-a-m AP (Sekundärantikörper, Sigma).

- Nachweis mit alkalischer Phosphatase:

Um die Bindung des Erstantikörpers an das Protein nachzuweisen, kann über die Bindung des Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörpers eine lokal begrenzte Enzymreaktion NBT und BCIP erzielt werden, wobei die beiden Substratanaloga zu einem unlöslichen dunkel-violetten Niederschlag umgesetzt werden, der an den Proteinen und der direkt angrenzenden Membran gebunden bleibt.

Lösungen:

- NBT-Lösung: 30 mg NBT in 1 ml 70 %-iger Dimethylformamid-Lösung
- BCIP-Lösung: 15 mg BCIP in 1ml Dimethylformamid

Die in Phosphatase-Puffer gewaschene und so umgepufferte Nitrocellulose-Membran wurde mit frisch angesetzter Entwickler-Lösung (10 ml AP-Puffer, 0,1 ml NBT- und 0,1 ml BCIP-Lösung) inkubiert und bei RT bis zum Erscheinen von sichtbaren Banden geschüttelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran in Wasser mit einigen Tropfen Essigsäure überführt und anschließend noch einmal in Wasser gewaschen.

2.2.13 Kosedimentation mit F-Aktin

Die Kosedimentation ist eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dabei wird das veränderte Sedimentationsverhalten einzelner Komponenten in Proteingemischen ausgenutzt, wenn Komplexe im Ansatz gebildet werden. Diese Komplexe können durch Ultrazentrifugation von freien Proteinen getrennt und durch SDS-PAGE analysiert werden. In dieser Arbeit wurde die Kosedimentation eingesetzt, um die Interaktion des nativen Gelsolins und Tropomyosin mit F-Aktin sowie die Interaktion der rekombinanten Proteine mit F-Aktin zu untersuchen. F-Aktin lässt sich in Schwerefeldern von

100.000 g in 30 min sedimentieren, Gelsolin, bzw. Tropomyosin allein sind nicht sedimentierbar.

Um die Interaktion von o.g. Proteinen mit F-Aktin zu untersuchen, wurden die Proteine zunächst gegen 50 Volumen Aktin-Polymerisations-Puffer (APB) (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1 mM ATP, 10 mM Imidazol, pH 7,5) ü/N bei 4 °C dialysiert und für 1 h bei 150.000 g und 4 °C zentrifugiert. G-Aktin wurde in Konzentration von 1 mg/ml durch Zugabe von 10xAPB und 100 mM KCl für 30 min bei RT polymerisiert. Anschließend wurden je 0,5 mg F-Aktin entnommen, die zu untersuchenden Proteine zugesetzt und 1 h bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation von 1 h bei 150.000 g und 4 °C wurden der Überstand und das Pellet in verschiedene Eppendorf-Gefäße gegeben, zu SDS-Proben verarbeitet und in der SDS-PAGE analysiert. Als Kontrolle hierbei dienten die einzelnen, nicht zusammen inkubierten, Proteine. Wenn bei den einzelnen Versuchen nicht anders angegeben, wurde Kaninchen-SKM-Aktin verwendet.

Kosedimentationsansatz:

0,5 mg/ml F-Aktin in 2xG-Puffer

1 mM ATP

100 mM KCl

10 mM Imidazol, pH 7,4

Proteine in unterschiedlichen molaren Verhältnissen (jeweils angegeben)

2.2.14 Viskosimetrie

Mit Hilfe der Viskosimetrie lassen sich Viskositätsänderungen von Lösungen während des Polymerisations- und Depolymerisationsvorgangs von Aktin untersuchen. Darüber hinaus kann der Einfluss von Proteinen, die mit Aktin wechselwirken, auf das Polymerisations- bzw. Depolymerisationsverhalten von Aktin untersucht werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Gelsolin, Tropomyosin und Gelsolin/Tropomyosin-Komplexen (sowie der Fragmente und Mutanten der jeweiligen Proteine) auf die Eigenschaften des Aktins untersucht.

Die zentrale Vorgehensweise bei dieser Methode ist die Bestimmung der Zeit, die eine Lösung zum Passieren zweier Markierungen an einem Schenkel eines U-förmigen Oswald-Viskosimeters benötigt.

Mit folgender Formel wird aus der ermittelten Zeit die spezifische Viskosität (η) berechnet:

$$\eta = (t_1 / t_2) - 1$$

Wobei t_1 die Durchflusszeit der Probe und t_2 die Durchflusszeit von Wasser als Referenz ist.

Allgemeine Durchführung:

Für die viskosimetrischen Messungen wurde ein Oswald-Viskosimeter mit einem Analysevolumen von 1 ml verwendet. Bei Analyse der Polymerisationseigenschaften wurde sofort frisches G-Aktin in einem entsprechenden Polymerisationsansatz verwendet. Bei Analyse der Depolymerisationseigenschaften des Aktins, bzw. Fragmentationseigenschaften der wechselwirkenden Proteine wurde G-Aktin zuerst für 1 h in einem Polymerisationsansatz vorinkubiert und so in F-Aktin umgewandelt. Der Messansatz setzte sich aus 1 mg/ml Aktin (G- oder F-Aktin, je nachdem), 1 mM ATP, 10 mM Imidazol, unterschiedlichen Konzentrationen an CaCl_2 und zu messendem Protein zusammen; der Ansatz wurde auf pH 7,2 eingestellt. Die Proben wurden gut durchmischt und möglichst luftblasenfrei in das Viskosimeter überführt. Die Durchflusszeit wurde zu mehreren Zeiten (etwa jede Minute für insgesamt 15 min) gemessen. Das Viskosimeter befand sich während der Messungen in einem Wasserbad, welches auf 25 °C temperiert war.

Ermittlung von Ca-abhängigen Aktivitäten:

In einigen Messreihen wurde versucht, die für die Aktivierung der jeweiligen Gelsolinvariante minimal benötigte Calciumkonzentration zu ermitteln. Mit Hilfe der Programme *Eqcal* (Biosoft) und *Ca-EGTA Calculator v1.3* (Stanford University) wurden die Konzentrationen von freien Ca^{2+} -Ionen bei verschiedenen Mischungen von EGTA und CaCl_2 ermittelt.

[CaCl_2] (mM)	[EGTA] (mM)	[Ca^{2+}] _{frei}
0,11	3,70	$1,0 \cdot 10^{-8}$ M
0,10	1,00	$3,7 \cdot 10^{-8}$ M
0,26	1,10	$1,0 \cdot 10^{-7}$ M
0,50	1,00	$3,4 \cdot 10^{-7}$ M
0,76	1,00	$1,0 \cdot 10^{-6}$ M
0,90	1,00	$2,7 \cdot 10^{-6}$ M
0,98	1,00	$1,0 \cdot 10^{-5}$ M

2.2.15 Fluorometrie

Proteine können an reaktiven Sulfhydrylgruppen mit dem Fluoreszenzfarbstoff N-(1-Pyrenyl)-iodoacetamid markiert werden [Weltman et al., 1973]. 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 Aktin erfolgt über die reaktive Thiolgruppe von Cys374. Wird das so markierte G-Aktin (Pyren-G-Aktin) polymerisiert, resultiert aus der Konformationsänderung des Monomers beim Einbau in das Polymer eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals. Kontinuierliche Messungen der Fluoreszenzaktivität geben Aufschluss über die Kinetik der Aktinpolymerisation oder -depolymerisation.

In dieser Arbeit wurde die Fluorometrie u.a. eingesetzt, um die Nukleationsaktivität von rekombinantem Gelsolin unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren und sie mit der Aktivität des Wildtypproteins zu vergleichen. Wenn bei den einzelnen Versuchen nicht anders angegeben, wurde Kaninchen-SKM-Aktin verwendet. Die Messungen wurden an einem Spektralfluorometer (Shimadzu 5001) bei 25 °C durchgeführt, welches mit dem Computerprogramm RF-5001 (Version 2.0, Shimadzu) gesteuert wurde.

- Nukleation:

Die Geschwindigkeit der Polymerisation von Aktin ist u.a. konzentrationsabhängig. So polymerisiert G-Aktin bei niedrigen Konzentrationen sehr langsam, was im fluorometrischen 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:

0,5 mg/ml G-Aktin (mit 20 % Pyren-Aktin-Anteil) in G-Puffer

1 mM ATP

100 mM KCl

10 mM Imidazol, pH 7,4

Proteine in G-Puffer (in verschiedenen Mengen)

Durchführung:

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

- Fragmentation:

Die fluorometrische Messung der Fragmentationsaktivität basiert nicht wie bei der Viskosimetrie auf einer direkten Messung der Fragmentation selbst, sondern auf der Messung der Depolymerisation von Aktin-Filamenten. Hierbei wurden 0,5 mg/ml Aktin (mit 20 % Pyren-Aktin) mit Gelsolin in einem Verhältnis von 300:1 über Nacht bei 4 °C vorpolymerisiert. Der Reaktionsansatz war folgendermaßen zusammengesetzt: 400 µg/ml Aktin, 100 µg/ml Pyren-Aktin, 1,7 µg/ml Gelsolin, 1 mM ATP und 50 µl/ml Poly-Mix. Vor Beginn der Messung wurden je nach Messung verschiedene Mengen CaCl₂ und Gelsolin hinzugegeben und für 2 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde dann in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml pro Ansatz auf eine Aktin-Konzentration von 0,01 mg/ml verdünnt und sofort vermessen.

2.2.16 Quervernetzung mit EDC

EDC wurde in dieser Arbeit zur Quervernetzung der rekombinanten Proteine mit G-Aktin verwendet. Alle proteinhaltigen Lösungen mit Ausnahme des Aktins wurden ü/N gegen 50 Volumen B10-Puffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 7,6) bei 2 °C dialysiert und für 30 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert, um Präzipitate zu entfernen. Die Proteine wurden mit G-Aktin in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt, mit B10 auf ein Endvolumen von 1 ml 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 und Aufkochen für 5 min 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.

2.2.17 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Aus dem Vergleich von gemessenen UV-Circular dichroismuspektren mit Referenzspektren bekannter Sekundärstrukturen lassen sich Sekundärstrukturen von Proteinen ableiten. Bei der CD-Spektroskopie wird die Differenz der Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm gemessen und als Elliptizität angegeben. Die Elliptizität ist in der Chiralität der untersuchten Strukturen begründet, vor allem der Carbonylgruppen der Proteine, die bei asymmetrischer Substitution zwei Absorptionsübergänge haben. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode benutzt, um die korrekte Faltung von rekombinant hergestellten Proteinen zu überprüfen und diese mit der Konformation von nativ präparierten Proteinen zu vergleichen.

Die zu untersuchenden Proteine (400 µl, 100 µg/ml) wurden dazu gegen CD-Puffer 1 (10 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaCl, pH 7,4) dialysiert. Die CD-Spektren wurden mit dem JASCO 710 CD-Spektrometer in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm aufgenommen. Die Scan-Geschwindigkeit betrug 20 nm/min, die Bandbreite 1 nm, die Auflösung 0,1 nm, die Empfindlichkeit 20 mdeg, die Zeitkonstante 4 s, die Temperatur 25 °C und die Schichtdicke der Quarzküvette 0,1 cm. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt und die Ergebnisse dann gemittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der JASCO-Software Standard Analysis.

2.2.18 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR / Biacore®)

Alle SPR-Messungen wurden mit einem Biacore® 3000 SPR-Gerät bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der BIAevaluation Software 3.0.

Verwendeter Chip:

CM5 (Biacore) → Kovalente Kopplung der Liganden über Thiolgruppen auf einer Dextranmatrix.

Vortests:

Mit Vortests wurde überprüft, bei welchem pH-Wert und bei welcher Konzentration das jeweilige Protein auf einer aktivierten CM 5-Sensorchip-Oberfläche in optimaler Weise aufkonzentriert werden konnte. Die Injektionen dafür erfolgten nach der Äquilibration des Systems (Flußrate 5 µl/min) mit Laufpuffer (Biacore, 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,005 % P20, pH 7,4). Die zu koppelnden Proteine wurden bei den in Frage

kommenden Konzentrationen in G-Puffer (s.o.) verdünnt. Dabei sollte der pH-Wert der Lösung möglichst bei einem Wert liegen, bei dem das zugesetzte ATP nicht hydrolysiert. Die Injektionen erfolgten mit dem Injektionsbefehl „Inject“ bei Flußraten von 5 µl/min und mit Volumina zwischen 30 und 40 µl. Ziel war, Bedingungen (Konzentration, pH) zu finden, bei der die Basislinie ein um ca. 7000 RU erhöhtes SPR-Signal zeigte (abhängig vom immobilisierten Liganden) und die Kopplung mit der optimalen Kinetik ablief, nämlich möglichst langsam, um eine gleichmäßige Verteilung des Liganden auf der Chipoberfläche zu erreichen. Zwischen einzelnen Versuchen wurde der Chip durch die Injektion von geeigneter Regenerationslösung (1-2 M NaCl oder 25 mM HCl) regeneriert (Befehl „Quickinject“).

Kopplung:

Für die Kopplung wurde das System mit Laufpuffer bei einer Flußrate von 5 µl/min äquilibriert. CM5-Chips wurden durch die Injektion von 50µl NHS/EDC (0,05 M/ 0,2 M) aktiviert. Danach wurden 50 µl des Liganden unter den vorher ermittelten Bedingungen in das System injiziert (Flußrate 5µl/min, Befehl „Inject“). Anschließend wurden alle verbliebenen freien Bindungsstellen durch die Injektion von 50µl 0,1 M Cystein-Lösung abgesättigt und zum Waschen des Chips zwei Injektionen mit Laufpuffer durchgeführt (je 5 µl, Quickinject).

Messung:

Für die Messungen wurde das System mit Laufpuffer bei einer Flußrate von 30 µl/min äquilibriert. Mit Vorhandensein einer stabilen Basislinie (Schwankungen < 2 RU) wurden die zu untersuchenden Proteine bei gleicher Flußrate in den gewünschten Konzentrationen injiziert (120 µl), dabei wurde der Befehl Kinject (an Stelle des üblichen Inject) gewählt um das vollständige Datenspektrum zu sammeln und kinetische Analysen zu ermöglichen. Alle Injektionen wurden bei ansteigenden Konzentrationen durchgeführt, die eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen zwischen 1 nM und 4 µM und wurden den Versuchen angepasst. Die Injektionsvolumina lagen immer bei 50 µl, die Dissoziationszeit bei 120 Sekunden. Nach jeder Messung wurde der Chip durch die Injektion von 25 mM HCl regeneriert (gleiche Flußraten, 50 – 100 µl), um alles nicht abgelöste Protein von der Chipoberfläche zu verdrängen und das SPR-Signal wieder zurück auf Basislinienniveau zu bringen. Nach jeder Messung erfolgte ein Waschen der Injektionsnadel und der internen Flußzelle.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben

Zu 100 mg frisch präpariertem Schweinemagen (nur Glattmuskel, die Mucosaschicht wurde zuvor entfernt) wurde 1 ml GTC-Lösung gegeben und das Gewebe mit einem Ultraturrax bei höchster Drehzahl für 2 min homogenisiert. Anschließend wurden unter Rühren 100 µl 2 M Na-Acetat, pH 4, 1 ml wassergesättigtes Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben. Die Emulsion wurde 30 s geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 10.000 g und 4 °C, wurde die obere Phase abgenommen, in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 1 Volumen eiskalten Isopropanol versetzt und ü/N bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Präzipitat bei 10.000 g in einer Tischzentrifuge für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Sediment in 300 µl GTC-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 1 Volumen eiskaltem Isopropanol und erneuter Inkubation ü/N, wurde das entstandene Präzipitat für 15 min bei 10.000 g und 4 °C abzentrifugiert, zweimal mit je 500 µl eiskaltem 75%igem Ethanol gewaschen und in der Tischzentrifuge kurz anzentrifugiert. Das Pellet wurde für ca. 20 min an der Luft getrocknet und in einem Volumen von 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Nach 10 minütiger Inkubation im Wasserbad bei 65 °C wurde die RNA-Lösung kurz anzentrifugiert und entweder sofort mit einem weiteren Verfahren (siehe 2.2) aufgereinigt oder zunächst bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe eines UV-Spektrometers bestimmt.

2.3.2 Aufreinigung der mRNA

Die unter 2.3.1 gewonnene Gesamt-RNA-Lösung wurde auf eine Säule des *High Pure Tissue Kit* (Roche) aufgetragen, die Präparation wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt und die RNA mit 10 µl DEPC-H₂O eluiert. Die RNA-Konzentration wurde mit einem UV-Spektrometer gemessen.

Aus der so erhaltenen, aufgereinigten Gesamt-RNA wurde danach mit Hilfe des *Oligotex mRNA Mini-Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers die enthaltene mRNA isoliert.

2.3.3 Reverse Transkription

Die Herstellung der cDNA aus mRNA erfolgt durch reverse Transkription. Zunächst wurde die isolierte mRNA mit oligo-dT geprimt. Dazu wurden 5 µg RNA mit H₂O auf ein Volumen

von 10 µl gebracht und 1 µl odT₁₅ (Gibco) dazu pipettiert. Nach 10 min Erhitzen auf 70 °C, wurden die Proben in Eiswasser abgekühlt. Danach erfolgte die eigentliche reverse Transkription, indem 4 µl 5xRT-Puffer, 2 µl dNTP, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl Superscript II zu der gepimten mRNA gegeben wurden. Nach 60 min Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym durch 10 min Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Der Ansatz enthielt nun die gewünschte cDNA.

2.3.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die UV-Spektrometrie wurde als Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren eingesetzt. Dazu wurden nukleinsäurehaltige Lösungen 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). Eine Verunreinigung der Proben mit Proteinen wurde in einer zweiten Messung bei 280 nm überprüft. Der Quotient aus den Absorptionswerten 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.

2.3.5 Isolierung von Plasmiden durch Ionenaustauscher-Säulen Kits

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen und die Kits *NucleoBond[®] PC 100* und *NucleoSpin[®] Plasmid* der Firma Macherey&Nagel (MN) verwendet. Dabei wurden die Vorgaben des Herstellers beachtet.

2.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA durch CTAB-Lyse

3 ml einer *E.coli* Übernachtskultur wurden 2 min bei 7000 g pelletiert, in 400 µl STET-Puffer resuspendiert, mit 8 µl einer frischen LysozymbLösung (50 mg/ml) versetzt und 10 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend erhitze man 45 s auf 95 °C zur Denaturierung von Proteinen und genomischer DNA. Die Zelldebris und denaturierte Bestandteile wurden durch 10 min Zentrifugation bei 13000 g pelletiert. Der Überstand wurde zwecks Fällung der Plasmid-DNA mit 16 µl CTAB-Lsg. versetzt und das Gemisch wurde 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl einer 1,2 M NaCl-Lsg. gelöst und erneut 2 min abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die DNA mit 750 µl absolutem Ethanol (-20 °C) gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst (5 min bei 70 °C).

2.3.7 Elektrophorese von Nukleinsäuren

DNA in DNA-Probenpuffer mit 100ng/μl Ethidiumbromid wurde in 0,8 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer nach ihrer Molekularmasse horizontal aufgetrennt. Zur Herstellung eines Gels wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 60 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromid versetzt. Bei Präparationen von DNA-Fragmenten für eine Ligation wurde LMP-Agarose eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in Flachbettkammern (70 x 100 mm) mit einer Gelhöhe von ca. 4 mm und einer Laufstrecke von ca. 6 cm bei 80 V in 45 min. Die fertigen Gele wurden auf einem UV-Transilluminator untersucht.

6xDNA-Probenpuffer:

0,025 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol

40 % (w/v) Saccharose

TAE-Laufpuffer:

40 mM Tris-Essigsäure, pH 7,8

1 mM EDTA

10 mM Natriumacetat

2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von PCR-Produkten und restringierten DNA-Fragmenten und Vektoren für Klonierungen und Transformationen wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Die gewünschten, ethidiumbromidgefärbten DNA-Banden wurden auf dem UV-Transilluminator mit Skalpellklingen ausgeschnitten und die Gelstückchen in nukleasefreie Eppendorfgefäße überführt und ausgewogen. 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 ermittelt.

2.3.9 Aufreinigung von DNA nach PCR und enzymatischen Reaktionen

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

2.3.10 Restriktion von DNA

250 ng – 1 μg DNA wurden mit 2 – 3 U einer Restriktionsendonuclease in einem Gesamtvolumen von 20 μl für 90 min inkubiert. Pufferbedingungen und Inkubationstemperatur wurden gemäß den Angaben der Hersteller eingestellt. Die

Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch 15 min Inkubation bei 65 °C, falls vom Hersteller keine höhere Temperatur empfohlen wurde. Anschließend wurde die DNA mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.3.11 Auffüllen von 5'-Überhängen und gleichzeitiger Abbau von 3'-Überhängen an Restriktionsfragmenten

Dazu wurden dem jeweiligen Restriktionsansatz nach erfolgter Spaltung 2 ml dNTP (10 mM jeden Nucleotids), 1 µl 10xH Puffer (Boehringer) sowie 2 U Klenow-Fragment zugesetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Bei 3'-Überhängen erfolgte die Zugabe der dNTPs erst nach 5 min Inkubation bei RT, da die 3'-5'-Exonucleaseaktivität des Klenow-Fragments ohne dNTP am größten ist. Nach Zugabe der dNTPs wurde für 25 min bei 37 °C inkubiert. Die Hitzedeaktivierung erfolgte bei 85 °C für 10 min.

2.3.12 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Religation von linearisierter Vektor-DNA zu vermeiden, wird der Restriktionsansatz mit 1 U alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Enzym bei 65 °C für 15 min inaktiviert.

2.3.13 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden dephosphorylierte Plasmid-DNA und Insert-DNA in einem LMP-Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechenden DNA-Banden wurden auf einem UV-Illuminator aus dem Gel präpariert, bei 65 °C geschmolzen und in mindestens dem doppelten Volumen Wasser aufgenommen. Die DNA-Mengen wurden mit Hilfe des verwendeten DNA-Markers abgeschätzt. 10 – 15 ng Vektor-DNA (je nach Größe, bei 3 kb 10 ng) werden mit der Insert-DNA und einem 1/10 Volumen Ligationspuffer versetzt (Gesamtvolumen 20 µl ± 5 µl). Das molare Verhältnis Vektor/Insert sollte dabei 1/5 bei „blunt-end“-Ligationen und 1/3 bei kohäsiven Enden betragen. Die Ligation erfolgt durch Zugabe von 2 U T4-Ligase für 2 h bei RT (kohäsive Enden) oder über Nacht bei 16 °C („blunt-end“).

2.3.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein äußerst effektives Verfahren zur schnellen Vervielfältigung von DNA. Grundlage der Methode ist die Aktivität der DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Mit ihrer Hilfe kann ein beliebiges zwischen zwei Primern befindliches Stück DNA vervielfältigt werden. Nach Aufschmelzen des Doppelstrangs (Denaturierung) werden die Primer angelagert (Annealing) und das Enzym polymerisiert den Gegenstrang (Elongation). Dies geschieht durch zyklische Veränderung der Temperatur des Reaktionsansatzes. Die eingesetzten Polymerasen sind thermostabil und können ohne Aktivitätsverlust viele Male auf Temperaturen von 95 °C und höher gebracht und wieder abgekühlt werden. Die Produktmenge steigt im Laufe der Reaktion exponentiell an, da jedes entstehende Produkt wiederum als Matrize dienen kann. Es gibt insgesamt eine große Anzahl von Variationen dieses Grundprinzips, so dass die PCR als Hilfsmittel für die Bearbeitung einer Vielzahl von Fragestellungen dienen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige verschiedene PCR-Techniken angewandt.

- PCR zur cDNA-Amplifikation:

Zur Amplifizierung der durch reverse Transkription hergestellten cDNA wurde das *Taq PCR Master Mix Kit* der Firma Qiagen verwendet. Die Oligonucleotide wurden anhand veröffentlichter DNA-Sequenzen der entsprechenden Gene entworfen und mit dem Computerprogramm *Primer3* optimiert. Die Annealing-Temperaturen wurden nach Angaben der Firma MWG, welche die Oligonucleotide synthetisiert hat, verwendet und eventuell durch Gradienten-PCR weiter optimiert. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt.

Zusammensetzung des Ansatzes:

12,5 µl Taq-Master-Mix (enthält ca. 2 U Taq, 800 µM dNTPs und 1,5 mM MgCl₂)

0,5 µl 5'-Primer (Endkonzentration 300 µM)

0,5 µl 3'-Primer (Endkonzentration 300 µM)

1 – 2 µl Template-DNA (entspricht meist 0,1 – 0,5 µg DNA)

9,5 – 10,5 µl Wasser

Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma Eppendorf unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

<i>Anzahl der Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Schritt</i>
1x	94 °C	2 min	Anfängliche Denaturierung
30x	94 °C	45 s	Aufschmelzen
	Primer-spezifisch	45 s	Annealing
	72 °C	3 min	Elongation
1x	72 °C	10 min	Endverlängerung

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

- Colony-PCR:

Diese Methode wurde verwendet, um gewachsene *E. coli*-Kolonien möglichst schnell und sicher auf das Vorhandensein eines gewünschten Plasmids zu testen. Das Plasmid auf das getestet wird sollte wenn möglich ein „high-copy Plasmid“ sein. Auch wenn man diese grundsätzlichen Informationen auch durch eine Blau-Weiß-Selektion (siehe dort) erhalten kann, so bietet diese Methode weiterhin die Möglichkeit, die Größe des in das Plasmid eingebauten Inserts, sowie dessen Orientierung zu überprüfen. Für diesen Test wurde eine Bakterienkolonie gepickt und teilweise (mit dem Rest wurde weitergearbeitet; etwas weniger als die Hälfte einer stecknadelkopfgroßen Kolonie reicht aus) in den PCR-Ansatz gegeben.

Zusammensetzung des Colony-PCR-Ansatzes:

Die folgenden Komponenten werden auf Eis zusammengegeben; die Lösung, die das Enzym enthält wird zuletzt zugegeben:

22 µl steriles destilliertes Wasser, 25 µl Taq PCR Master Mix, 1 µl 20 µM 5'-Primer, 1 µl 20 µM 3'-Primer.

In jedes kalte, vorbereitete PCR-Gefäß wurde ein Teil einer Bakterienkolonie gegeben. Dazu wurde eine feine Pipettenspitze benutzt. Die Bakterien wurden danach in dem PCR-Ansatz gut vermischt, so dass sie möglichst gut gelöst waren. Es wurde mehrfach stark auf- und abpipettiert, was zu einer besseren Zellyse und damit besseren Ausbeuten führte.

Die Reaktionen wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Schritt
1x	94 °C	5 min	Anfängliche Denaturierung
30x	94 °C	1 min	Aufschmelzen
	Primer-spezifisch	1 min	Annealing
	72 °C	3 min	Elongation
1x	72 °C	10 min	Endverlängerung

Die entstandenen Amplifikate wurden auf einem TAE-Agarosegel analysiert.

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Transformation und Herstellung von Plasmid-DNA in *E. coli*

Zur Transformation wurden 200 µl der kompetenten Zellsuspension mit dem ganzen Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei 42 °C und anschließender 2 min Inkubation auf Eis erfolgte nach Zugabe von 1 ml LB-Medium die Regeneration bei 37 °C für 45 min. Die Selektion der Bakterien erfolgte nach Ausstreichen des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten, die ein geeignetes Antibiotikum enthielten.

2.4.2 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 250 rpm. Die Bakterien wurden aus Einzelkolonien in LB-Medium mit einem dem Resistenzgen des transformierten Plasmids entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Für Glycerinkulturen werden ü/N-Kulturen mit 25 % Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Wiederverwendung werden aus den Glycerinkulturen die Bakterien mit einer Impföse auf dem Selektionsmedium ausgestrichen.

2.4.3 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Eine Bakterien-Kolonie des gewünschten Stammes wurde von einer LB/Tet-Platte (12,5 µg/ml) gepickt, in 5 ml LB/Tet (12,5 µg/ml) resuspendiert und ü/N bei 37 °C und leichtem Schütteln angezogen. 4 ml der frischen Kultur wurden in 400 ml LB/Tet (12,5 µg/ml)

verdünnt und bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ kultiviert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Kultur bei 4 °C und 4000 g für 15 min zentrifugiert und das Pellet in 50 ml Tfbx1 resuspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde für 15 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Tfbx2 resuspendiert und die Bakteriensuspension in 500 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

<i>TfbxI:</i>	<i>TfbxII:</i>
30 mM Kaliumacetat	10 mM MOPS, pH 7
50 mM MnCl ₂	75 mM CaCl ₂
100 mM KCl	10 mM KCl
10 mM CaCl ₂	15 % (w/v) Glycerin
15 % (w/v) Glycerin	

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

2.4.4 Blau-Weiß-Selektion

Zur Identifizierung rekombinanter Klone nach der Zwischenklonierung von cDNAs in pGEM-T-Easy-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 ü/N 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.

2.4.5 TOPO Cloning[®]-Methode

Für die Durchführung der TOPO Cloning[®] Reaktion wurde auf ein *TOPO TA Cloning[®] Kit* der Firma Invitrogen zurückgegriffen, in dem alle notwendigen Reagenzien vorhanden waren. Für die TOPO Cloning[®]-Methode wurden PCR-Produkte verwendet, die wie oben beschrieben hergestellt und durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt werden. Die nachfolgende Tabelle zeigt den nach Herstellerangaben empfohlenen Ansatz:

Reagenzien	Volumen
frisches PCR-Produkt	2 μ l
„Salzlösung“	1 μ l
steriles Wasser	2 μ l
TOPO [®] Vektor	1 μ l

Nachdem alle Komponenten in ein Eppendorf-Gefäß gegeben wurden, wurde dieses vorsichtig geschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 μ l der TOPO Cloning[®] Reaktion zu einem Aliquot geeigneter kompetenter *E.coli* Zellen gegeben, vorsichtig vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s auf 42 °C erhitzt und zu 250 μ l SOC Medium gegeben. Danach konnten die Zellen für 1 h in einem Schüttler regenerieren. Dann wurden 20 μ l des Transformationsansatzes auf eine vorgewärmte LB-Platte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert.

2.4.6 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 ein Abdruck erzeugt, welcher 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 der Nitrocelluloseabdruck auf Filterpapier 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-Puffer.

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 bei einem Immunblot, mit Rinderserumalbumin 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 Proteinexpression weiter verwendet.

Lösungen für den Colony Blot:

- SDS-Lösung: 10 % (w/v) SDS
- Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
- Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4
- 2xSSC-Puffer: 0,3 M NaCl, 40 mM Natriumcitrat
- TBS-Tween/Triton-Puffer: TBS mit 0,05 % Tween20 und 0,2 % Triton X-100

2.4.7 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 wachsenden Bakterienkultur bei einer OD₆₀₀ von 0,6 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.

3 Ergebnisse

3.1 Native Präparation von Proteinen

3.1.1 Gelsolin aus Schweinemagen

Die native Präparation von Gelsolin wurde wie beschrieben (2.2.5) durchgeführt. Dabei wurde zunächst das Muskelhomogenat hergestellt und die ersten Fällungen mit Ammoniumsulfat durchgeführt.

Vor der weiteren Aufreinigung mit Hilfe verschiedener Chromatographie-Säulen wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Mikro-Biuret-Methode vorgenommen (hier: 43 mg/ml). Im nächsten Schritt erfolgt wie beschrieben eine Aufreinigung durch die DEAE Sepharose CL6B Säule. Dies führte zu folgendem Ergebnis:

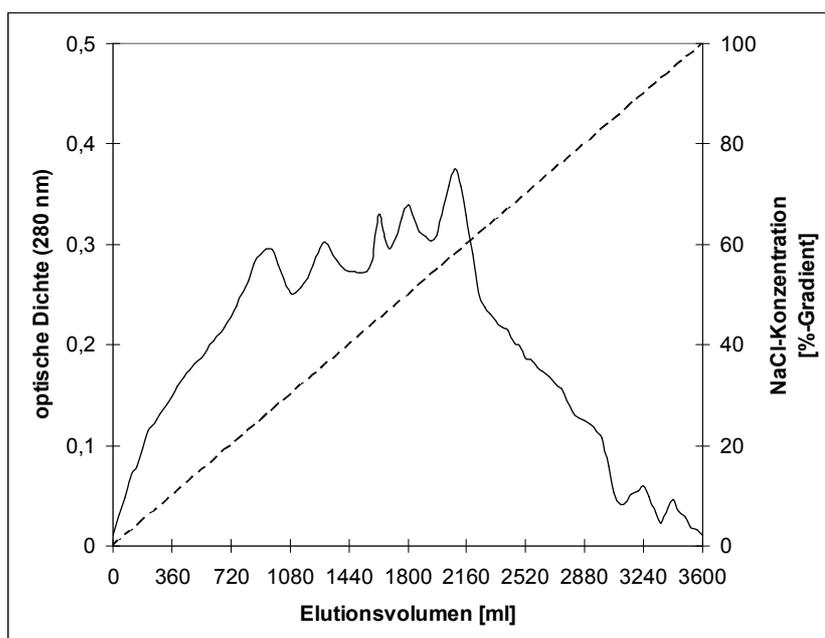


Abb. 3.1.1 Aufreinigung von Gelsolin aus Schweinemagen mittels DEAE-Sepharose Anionenaustauschromatographie. Die Proteinlösung wurde nach Dialyse und Klarzentrifugation aufgetragen und anschließend durch einen 6-stündigen linearen NaCl-Gradienten (0,05 – 0,35 M NaCl) bei einer Geschwindigkeit von 600 ml/h in einem Gesamtvolumen von 3600 ml eluiert.

Fractionen, die einem Schreiberpeak zugeordnet werden konnten, wurden mittels einer SDS-PAGE kontrolliert.

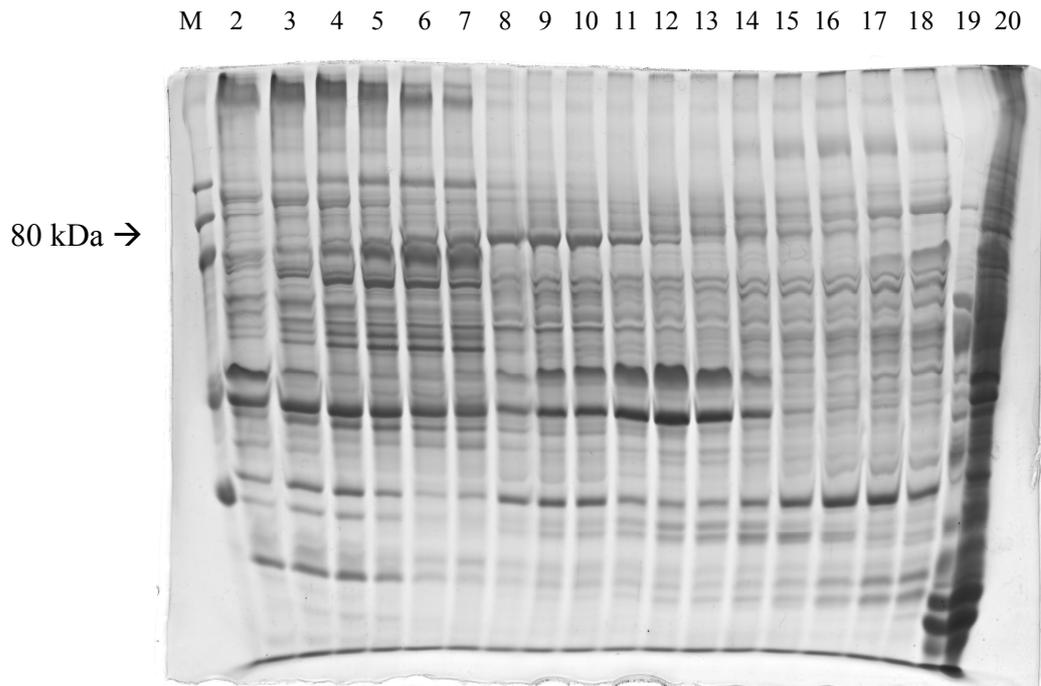


Abb. 3.1.2 SDS-PAGE von ausgewählten Fraktionen der DEAE-Säulen-Aufreinigung. Das Bild zeigt ein mit Coomassie-Blau gefärbtes 12,5 %-iges Polyacrylamidgel. (M) HMW-Molekularmassenstandard aus eigener Herstellung, (2) Fraktion 32, (3) Fraktion 34, (4) Fraktion 36, (5) Fraktion 38, (6) Fraktion 40, (7) Fraktion 42, (8) Fraktion 44, (9) Fraktion 46, (10) Fraktion 48, (11) Fraktion 50, (12) Fraktion 52, (13) Fraktion 54, (14) Fraktion 56, (15) Fraktion 58, (16) Fraktion 60, (17) Fraktion 62, (18) Fraktion 64, (19) Waschfraktion, (20) Homogenisat. Das aufzureinigende Gelsolin hat eine Größe von ca. 80 kDa.

Die Fraktionen 44 – 52 wurden gesammelt (ca. 185 ml), da sie eine Proteinbande der zu Gelsolin passenden Größe von 80 kDa enthielten und auf ca. 30 ml aufkonzentriert. Anschließend wurde die Probe wie beschrieben (2.2.5) klarzentrifugiert. Danach wurde die klarzentrifugierte und aufkonzentrierte Probe mit einer Geschwindigkeit von 33 ml/h auf eine Sephacryl S-300 HR Säule aufgetragen. Es wurden Fraktionen zu je 20 min (ca. 11ml) aufgefangen. Die Fraktionen im Bereich des Schreiberpeaks wurden durch SDS-PAGE untersucht.

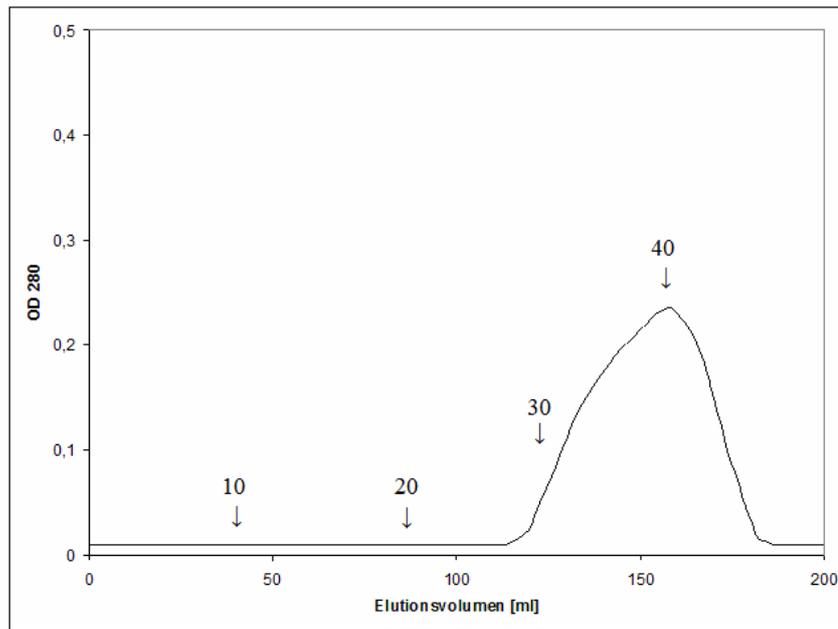


Abb. 3.1.3 Aufreinigung von Gelsolin durch eine Sephacryl S-300 HR Säule. Die Zahlen im Säulenlaufdiagramm geben die Nummern der gesammelten Fraktionen wieder.

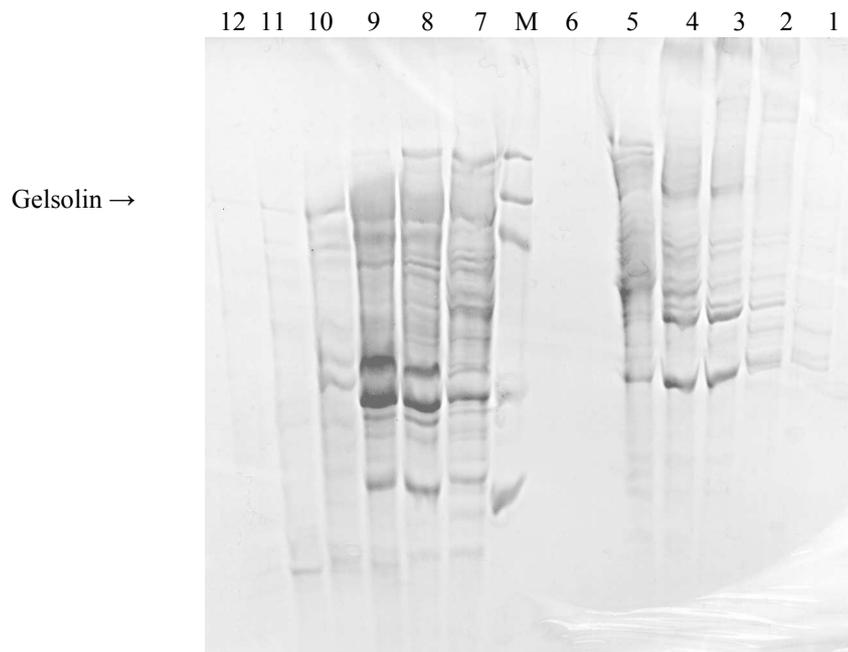


Abb. 3.1.4 SDS-PAGE von ausgewählten Fraktionen der Gelchromatographie. Das Bild zeigt ein mit Coomassie-Blau gefärbtes 12,5 %-iges Polyacrylamidgel. (M) HMW-Molekularmassenstandard aus eigener Herstellung, (1) Waschfraktion, (2) Fraktion 25, (3) Fraktion 27, (4) Fraktion 29, (5) Fraktion 31, (6) Fraktion 33, (7) Fraktion 35, (8) Fraktion 37, (9) Fraktion 39, (10) Fraktion 41, (11) Fraktion 43, (12) Fraktion 45.

Die Fraktionen 36-44 wurden gesammelt und auf ca. 30 ml aufkonzentriert.

Als nächstes erfolgte eine Aufreinigung durch eine DEAE-SHR Säule. Die Probe wurde auf die Säule aufgetragen und mit 4 ml/min eingewaschen. Es wurde 20 min mit Puffer 3 nachgewaschen, bis eine stabile Basislinie erreicht wurde. Danach startete man einen 2 h Gradienten mit Puffer 3 von 70 mM KCl bis 350 mM KCl. Es wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE der Fraktionen im Bereich der Schreiberpeaks.

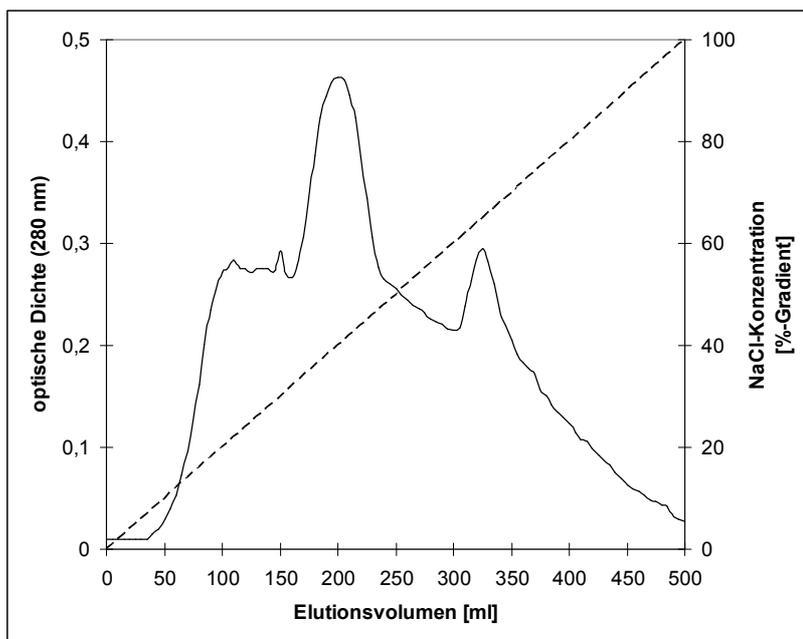
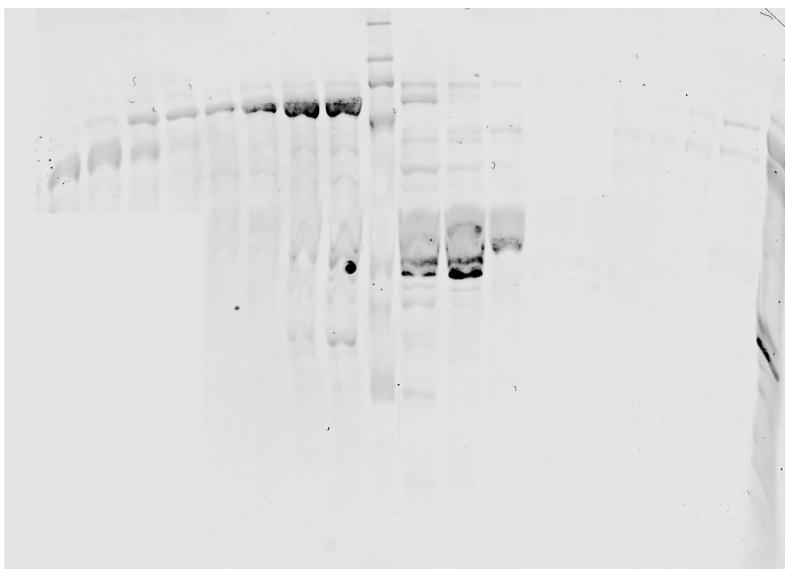


Abb. 3.1.5 Aufreinigung von Gelsolin mittels DEAE-Säule Anionenaustauschchromatographie. Die Proteinlösung wurde nach Dialyse und Klarzentrifugation auf eine DEAE-Säule aufgetragen und anschließend durch einen linearen NaCl-Gradienten (0,07 – 0,35 M NaCl) bei einer Geschwindigkeit von 4 ml/min in einem Gesamtvolumen von 500 ml eluiert.

20 19 18 17 16 15 14 13 12 M 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1



- Gelsolin

Abb. 3.1.6 SDS-PAGE von ausgewählten Fraktionen des DEAE-Säulenlaufs. Das Bild zeigt ein mit Coomassie-Blau gefärbtes 12,5 %-iges Polyacrylamidgel. (M) HMW-Molekularmassenstandard, (1) Waschfraktion, (2) Fraktion 1, (3) Fr. 2, (4) Fr. 3, (5) Fr. 4, (6) Fr. 5, (7) Fr. 6, (8) Fr. 7, (9) Fr. 8, (10) Fr. 9, (11) Fr. 10, (12) Fr. 11, (13) Fr. 13, (14) Fr. 15, (15) Fr. 18, (16) Fr. 20, (17) Fr. 23, (18) Fr. 25, (19) Fr. 27, (20) Fr. 29.

Die Fraktionen 11 – 18 wurden gesammelt (ca. 35 ml) und anschließend auf 10 ml ankonzentriert. Danach wurde die DEAE-SHR Säule mit Puffer 4 äquilibriert. Die Probe wurde auf die Säule aufgetragen und mit 4 ml/min eingewaschen. Man ließ ca. 20 min mit Puffer 4 nachwaschen bis man eine Basislinie erhielt. Anschließend startete man einen Gradienten mit Startpuffer 4 nach folgendem Schema:

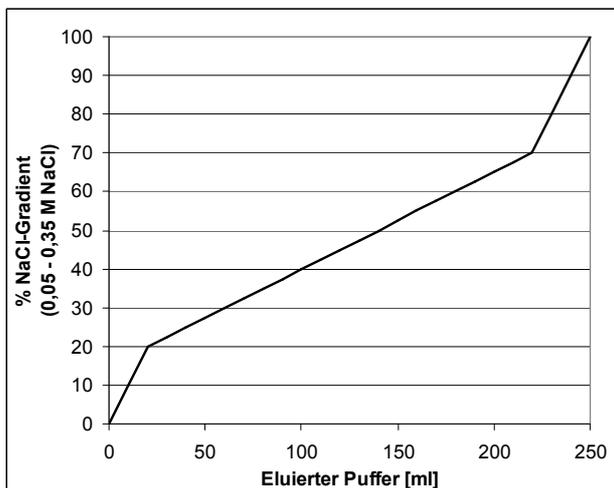


Abb. 3.1.7 Schema des nicht-linearen Gradienten beim 2. Lauf der DEAE-SHR-Säule. Um die Trennleistung zu erhöhen, wurde der Gradient in dem Bereich, in dem die Gelsolin-Elution erwartet wurde flacher eingestellt, um die Trennung von anderen Proteinen zu verbessern.

Es wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Die Fraktionen im Bereich des Schreiberpeaks (Fraktionen 19 – 23) wurden zusammen in ein Gefäß gegeben. Darin befand sich nun das gereinigte Gelsolin. Die Reinheit des Proteins wurde durch eine SDS-PAGE kontrolliert, in der verschiedene Mengen der Proteinlösung aufgetragen wurden.

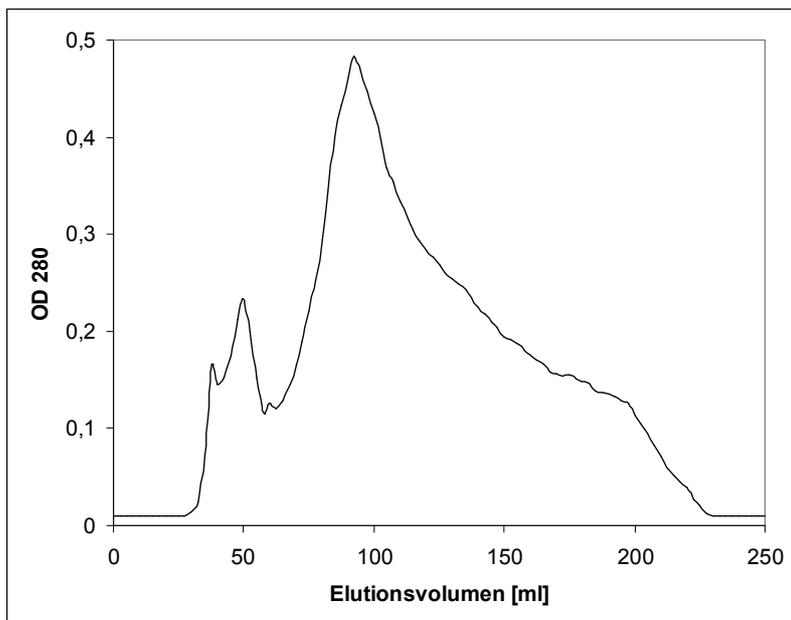


Abb. 3.1.8 Aufreinigung von Gelsolin mittels DEAE-Anionenaustauschchromatographie. Die Proteinlösung wurde nach Dialyse und Klarzentrifugation auf eine DEAE-Säule aufgetragen und anschließend durch den in Abb. 3.1.7 beschriebenen NaCl-Gradienten bei einer Geschwindigkeit von 4 ml/min in einem Gesamtvolumen von 250 ml eluiert.

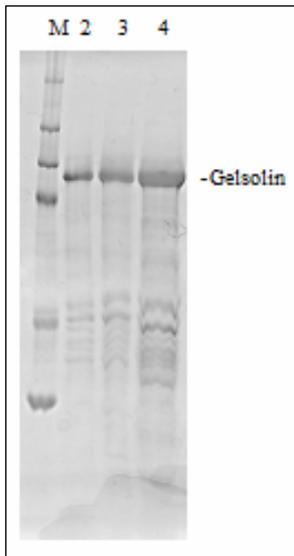


Abb. 3.1.9 SDS-PAGE von ausgewählten Fraktionen des nicht-linearen DEAE-SHR Säulenlaufs. Das Bild zeigt ein mit Coomassie-Blau gefärbtes 12,5 %-iges Polyacrylamidgel. (M) HMW-Molekularmassenstandard, (2) 3 μ l SDS-Probe, (3) 5 μ l SDS-Probe, (4) 15 μ l SDS-Probe.

Wie in Abb. 3.1.9 zu sehen ist lag das Protein nun ankonzentriert und in akzeptabler Reinheit vor. Insbesondere ist zu sehen, dass in dem Größenbereich in dem das Gelsolin vorlag, keine weiteren Proteinbanden zu sehen sind. Die sichtbaren Verunreinigungen hatten ein deutlich geringeres Molekulargewicht, so dass eine spätere Verwechslung auszuschließen war.

3.1.2 Präparation von Tropomyosin aus Glatt- und Skelettmuskel des Schweins

a) Präparation von Glattmuskeltropomyosin aus dem Schweinemagen

Die Aufreinigung wurde wie unter (Methoden) beschrieben durchgeführt. Nachdem zunächst mehrere Waschschriffe durchgeführt wurden, erfolgte eine Extraktion in 1 M KCl, 1 mM DTT, pH 7. Anschließend wurden Proteine durch eine isoelektrische Fokussierung (IP 4,6) abgetrennt. Schließlich wurde durch eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat das Tropomyosin isoliert. Die Endaufreinigung des Tropomyosins erfolgte durch eine TMAE-Fractogel-Anionenaustauschersäule. Der Säulenlauf erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,05 bis 0,35 M NaCl. Das Tropomyosin eluierte dabei bei ca. 0,25 M NaCl (siehe Abb. 3.1.10).

Die Ausbeute aus 500 g eingesetztem Schweinemagen betrug ca. 550 mg gereinigtes Protein. Das aufgereinigte Tropomyosin wurde gegen 30 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM DTT, 10 mM Tris, pH 7,4 dialysiert und konnte so entweder sofort verwendet werden oder bei -80 °C gelagert werden.

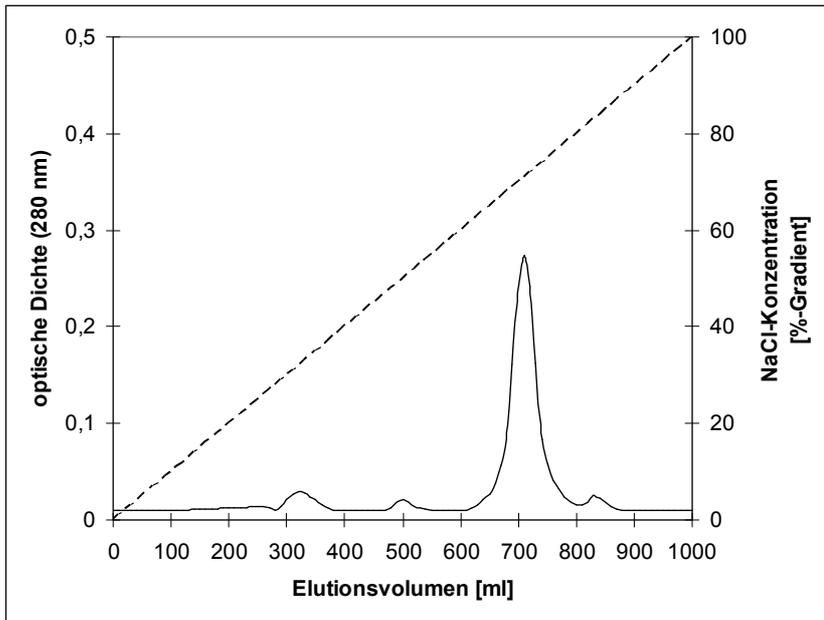


Abb. 3.1.10 Aufreinigung von Schweine-magen-Tropomyosin durch TMAE-Anionenaustauscher-Chromatographie. Die Proteinlösung wurde über einen linearen NaCl-Gradienten (0,05 – 0,35 M NaCl) bei einer Geschwindigkeit von 1 ml/min in einem Gesamtvolumen von 1000 ml eluiert.

Das bei 250 mM NaCl eluierte Protein wurde durch eine SDS-PAGE untersucht. Das entsprechende Protein spaltet sich auf in eine Doppelbande bei etwas über 30 kDa, was gut mit den erwarteten Größen der Tropomyosin-Monomere von 33 kDa und 35 kDa übereinstimmt. Das native Tropomyosin hat ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Es handelt sich dabei aber um ein $\alpha\beta$ -Heterodimer, welches im SDS-Gel in die erwähnten 2 Banden aufspaltet, da das α -TM etwas schneller ins Gel einläuft, als das etwas schwerere β -TM. Das zugehörige Gel ist in der nachfolgenden Abbildung 3.1.11 gezeigt.

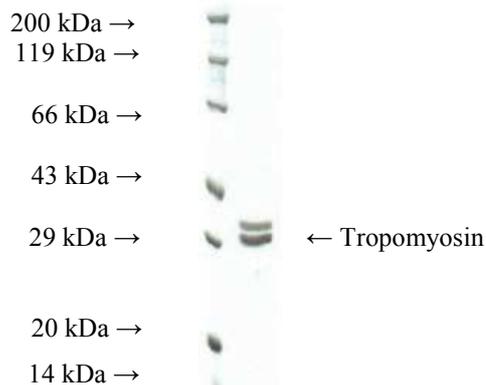


Abb. 3.1.11 SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen des Peaks bei 700 ml des Säulenlaufs. Gezeigt ist ein Coomassie-Blau-gefärbtes 12,5 %-iges PA-Gel. Die erste Spalte zeigt den HMW-Molmassen-Standard, die zweite Spalte die Proteine, der Fraktionen von 650 – 750 ml des Eluats.

b) Präparation von Tropomyosin aus der Skelettmuskulatur des Schweins

Das Skelettmuskel-Tropomyosin wurde aus Aceton-getrocknetem Muskelpulver hergestellt. Die Isolierung entspricht im Prinzip der Glattmuskel-TM-Präparation, nur dass man bei Muskelpulver als Ausgangsmaterial direkt bei der Ammoniumsulfatfällung beginnt. Die Ausbeute aus 10 g eingesetztem Muskelpulver betrug ca. 75 mg. Das aufgereinigte Protein wurde lyophilisiert und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. In Abb. 3.1.12 wird die letzte Stufe der Aufreinigung von Skelettmuskel-Tropomyosin gezeigt, welche durch Aufreinigung über eine TMAE-Säule vorgenommen wurde. Der große Peak bei ca. 700 ml Elutionsvolumen stellt das Tropomyosin dar.

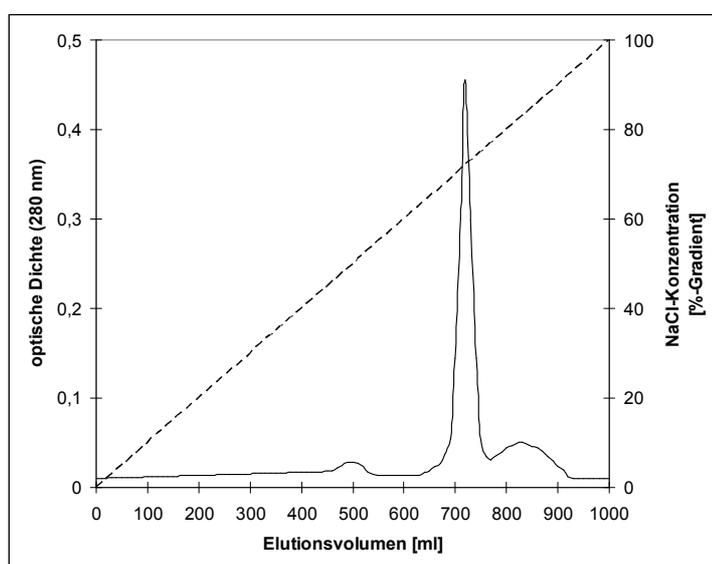


Abb. 3.1.12 Aufreinigung von Schweine-SKM-Tropomyosin durch TMAE-Anionenaustauscher-Chromatographie. Die Proteinlösung wurde über einen 8-stündigen linearen NaCl-Gradienten (0,05 – 0,35 M NaCl) bei einer Geschwindigkeit von 60 ml/h in einem Gesamtvolumen von 1000 ml eluiert.

Die Fraktionen im Bereich dieses Schreiberpeaks wurden zusammengegeben und durch eine SDS-PAGE analysiert. Im Gel sieht man wie beim Glattmuskel-Tropomyosin die Aufspaltung des Heterodimers in eine Doppelbande.

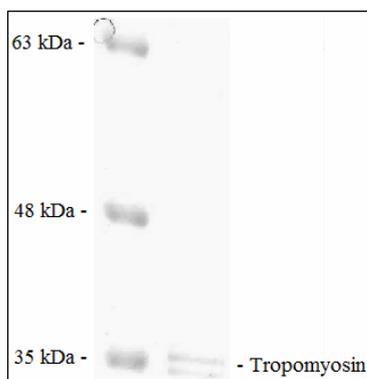


Abb. 3.1.13 SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen des Peaks bei ca. 700 ml des Säulenlaufs. Das Bild zeigt ein mit Coomassie-Blau gefärbtes 12,5 %-iges Polyacrylamidgel. Die Banden der ersten Spalte zeigen einen Molekularmassenstandard, die in der zweiten Spalte sichtbaren Banden zeigen die Proteine, welche sich in den Fraktionen von 650 – 750 ml des Säulenlaufs befanden.

Wie aus Abb. 3.1.13 ersichtlich, befanden sich in den in zusammengegeben Fraktionen des TMAE-Säulenlaufs im Bereich zwischen 650 ml und 750 ml praktisch keine weiteren Proteine außer dem gewünschten Tropomyosin, so dass das Protein in akzeptabler Reinheit vorlag. Das Tropomyosin spaltet wieder, wie erwartet, in seine beiden Monomere (α und β) auf.

3.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

3.2.1 Rekombinantes cytosolisches Wildtyp-Schweinegelsolin

Auf der Grundlage bereits veröffentlichter Sequenzen für die cDNA von Schweinegelsolin (gi: 1951, gi: 164471) wurden Primer entworfen, mit denen der für das Protein codierende Bereich vollständig durch RT-PCR hergestellt werden konnte. Hierbei musste beachtet werden, dass einige Sequenzen noch die N-terminale Extension der plasmatischen Form des Gelsolins enthielten, es sollte hier jedoch ausdrücklich nur die cytosolische Variante des Proteins hergestellt werden, die etwas kürzer ist als die extrazelluläre Form (cytosolisches Schweinegelsolin: 731 AA, codiert durch 2193 bp). Die Primer besaßen darüber hinaus an ihren Enden zusätzlich eingefügte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, die eine Klonierung in einen geeigneten Vektor erleichterten. Direkt vor das Startcodon wurde in diesem Fall eine NdeI-Schnittstelle gelegt und direkt hinter das Stopcodon eine HindIII-Schnittstelle. In Abb. 3.2.1 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte gezeigt. Ausgangsmaterial für die RT-PCR war aus Schweinemagen gewonnene Gesamt-RNA, aus der wie beschrieben (2.3.1 – 2.3.3) zunächst die mRNA aufgereinigt wurde und diese anschließend durch reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben wurde. Mit dieser cDNA wurde dann die beschriebene PCR durchgeführt (Primer und PCR-Protokoll siehe 2.1.10 und 2.3.14). Die amplifizierte DNA wurde dann zunächst in einen „pCR[®]2.1-TOPO[®] Cloning“ Vektor zwischenkloniert und dieser anschließend in *E.coli* Bakterien des DH5-Stamms transformiert. Positive Transformanden wurden über Blau-Weiß-Selektion identifiziert und deren Plasmide über eine Kontroll-Restriktionsspaltung und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das Insert bei positiv getesteten Plasmiden durch Restriktionsspaltung herausgeschnitten und in einen pET21a(+)-Expressionsvektor umkloniert. Dieser wurde dann in den *E.coli*-Expressionsstamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert und positive Klone über Antibiotikaselektion, Colony-Blot und Colony-PCR identifiziert. Die Verwendung des genannten Expressionsstamms hatte den Vorteil, dass

dieser über zusätzliche Kopien der Gene *argU*, *ileY*, *leuW* und *proL* wodurch die Anzahl der durch diese Gene codierten tRNAs, welche in *E. coli* normalerweise selten vorkommen, erhöht wurde. Da eine Analyse der „codon usage“ gezeigt hatte, dass das zu exprimierende Protein eine ganze Reihe von in *E. coli* selten verwendeten Codons besaß, wurden so vorzeitige Kettenabbrüche während der Expression und eine damit einhergehende Verringerung der Expressionsrate verhindert.

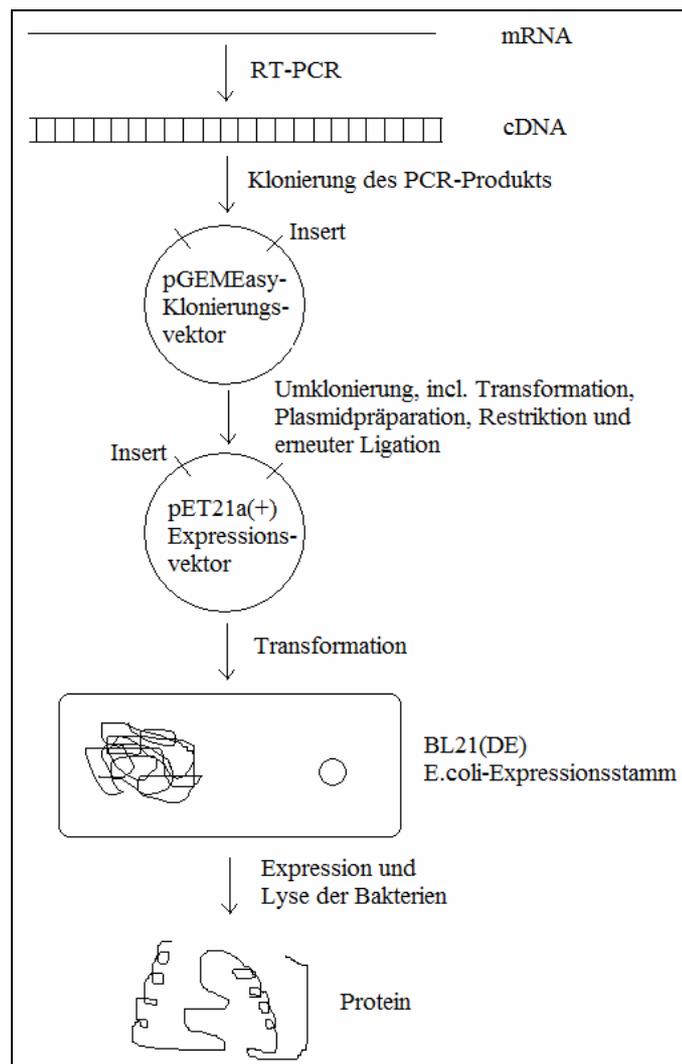


Abb. 3.2.1 Flussdiagramm des Arbeitsablaufs bei der Klonierung und Expression des wt-Gelsolins. Die durch RT-PCR gewonnene cDNA wurde zunächst in den pGEMEasy-Klonierungsvektor ligiert, welcher in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert, vermehrt, präpariert und restringiert wurde. Nach Restriktion der DNA mit den Endonucleasen NdeI und HindIII wurde das Insert in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Expressionsvektor pET21a(+) umklont. Dieses Expressionsvektorkonstrukt wurde dann in den *E. coli*-Expressionsstamm transformiert und die eigentliche Expression durchgeführt.

Sowohl der Klonierungsvektor als auch der Expressionsvektor wurden nach erfolgter Einfügung des Inserts sequenziert. Es wurden keine Abweichungen zu den veröffentlichten Sequenzen festgestellt. (Die Sequenz des Inserts befindet sich im Anhang).

Die Expression selbst wurde wie unter 2.2.7 beschrieben durchgeführt und das Protein wie dort beschrieben aufgereinigt. Das wt-Gelsolin konnte als lösliches Protein erhalten werden und bildete keine Einschlusskörper. Die Aufreinigung beinhaltete die unter 2.2.7 beschriebenen Chromatographien mit der DEAE-CL6B- und der MonoQ-Säule. Danach lag das Protein in gewünschter Reinheit vor. Es wurde eine Ausbeute von ca. 40 mg Protein pro eingesetztem Liter Bakterienkultur erzielt.

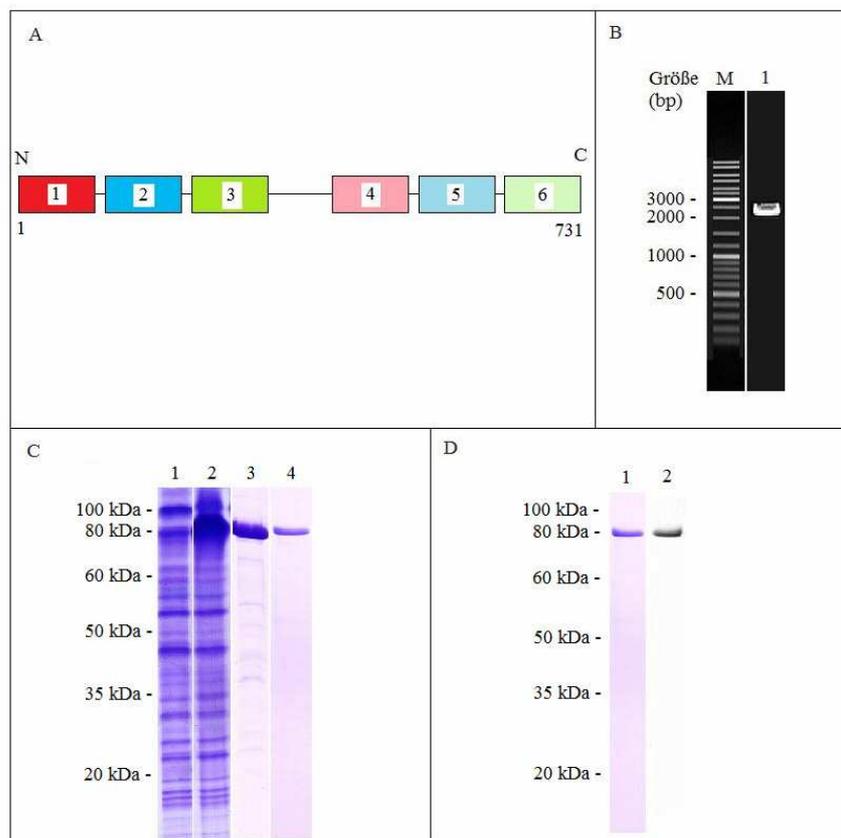


Abb. 3.2.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung von wt-Gelsolin. (A): Schema des exprimierten Konstrukts. Gezeigt ist die Struktur aus 6 Domänen in der Orientierung vom N- zum C-Terminus des Proteins, sowie die nummerierte erste und letzte AS des Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule. (D): (1) Gezeigt ist das gereinigte Protein in SDS-PAGE, (2) Kontrolle durch Western-Blot zur Identifizierung des Proteins.

3.2.2 Klonierung und Expression von Deletionsmutanten des Schweinegelsolins

Für Funktionsstudien wurden mit dem vorhandenen wt-Gelsolinkonstrukt *in vitro*-Mutagenesen durchgeführt, um bestimmte Regionen aus dem wt-pgs zu deletieren. Mit Hilfe der dadurch erzeugten Konstrukte sollte untersucht werden, welche Regionen des Gelsolins für die Interaktionen mit Aktin und Tropomyosin verantwortlich sind. Meistens wurden hierbei eine oder mehrere ganze Domänen, des aus insgesamt 6 homologen Strukturdomänen bestehenden Gelsolins deletiert. Aus fertig gestellten C-terminal verkürzten Mutanten wurden jedoch noch weitere Subdomänen deletiert, so dass einige Konstrukte nur aus Teilen einer Domäne bestehen. Hierbei wurden meistens größere Subdomänenstrukturen und Sekundärstrukturelemente wie α -Helices oder β -Faltblätter entfernt. Für die Isolierung der einzelnen exprimierten Proteine wurde jeweils ein individuelles Aufreinigungsprotokoll entwickelt, da im Rahmen dieser Arbeit auf die Verwendung von an den Proteinen angefügten Tags verzichtet wurde, um sicher zu stellen, dass die Proteine möglichst in ihrer natürlichen Konformation vorliegen und bei der Faltung der Proteinkette in keiner Weise von zusätzlichen, künstlich angefügten, Sequenzen beeinflusst werden.

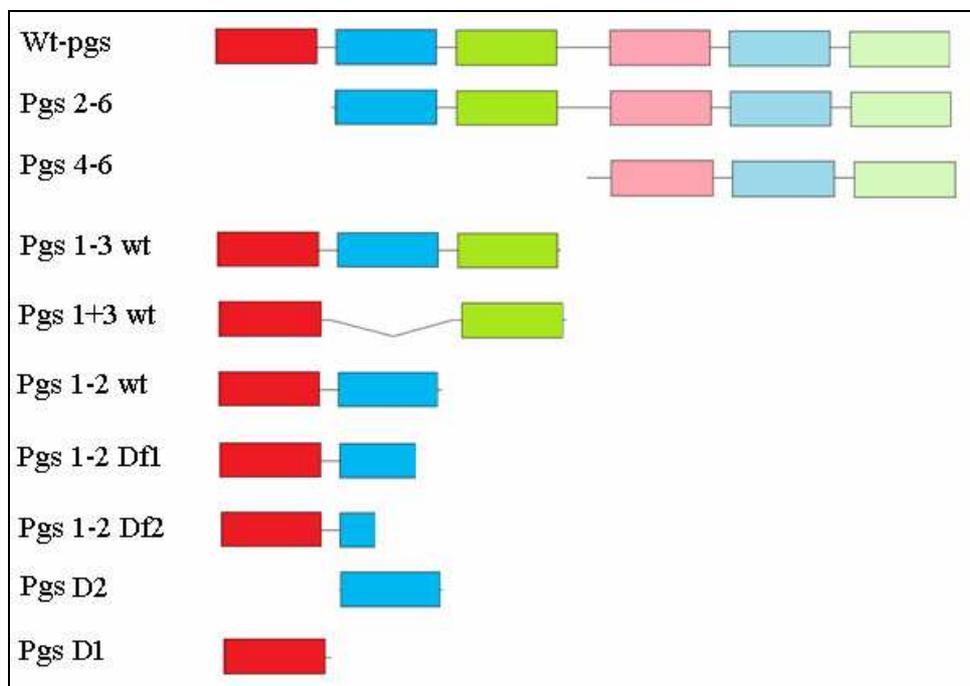


Abb. 3.2.3 Übersicht über die durch *in vitro*-Mutagenese erstellten Gelsolinkonstrukte. Durch *in vitro* Mutagenesen wurden Deletionsmutanten von wt-pgs generiert, denen einzelne Domänen oder Teile davon fehlen.

Die nachfolgenden Abbildungen 3.2.4 bis 3.2.12 beschreiben die verschiedenen hergestellten Deletionsmutanten des Gelsolins. Dabei ist unter A jeweils ein Schema des betreffenden Konstrukts gezeigt, B zeigt das Amplifizierungsprodukt der jeweiligen PCR-Reaktion und C dokumentiert die Aufreinigung des Proteins von der Expressionskontrolle über die jeweiligen verwendeten chromatographischen Aufreinigungen, die wie in 2.2.7 beschrieben durchgeführt wurden, bis zur letzten Aufreinigungsstufe, die schließlich für die weiterführenden Experimente verwendet wurde. In der darauf folgenden Tabelle 3.2.1 sind die für die verschiedenen Konstrukte verwendeten Primer, sowie die Ausbeuten der Präparationen angegeben.

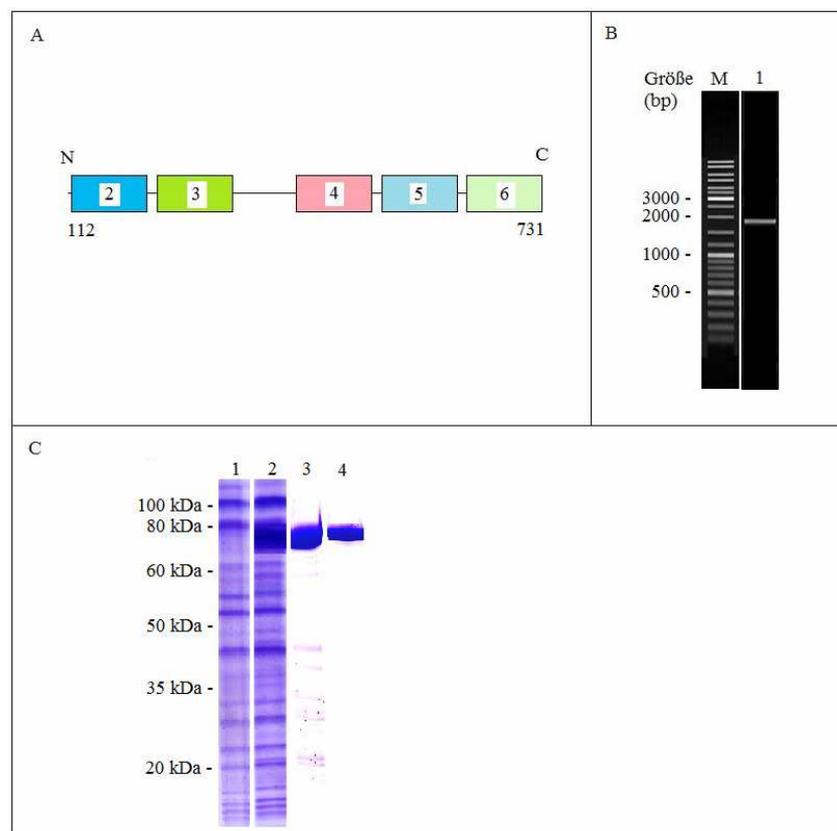


Abb. 3.2.4 Klonierung, Expression und Aufreinigung von pgs2-6. (A): Schema des exprimierten Konstrukts. Gezeigt ist die Struktur in der Orientierung vom N- zum C-Terminus des Proteins, sowie die nummerierte erste und letzte AS des Konstrukts entsprechend der Nummerierung des wt-pgs. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule.

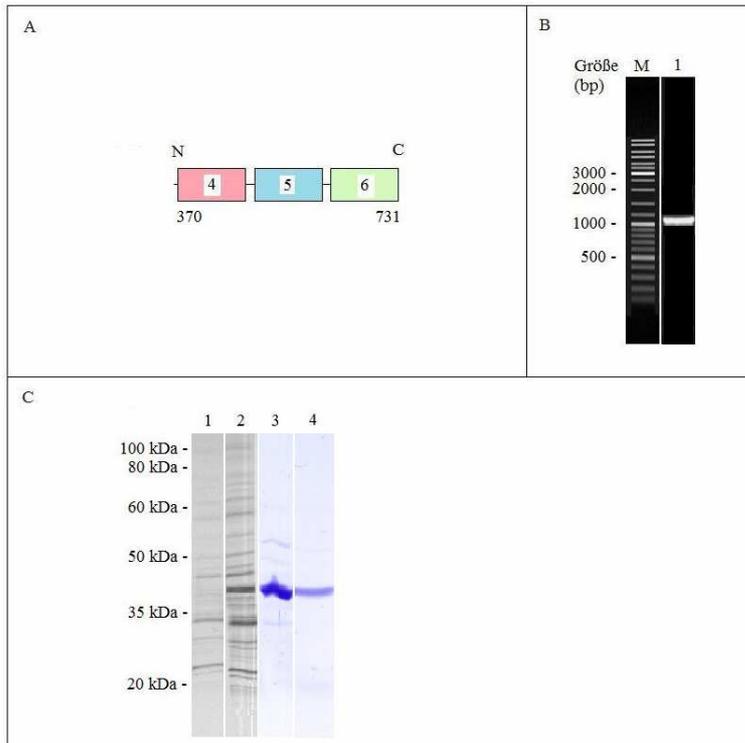


Abb. 3.2.5 Klonierung, Expression und Aufreinigung von pgs4-6. (A): Schema des Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt Konstrukts. (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassiegefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach TMAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule.

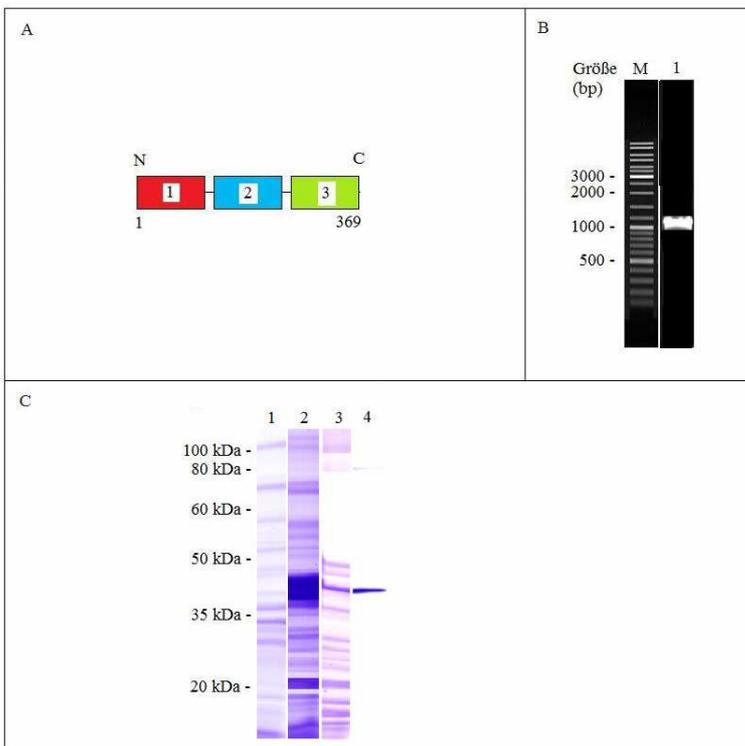


Abb. 3.2.6 Klonierung, Expression und Aufreinigung von pgs1-3. (A): Schema des Konstrukts. Gezeigt ist die Struktur in der Orientierung vom N- zum C-Terminus des Proteins, sowie die nummerierte erste und letzte AS des Konstrukts entsprechend der Nummerierung des wt-pgs. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassiegefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule.

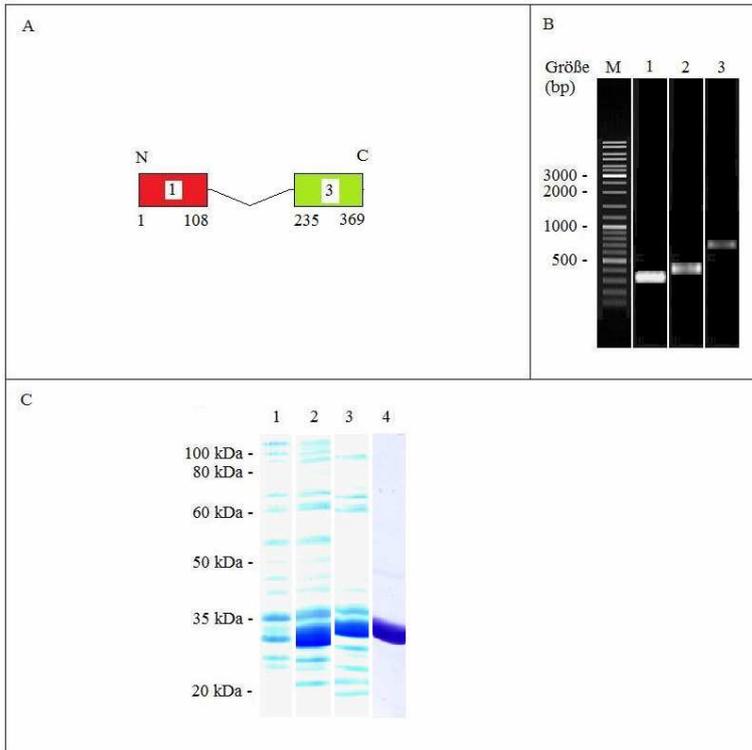


Abb. 3.2.7 Klonierung, Expression und Aufreinigung von pgs1+3. (A): Schema des Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt von Domäne 1, in (2) PCR Produkt von Domäne 3 und in (3) das Fusionsprodukt, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Überstand nach Ultraschalllyse und (4) Aufreinigung nach DEAE-Säule.

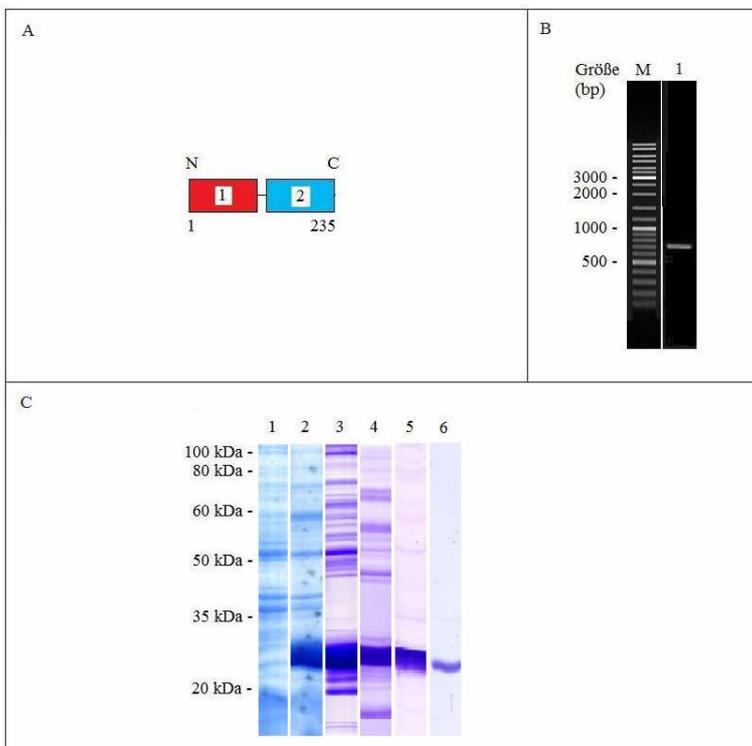


Abb. 3.2.8 Klonierung, Expression und Aufreinigung von pgs1-2. (A): Schema des Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule, (5) Aufreinigung nach TMAE-Säule und (6) Aufreinigung nach Gelfiltration.

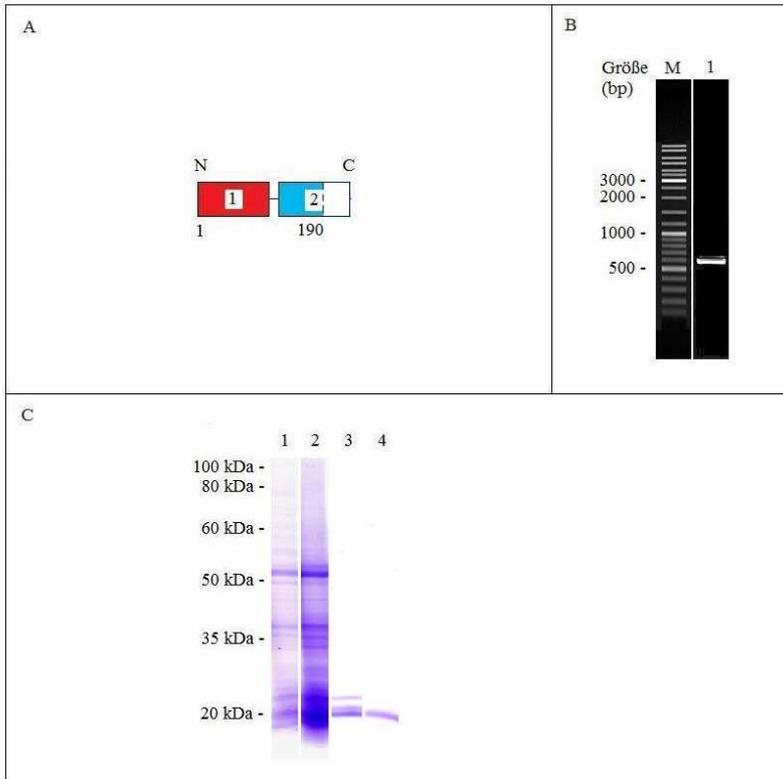


Abb. 3.2.9 Klonierung, Expression und Aufreinigung von pgs1-2Df1. (A): Schema des Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule.

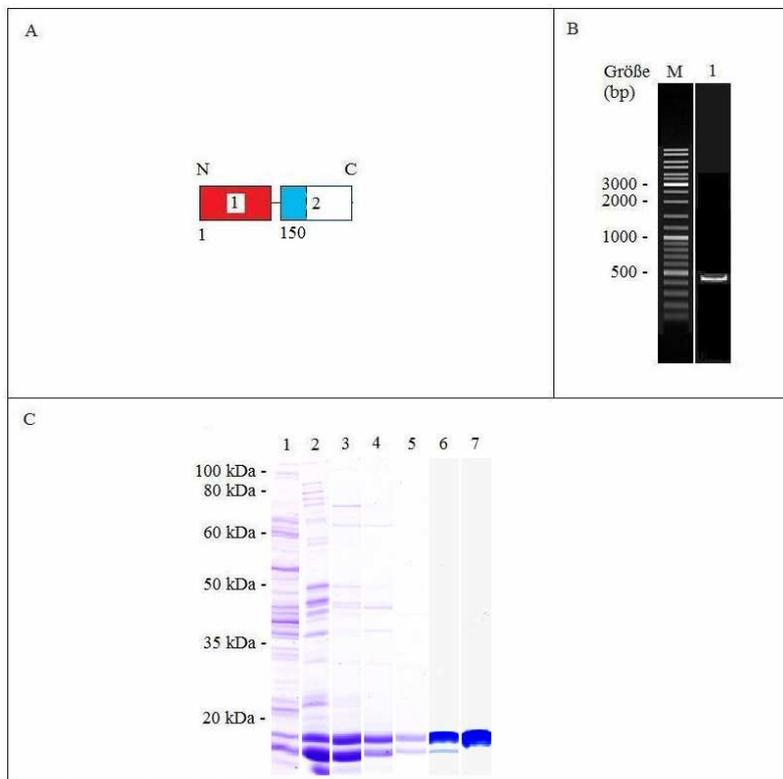


Abb. 3.2.10 Klonierung, Expression und Aufreinigung von pgs1-2Df2. (A): Schema des Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule, (5) Aufreinigung nach TMAE-Säule, (6) Aufreinigung nach MonoS-Säule und (7) Aufreinigung nach Gelfiltration.

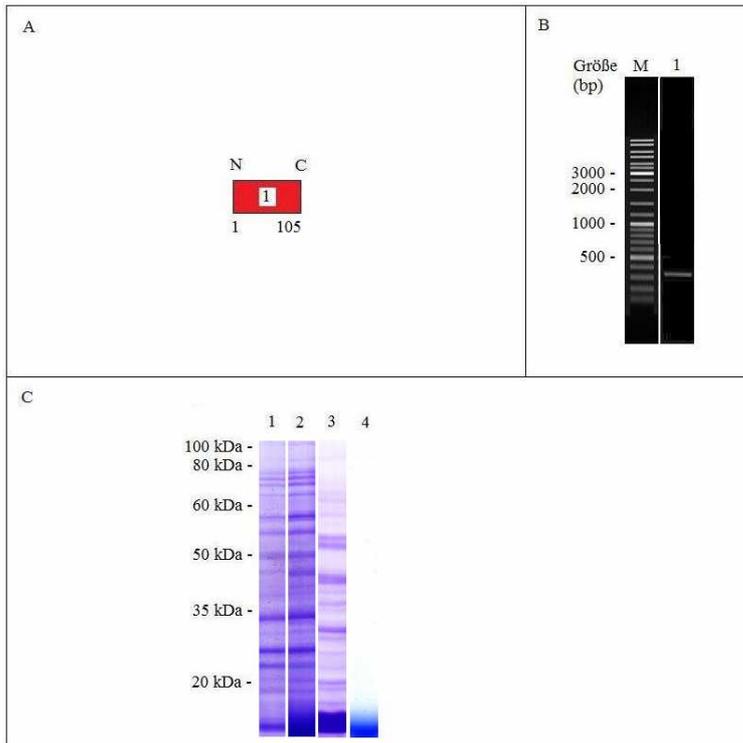


Abb. 3.2.11 Klonierung, Expression und Aufreinigung von pgsD1. (A): Schema des Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule.

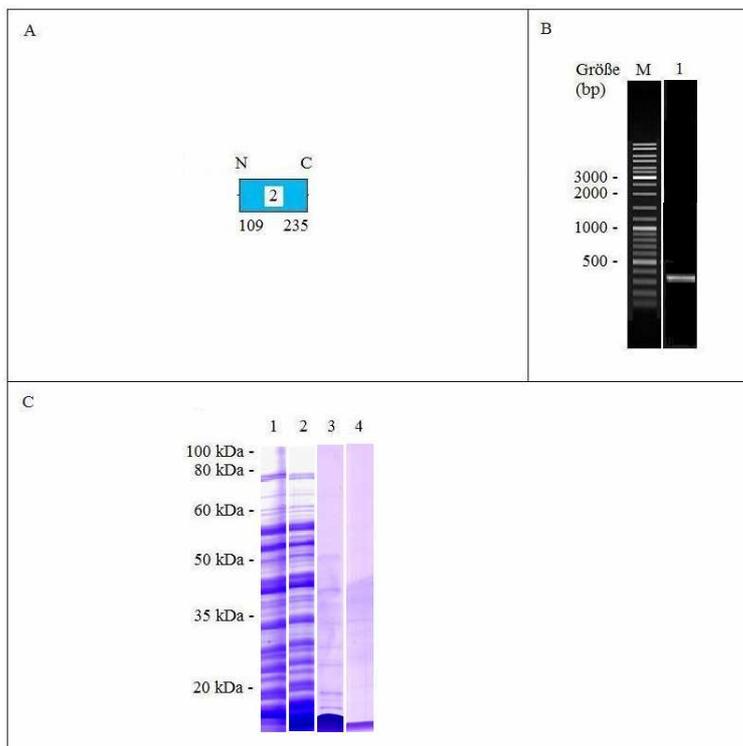


Abb. 3.2.12 Klonierung, Expression und Aufreinigung von pgsD2. (A): Schema des Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule.

Konstrukt	5'-Primer	3'-Primer	Ausbeute [mg/l Bakterienkultur]
pgs2-6	gsd2-fw	pgs-rev	20
pgs4-6	gsd4-fw	pgs-rev	15
pgs1-3	pgs-fw	gsd3-rev	50
pgs1+3	pgs-fw gsd3-fw	gsd1-rev gsd3-rev	80
pgs1-2	pgs-fw	gsd2-rev	30
pgs1-2Df1	pgs-fw	gsdf1-rev	40
pgs1-2Df2	pgs-fw	gsdf2-rev	30
pgsD1	pgs-fw	gsd1-rev	60
pgsD2	gsd2-fw	gsd2-rev	75

Tab. 3.2.1 Übersicht über die verwendeten Primer und Expressionsausbeuten der Gelsolin-Konstrukte.

3.2.3 Rekombinantes Wildtyp-Glattmuskeltropomyosin α des Schweins

Auf der Grundlage bereits veröffentlichter Sequenzen für die cDNA von Schweineglattmuskeltropomyosin α (gi:100037999) wurden Primer entworfen, mit denen der für das Protein codierende Bereich vollständig durch RT-PCR hergestellt werden konnte. In Abb. 3.2.11 ist die gelelektrophoretische Analyse des PCR-Produkts gezeigt. Ausgangsmaterial für die RT-PCR war aus Schweinemagen gewonnene Gesamt-RNA, aus der wie beschrieben (2.3.1 – 2.3.3) zunächst die mRNA aufgereinigt wurde und diese anschließend durch reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben wurde. Mit dieser cDNA wurde dann die beschriebene PCR durchgeführt (Primer und PCR-Protokoll siehe 2.1.10 und 2.3.14). Die amplifizierte DNA wurde dann zunächst in einen TOPO[®] Cloning“ Vektor zwischenkloniert, in einen Expressionsvektor umkloniert und dieser dann in den *E.coli*-Expressionsstamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert. Positive Klone wurden über Antibiotikaselektion, Colony-Blot und Colony-PCR identifiziert.

Der Expressionsvektor wurde nach erfolgter Einfügung des Inserts sequenziert. Es wurden keine Abweichungen zu der veröffentlichten Sequenz festgestellt.

Die Expression selbst wurde wie unter 2.2.7 beschrieben durchgeführt und das Protein wie dort beschrieben aufgereinigt. Das wt-Tropomyosin α (pTM α) konnte als lösliches Protein erhalten werden und bildete keine Einschlusskörper. Die Aufreinigung beinhaltete die unter 2.2.7 beschriebenen Chromatographien mit der DEAE-CL6B- und der MonoQ-Säule sowie eine anschließende Gelfiltration. Danach lag das Protein in gewünschter Reinheit vor. Es wurde eine Ausbeute von ca. 50 mg Protein pro eingesetztem Liter Bakterienkultur erzielt.

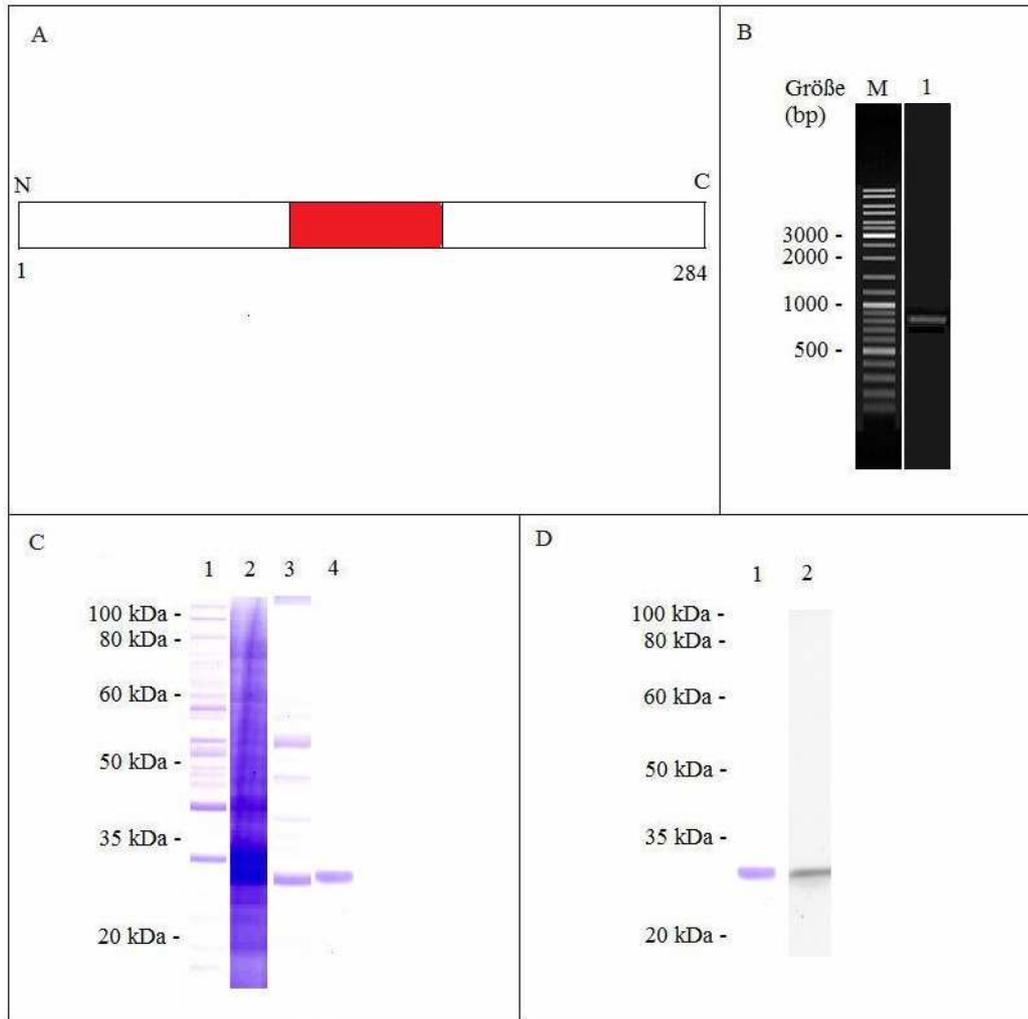


Abb. 3.2.13 Klonierung, Expression und Aufreinigung von wt-Glattmuskeltropomyosin α .

(A): Schema des exprimierten Proteins. Gezeigt ist das Protein in voller Länge mit einigen Längenmarkierungen in der Orientierung vom N- zum C-Terminus des Proteins, sowie die nummerierte erste und letzte AS. Außerdem gezeigt ist der Mittelteil, der in allen anderen $TM\alpha$ -Varianten ebenfalls vorhanden sein muss, um die Expression eines richtig gefalteten Proteins sicher zu stellen. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule, (5) Aufreinigung nach Gelfiltration. (D): (1) Gezeigt ist das gereinigte Protein in SDS-PAGE, (2) Kontrolle durch Western-Blot zur Identifizierung des Proteins.

3.2.4 Klonierung und Expression von Deletionsmutanten des Tropomyosin α

Um weiterführende Funktionsstudien durchführen zu können und insbesondere um potentielle Bindestellen des Tropomyosins mit Gelsolin weiter einengen zu können, wurden mit dem wt-Tropomyosin-Konstrukt *in vitro*-Mutagenesen durchgeführt. Da Tropomyosin keine Subdomänenstruktur wie das Gelsolin besitzt, sondern im Prinzip aus einer einzigen langen α -Helix als Strukturmotiv besteht, konnten hier nicht so einfach strukturell definierte Strukturen deletiert werden. Statt dessen wurde das Moleküle zunächst einmal ungefähr in zwei Hälften geteilt, wobei es notwendig war, eine bestimmte Region in der Mitte des Tropomyosins nicht anzutasten, weil das entstehende Produkt sonst immer denaturiert und vollständig inaktiv vorliegt. Die Gründe dafür sind nicht genau bekannt. Dieser Bereich wird jedoch von den Exons 5, 6 und 7 codiert, die bei allen α -TMs, unabhängig davon ob es sich um SKM- oder GM-Isoformen handelt, vorhanden sind. Außerdem ist bekannt, dass die Aminosäure Cys¹⁹⁰, die ebenfalls in dieser Region liegt eine Disulfidbrücke ausbildet, die das Dimer stabilisiert. Anschließend wurde die N-terminale Hälfte, die in Funktionstests im Gegensatz zur C-terminalen Hälfte eine Aktivität gezeigt hatte (siehe unten) weiter verkürzt, um mögliche Bindestellen noch weiter einengen zu können. Für die Isolierung der einzelnen exprimierten Proteine wurde jeweils ein individuelles Aufreinigungsprotokoll entwickelt, da auch bei diesen Proteinen auf die Verwendung von angefügten Tags verzichtet wurde, damit die Proteine möglichst in ihrer natürlichen Konformation vorliegen.



Abb. 3.2.14 Übersicht über die durch *in vitro*-Mutagenese hergestellten Tropomyosinkonstrukte. Durch *in vitro* Mutagenesen wurden Deletionsmutanten von wt-pTM α generiert.

Die nachfolgenden Abbildungen 3.2.15 bis 3.2.18 beschreiben die verschiedenen hergestellten Deletionsmutanten des Tropomyosin α . Dabei ist unter A jeweils ein Schema des betreffenden Konstrukts gezeigt, B zeigt das Amplifizierungsprodukt der jeweiligen PCR-Reaktion und C dokumentiert die Aufreinigung des Proteins von der Expressionskontrolle über die jeweiligen verwendeten chromatographischen Aufreinigungen, die wie in 2.2.7 beschrieben durchgeführt wurden, bis zur letzten Aufreinigungsstufe, die schließlich für die weiterführenden Experimente verwendet wurde. In der darauffolgenden Tabelle 3.2.2 sind die für die verschiedenen Tropomyosin-Konstrukte verwendeten Primer, sowie die Ausbeuten der Präparationen angegeben.

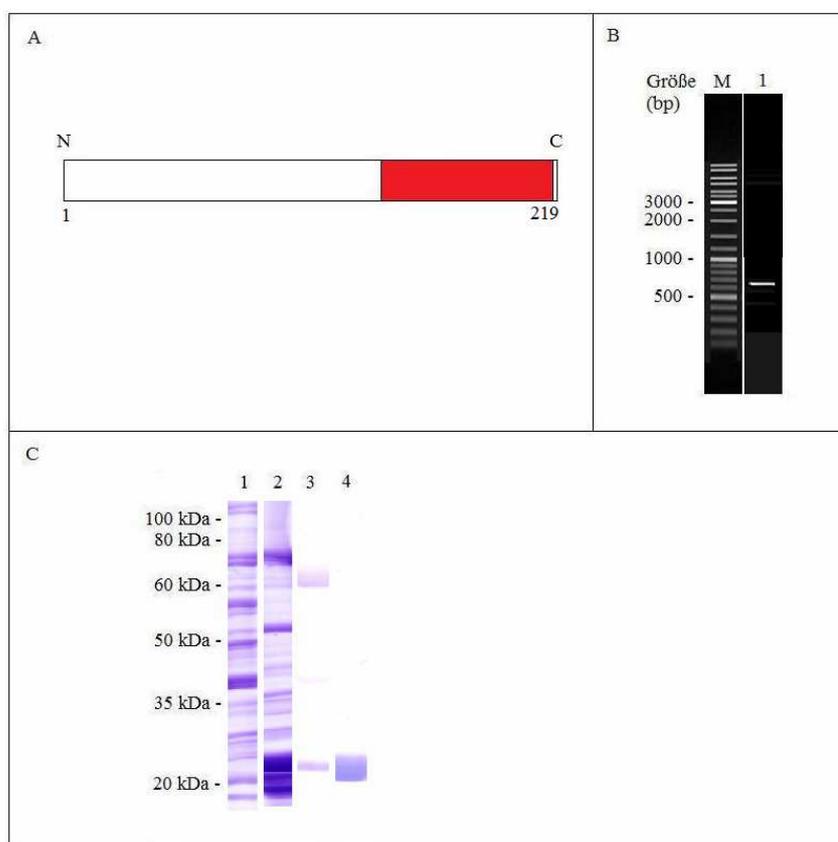


Abb. 3.2.15 Klonierung, Expression und Aufreinigung von TM α F1. (A): Schema des exprimierten Konstrukts. Gezeigt ist die Struktur in der Orientierung vom N- zum C-Terminus des Proteins, sowie die nummerierte erste und letzte AS des Konstrukts entsprechend der Nummerierung des wt-pTM α . (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach TMAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule.

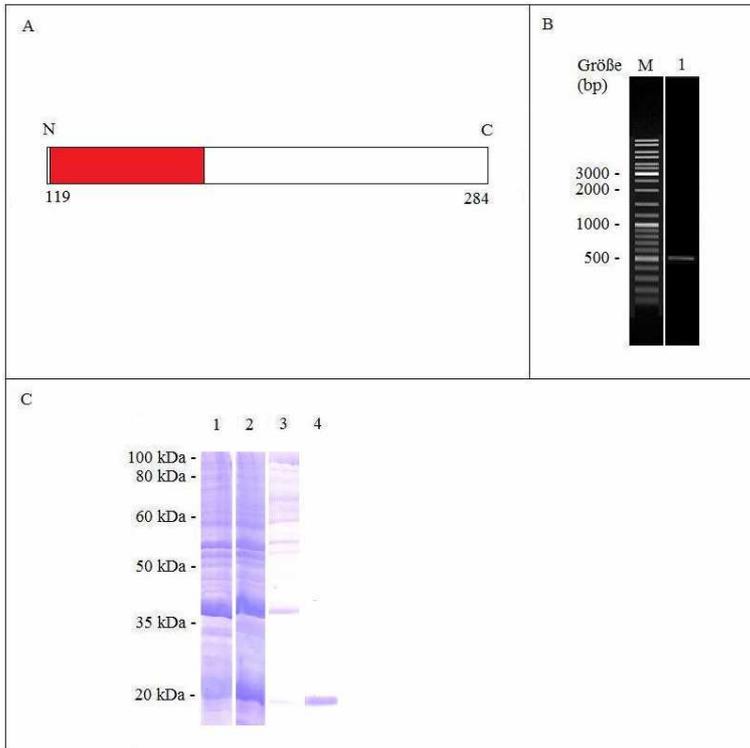


Abb. 3.2.16 Klonierung, Expression und Aufreinigung von TM α F2. (A): Schema des exprimierten Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach TMAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule.

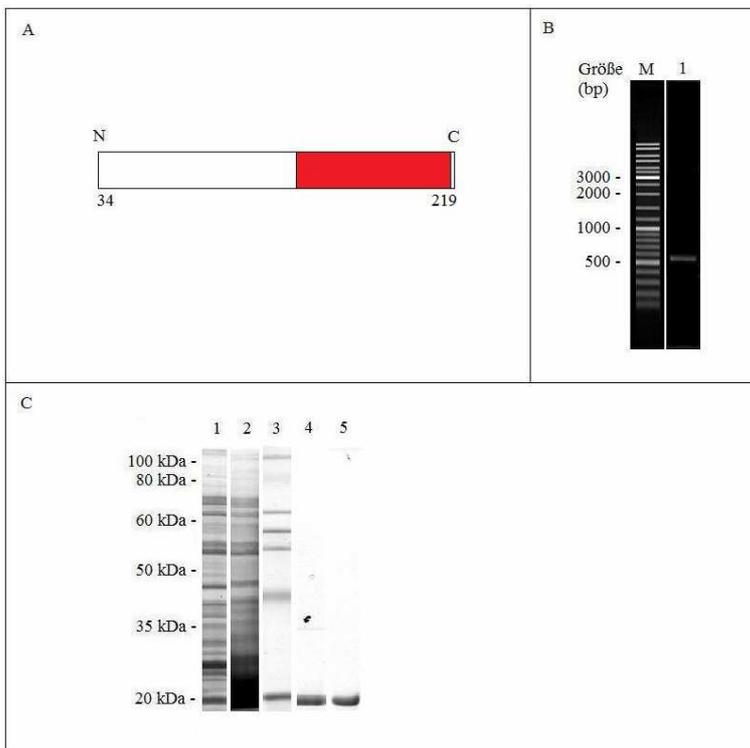


Abb. 3.2.17 Klonierung, Expression und Aufreinigung von TM α F1/101. (A): Schema des exprimierten Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Aufreinigung nach TMAE-Säule, (4) Aufreinigung nach MonoQ-Säule, (5) Aufreinigung nach Gelfiltration.

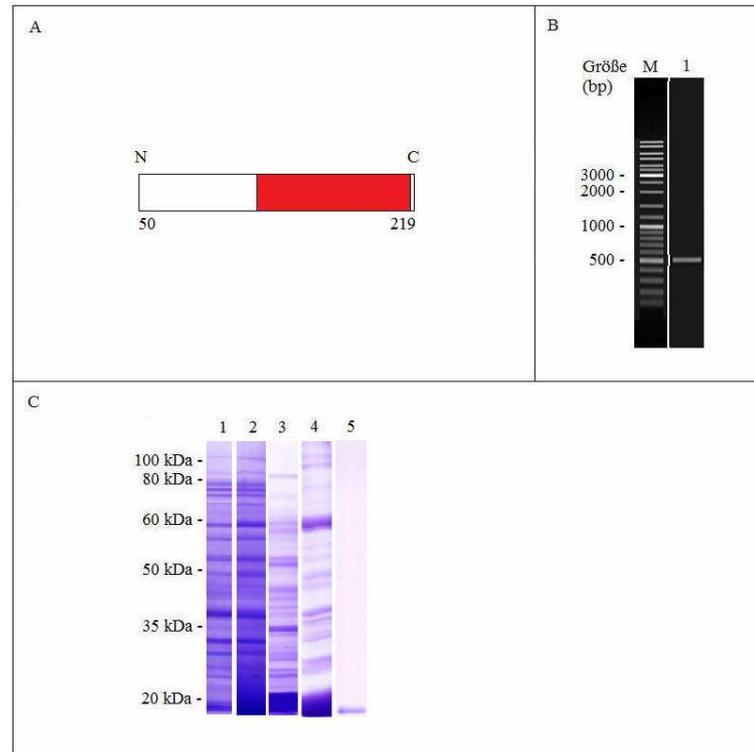


Abb. 3.2.18 Klonierung, Expression und Aufreinigung von TM α F1/150. (A): Schema des exprimierten Konstrukts. (B): (1 %-ige Agarosegele, EtBr-Färbung) Das Gel zeigt in (1) das PCR-Produkt des in (A) gezeigten Konstrukts, sowie einen Marker (M). (C): (12,5 %-ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt) Gezeigt sind (1) Expressionskontrolle vor Induktion, (2) Expressionskontrolle 3 h nach Induktion, (3) Überstand nach Ultraschalllyse, (4) Aufreinigung nach DEAE-Säule, (5) Aufreinigung nach MonoQ-Säule.

Konstrukt	5'-Primer	3'-Primer	Ausbeute [mg/l Bakterienkultur]
TM α F1	tma-fw	tmaf1-rev	35
TM α F2	tmaf2-fw	tma-rev	25
TM α F1/101	tma101-fw	tmaf1-rev	60
TM α F1/150	tma150-fw	tmaf1-rev	35

Tab. 3.2.2 Übersicht über die verwendeten Primer und Expressionsausbeuten der Tropomyosin α -Konstrukte.

3.3 Untersuchung der Faltung der rekombinanten Proteine durch CD-Spektroskopie

Um zu untersuchen, ob die rekombinanten Proteine richtig gefaltet waren und auch um zu überprüfen, ob die Faltung der rekombinanten wt-Proteine der Faltung der nativ präparierten Proteine entsprach, wurden Messungen mit einem Circular dichroismus (CD) -Spektrometer vorgenommen. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette bei Wellenlängen zwischen 190 nm und 250 nm. Anschließend wurden die Messungen mit Hilfe der zum Gerät (JASCO 710) gehörenden Software ausgewertet.

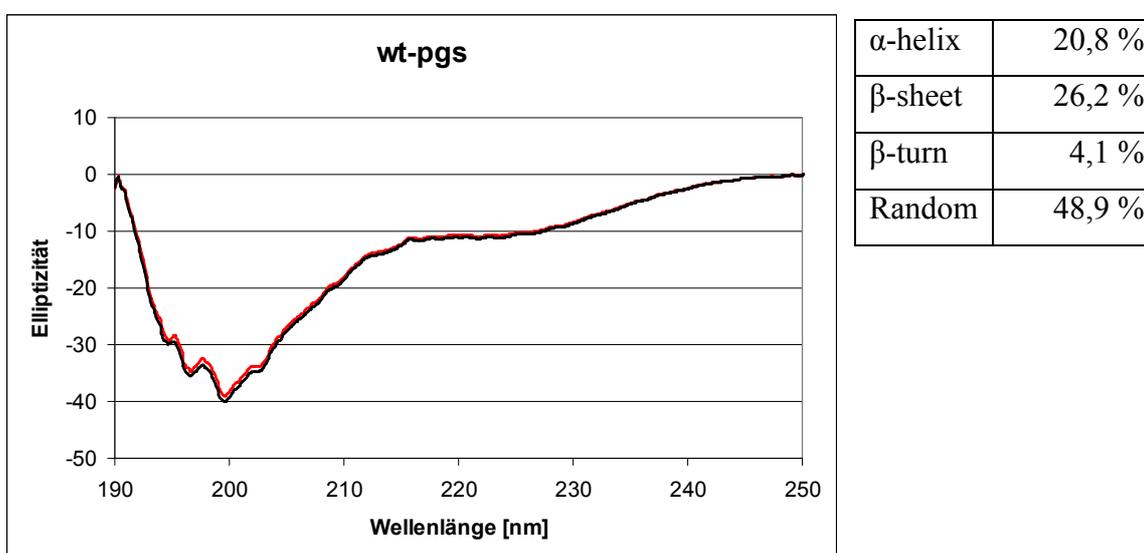


Abb. 3.3.1 CD-Spektrogramm von wt-pgs. Das Protein wurde in 10 mM Na_2HPO_4 , 5 mM NaCl, pH 7,4 bei 25 °C gemessen. Die schwarze Messkurve stellt die Messung für natives Gelsolin dar, während die rote Kurve dem rekombinanten Protein entspricht. Die nebenstehende Tabelle gibt die ermittelten Prozentsätze für die Sekundärstrukturelemente an.

Wie man in Abb. 3.3.1 sehen kann, sind die Kurven der beiden Proteine fast identisch, wenn sie unter gleichen Bedingungen (Puffer, Temperatur etc.) gemessen werden.

Es wurden darüber hinaus noch weitere Messungen mit Gelsolinmutanten gemacht. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

	pgs1-3	pgs1-2
α -helix	17,1 %	18,7 %
β -sheet	27,7 %	28,9 %
β -turn	4,9 %	2,8 %
Random	50,3 %	50,6 %

Tab. 3.3.1 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Circular dichroismus-Messungen für einige Gelsolinmutanten.

Alle Messungen stimmen gut mit bereits bekannten Strukturdaten für Gelsolin überein, so dass man davon ausgehen kann, dass die präparierten Proteine richtig gefaltet sind. Dies ergänzt die Funktionstests, die für fast alle präparierten Proteine eine Aktivität zeigen, die den vorhandenen Strukturen entspricht.

In der folgenden Abbildung (3.3.2) ist die CD-Messung des wt-TM α gezeigt, welche sich auf charakteristische Weise von der Gelsolin-Messung unterscheidet, da Tropomyosine fast nur α -Helices als Strukturmotiv haben.

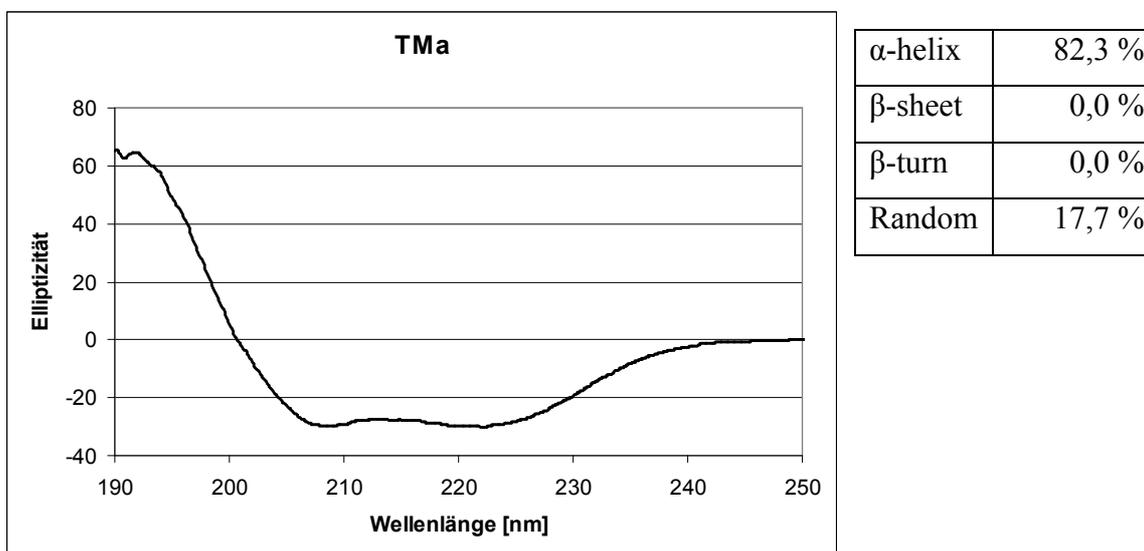


Abb. 3.3.2 CD-Spektrogramm von TM α . Das Protein wurde in 10 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaCl, pH 7,4 bei 25 °C gemessen.

Auch die Messung von Tropomyosin α ergab, dass das Protein korrekt gefaltet ist. Wenn man die Messkurve mit einer Datenbank abgleicht (hier Yang-Referenzdatenbank für CD-Spektren) ergibt sich ein fast identisches Faltungsmuster für andere Proteine, die auch

ausschließlich aus α -Helices bestehen. Der direkte Vergleich mit dem nativ präparierten Protein wurde hier nicht durchgeführt, da das rekombinant exprimierte Protein ein Homodimer aus α -Monomeren ist, das nativ präparierte Glattmuskel-Tropomyosin jedoch ein $\alpha\beta$ -Heterodimer. Große Unterschiede wären jedoch auch hier nicht zu erwarten, da alle korrekt gefalteten Tropomyosine fast ausschließlich α -Helices als Strukturelemente enthalten. Statt dessen wurden noch weitere Messungen mit einigen Tropomyosin α -Mutanten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.2 in Form einer Tabelle dargestellt.

	TM α F1	TM α F2
α -helix	85,7 %	81,1 %
β -sheet	0,0 %	0,0 %
β -turn	0,0 %	0,0 %
Random	14,3 %	18,9 %

Tab. 3.3.2 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Circular dichroismus-Messungen für einige Tropomyosin-Mutanten.

Auch diese Messungen stimmen gut mit bereits bekannten Strukturdaten überein, so dass man davon ausgehen kann, dass die präparierten Proteine in der nativen Konformation vorliegen und richtig gefaltet sind. Auch sind die Messergebnisse für die verschiedenen Tropomyosinvarianten recht ähnlich. Die geringen Unterschiede könnten darin begründet sein, dass die Moleküle am N- und am C-Terminus Bereiche besitzen, die noch nicht zur α -Helix gehören und je nachdem ob sie beide oder allein im Molekül auftauchen, leicht unterschiedliche Messergebnisse erzeugen.

3.4 Bestimmung der Aktivitäten der aufgereinigten Proteine

3.4.1 Untersuchung der Bindungsfähigkeit der Schweinegelsolin-Varianten an F-Aktin durch Kosedimentation

Durch diese Methode lassen sich Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den aufgereinigten Gelsolin-Varianten und F-Aktin direkt nachweisen. Diese Wechselwirkung ist, so vorhanden, die Grundlage für eine eventuell vorhandene Nukleations- oder Fragmentationsaktivität des Gelsolins. Da das Gelsolin, nachdem es ein F-Aktin-Filament geschnitten hat, an einem der beiden entstehenden kürzeren Filamente gebunden bleibt, kann man das Gelsolin zusammen mit den F-Aktin-Filamenten abzentrifugieren. Besonders gut funktioniert dieser Test, wenn ausreichend viele, recht lange F-Aktin-Filamente im Ansatz vorhanden sind und die Konzentration von Gelsolin nicht zu hoch gewählt wird, so dass die geschnittenen und dann durch Gelsolin gecappten Filamente noch ausreichend lang und schwer sind um gut abzentrifugiert werden zu können. Die Kosedimentation wurde wie beschrieben (2.2.12) durchgeführt. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die erhaltenen Überstände und Proteinpellets voneinander getrennt und durch SDS-PAGE untersucht. In Abb. 3.4.1 sind die Gelsolinformen gezeigt, welche mit F-Aktin kosedimentieren.

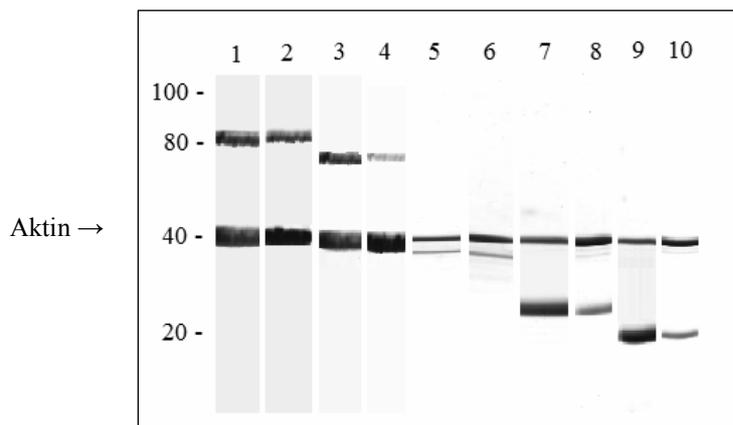


Abb. 3.4.1 Kosedimentation von F-Aktin und verschiedenen Varianten von Glattmuskel-Gelsolin. Das Bild zeigt Ausschnitte einer gelelektrophoretischen Analyse. Überstand und Pellet wurden nach erfolgter Zentrifugation getrennt und durch SDS-PAGE miteinander verglichen. Die Proben wurden in einem 12,5 %-igen Gel aufgetrennt. (1) + (2) Überstand und Pellet wt-pgs, (3) + (4) Überstand und Pellet pgs2-6, (5) + (6) Überstand und Pellet pgs1-3, (7) + (8) Überstand und Pellet pgs1-2, (9) + (10) Überstand und Pellet pgs1-2Df1. Die Beschriftung links des Bildes gibt das Molekulargewicht der Proteine in kDa an. Die molaren Verhältnisse betragen Gelsolin:Aktin 1:2.

3.4.2 Bestimmung der G-Aktin-Nukleationsaktivität der Gelsolinvarianten

Eine der Aktivitäten, die Gelsolin entfalten kann, wenn es sich an G-Aktin bindet, ist die Polymerisation von G-Aktin-Monomeren zu F-Aktin-Filamenten zu begünstigen. Dieser Vorgang wird dadurch gestartet, dass sich drei G-Aktine quasi zeitgleich zu einem Polymerisationskeim, der Nukleus genannt wird, zusammenlagern. Da es jedoch nur sehr selten vorkommt, dass G-Aktine, die sich frei in einer Lösung bewegen, so zusammenstoßen, dass ein Nukleus aus drei G-Aktinen gebildet wird, gibt es in Zellen Proteine, die diesen für die Zelle notwendigen Prozess unterstützen, so dass er schneller und zielgerichteter stattfinden kann, als es in einer reinen G-Aktin-Lösung der Fall wäre. Dieser Vorgang, bei dem die Bildung des Polymerisationskeims gefördert wird, wird Nukleation genannt. Dadurch wird in der Lösung eine Polymerisationsrate erreicht, die höher ist, als die einer Lösung, welche nur G-Aktin enthält. Dies lässt sich durch verschiedene Methoden messen, wobei in dieser Arbeit die Fluorometrie und die Viskosimetrie zum Einsatz kommen.

Durch Bildung von Aktin-Filamenten, erhöht sich die spezifische Viskosität einer Lösung, was durch ein Oswald-Viskosimeter gemessen werden kann. Die Geschwindigkeit des Anstiegs der spezifischen Viskosität ist somit ein Maß für die Nukleationsaktivität eines Proteins. Der Vorteil der Fluorometrie gegenüber der Viskosimetrie liegt in der größeren Sensitivität der Methode, die auch eine Quantifizierung der Messergebnisse einfacher macht. Dafür muss ein etwas höherer apparativer Aufwand in Kauf genommen werden. Die Messungen wurden wie unter 2.2.13 und 2.2.14 beschrieben durchgeführt.

Von nativem Gelsolin ist bekannt, dass es die Nukleation fördert. Um nun zu überprüfen, ob die präparierten rekombinanten Gelsolinvarianten in ihrem Verhalten mit dem des nativ präparierten wt-Gelsolin übereinstimmen, wurden eine Reihe von Nukleationsmessungen durchgeführt. In diesen wurde zunächst überprüft, ob grundsätzlich eine Nukleationsaktivität vorhanden war. War dies der Fall, wurde in weiteren Tests überprüft, inwiefern die Mengenabhängigkeit der Nukleation, sowie die Calciumsensitivität der Steuerung dieses Vorgangs, mit denen des wt-Gelsolin übereinstimmen.

Von wt-pgs ist bekannt, dass es in seiner Aktivität durch Ca^{2+} -Ionen gesteuert wird. Die Steuerung ist derart, dass eine Anhebung des Calciumspiegels der Gelsolin-Lösung auf über 10^{-6} M dazu führt, dass Gelsolin aktiviert wird. Deshalb werden die Aktivitätsmessungen, soweit nichts anderes angegeben ist, bei Ca-Konzentrationen gemessen, die deutlich über

diesem Wert liegen ($2 \cdot 10^{-4}$ M). Die Tests, die die grundsätzliche Ca-Sensitivität untersuchten und entweder mit Ca-Zusatz oder in Gegenwart des Ca-Komplexbildners EGTA gemessen wurden, was zu sehr niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen um 10^{-9} M führt, wurden mit einem Gelsolin:Aktin-Verhältnis von 1:20 durchgeführt, da dieses Verhältnis bei erfolgter Aktivierung bereits eine deutliche Zunahme der Aktivität zeigt.

Zunächst wurde getestet, ob die beiden präparierten Wildtyp-Gelsoline auch in Abwesenheit von Calcium ihre Aktivität entfalten. Dazu wurden Viskosimetriemessungen wie unter 2.2.13 durchgeführt. Die Ansätze enthielten jedoch kein Calcium, sondern 1 mM EGTA. Die Messungen sind in Abb. 3.4.2 dargestellt, wobei man sieht, dass in keinem der Ansätze eine Nukleationsaktivität zu beobachten ist, die sich deutlich von der Kontrolle unterscheidet.

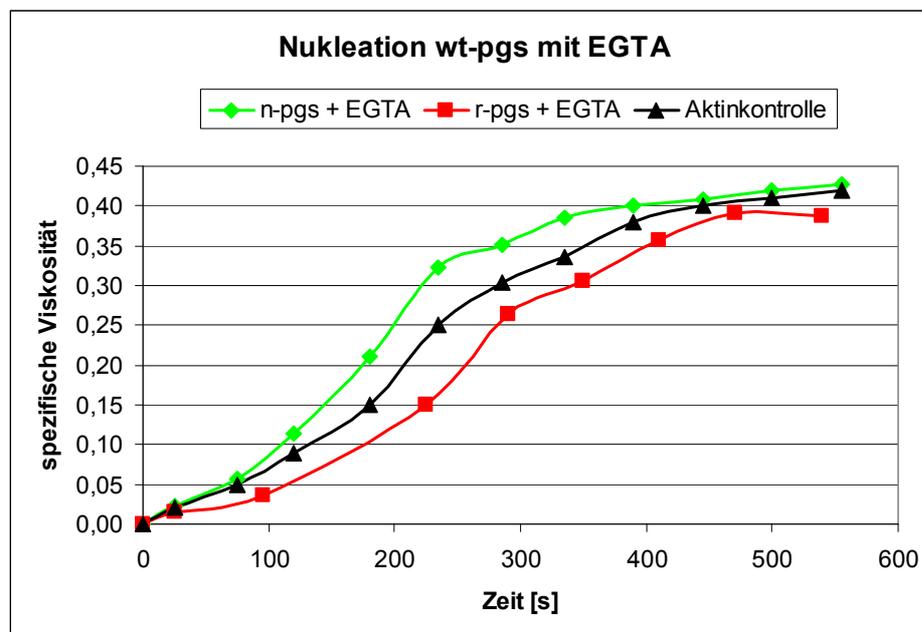


Abb. 3.4.2 Test der Nukleationsaktivität von nativem und rekombinantem Schweinegelsolin unter Ca-freien Bedingungen. Gezeigt sind die Messkurven der beiden Proteine, sowie einer Kontrolle die nur Aktin, aber kein Gelsolin enthält. Die Messbedingungen waren wie in 2.2.13 beschrieben.

Als nächstes wurden viskosimetrische Messungen von nativem und rekombinantem Gelsolin bei Zugabe von $0,2 \text{ mM Ca}^{2+}$ untersucht. Hierbei konnte bei einem Gelsolin-Aktin-Verhältnis von 1:20 eine deutlich schnellere Zunahme der Viskosität beobachtet werden (hier nicht gezeigt).

Diese Messungen wurden daraufhin mit einer sensitiveren fluorimetrischen Messung für verschiedene Gelsolin-Aktin-Verhältnisse wiederholt. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abb. 3.4.3 dargestellt. Die Zugabe von Schweinegelsolin führte zu einer Steigerung der

Polymerisationsrate in der Aktinlösung. Dieses Verhalten, welches sowohl bei nativ präpariertem als auch bei rekombinant exprimiertem Schweinegelsolin zu beobachten war, wurde bei allen getesteten Gelsolin-Aktin-Verhältnissen beobachtet, wobei auch eine Mengenabhängigkeit der Steigerungsrate zu beobachten war.

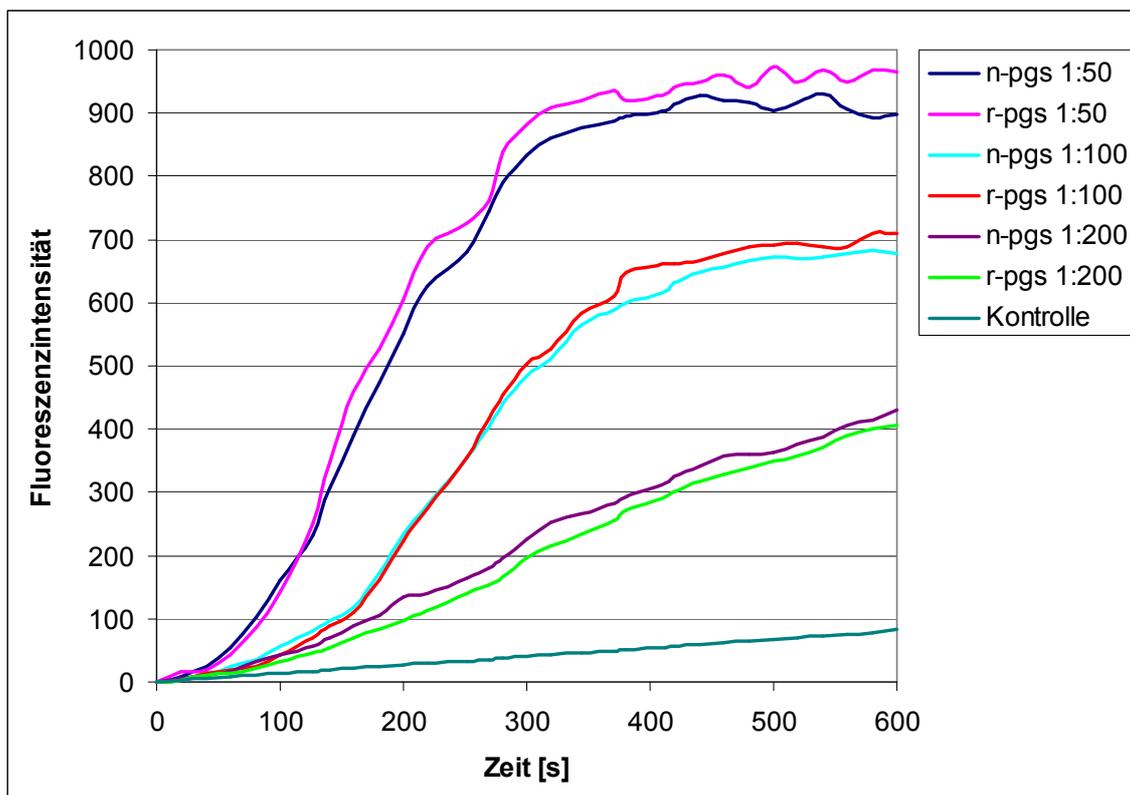


Abb. 3.4.3 Fluorometrische Messung der Zunahme der Aktinpolymerisation durch Zugabe von Schweinegelsolin. Durch Zugabe verschiedener Mengen von Gelsolin zu einer G-Aktin-Lösung lässt sich die Mengenabhängigkeit der Nucleibildung bei verschiedenen molaren Verhältnissen von Aktin und Gelsolin zeigen. Die Messung wurde wie unter 2.2.14 beschrieben durchgeführt.

Die beschriebenen Versuche wurden in weiteren Messungen für die verschiedenen Gelsolin-Deletionsmutanten wiederholt, wobei sich zeigte, dass keine der hergestellten Gelsolinmutanten in der Lage war eine signifikante Nukleationsaktivität zu zeigen. In Abb. 3.4.4 und 3.4.5 ist beispielhaft gezeigt, dass die dort vermessenen Proteine bei einer Ca-Konzentration von 0,2 mM, welche deutlich über der Aktivierungsschwelle liegt, unabhängig davon wie viel Gelsolin dem Ansatz zugegeben wird, die initiale Polymerisationsrate im Vergleich zur Kontrolle nicht steigern, selbst dann nicht, wenn die Gelsolin-Menge deutlich erhöht wird.

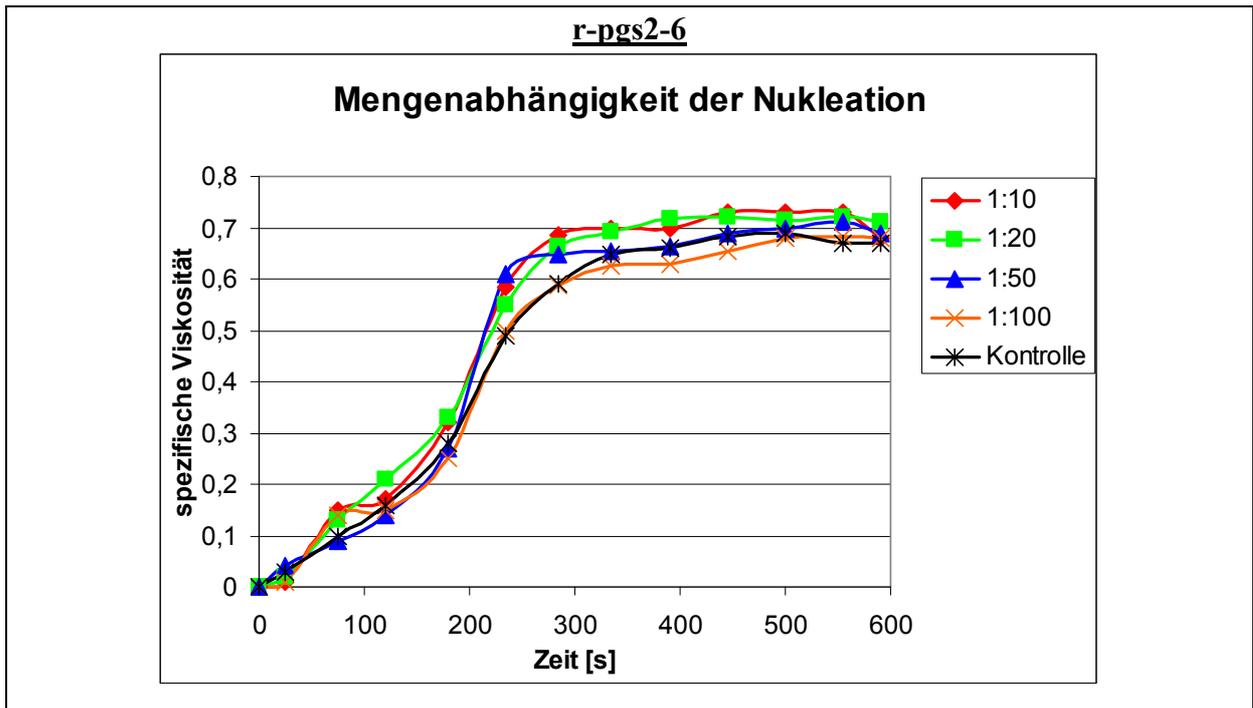


Abb. 3.4.4 Untersuchung des rekombinanten pgs2-6 auf Nukleationsaktivität. In Grafik ist die Nukleationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Aktin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden jeweils bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

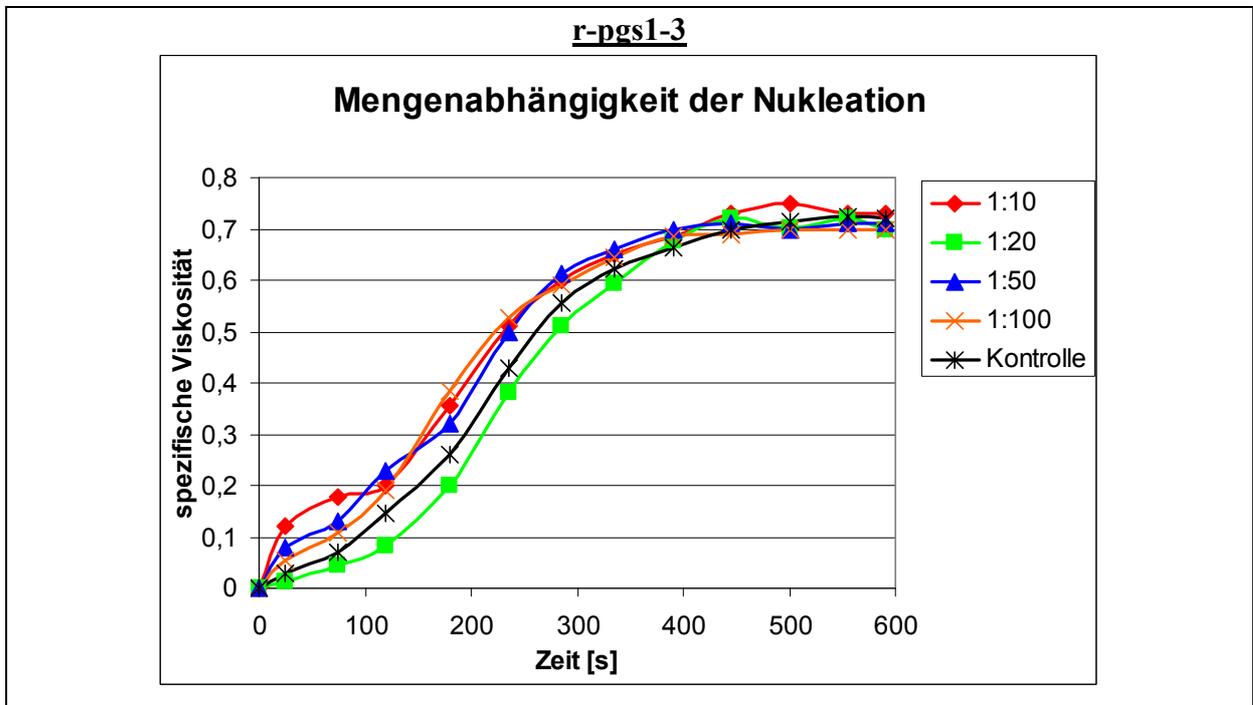


Abb. 3.4.5 Untersuchung des rekombinanten pgs1-3 auf Nukleationsaktivität. In der ist die Nukleationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Aktin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden jeweils bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

Es wurden darüber hinaus noch weitere Nukleationsstudien mit den Gelsolinvarianten pgs1+3, pgs1-2, pgs1-2Df1 und pgs1-2Df2 gemacht, die aber alle keine Aktivität zeigten (hier nicht gezeigt). Ein Vergleich der Nukleationsaktivität der verschiedenen Gelsolinvarianten zeigt, dass nur das Wildtyp-Protein in der Lage ist, die Nukleation zu fördern. Das ist in sofern verständlich, als dass sich bekannte Bindestellen für monomeres Aktin und verschiedene Calciumbindestellen über die Domänen 1, 4 und 6 verteilen [Sun et al., 1999]. Nur die beiden Wildtypformen des Proteins, sowohl die nativ aufgereinigte, als auch die rekombinant exprimierte, besitzen alle diese drei Domänen und zeigen eine Nukleationsaktivität. Dabei zeigen diese beiden Proteine praktisch keinen Unterschied in ihrer Aktivität (siehe fluorometrische Messung Abb. 3.4.3), wobei auch der zeitliche Verlauf der Reaktion bei beiden Proteinen fast identisch ist. Beide Proteine zeigen außerdem eine Abhängigkeit von der Calciumkonzentration, was dadurch zum Ausdruck kommt, dass sie bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM eine Aktivität zeigen, nicht jedoch in Anwesenheit von EGTA.

3.4.3 Bestimmung der F-Aktin-Fragmentationsaktivität der Gelsolinvarianten durch Viskosimetrie

Die Geschwindigkeit der Fragmentation von F-Aktin durch Gelsolin kann durch Messung des zeitlichen Verlaufs der spezifischen Viskosität gemessen werden. Die meisten Proteine, die die Länge von F-Aktin-Filamenten durch Fragmentation regulieren, verrichten ihre Arbeit sehr schnell. Bei einigen ist der Großteil der Reaktion bereits nach einigen Sekunden, spätestens jedoch nach einer Minute abgeschlossen. Dies ist auch bei Gelsolin der Fall. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen zuerst die Fragmentationsaktivität des nativ präparierten Schweinegelsolins im Vergleich zu der rekombinant hergestellten Form. Hierbei zeigt sich, dass die Werte annähernd gleich sind (Abb. 3.4.7 und 3.4.8). Weitere Messungen zeigen die Aktivität zwischen dem rekombinanten wt-Gelsolin und den rekombinant exprimierten Deletionsmutanten. Hierbei ist klar zu erkennen, dass im Gegensatz zur zuvor gemessenen Nukleationsaktivität, die Fragmentation von F-Aktin nicht nur vom vollständigen Wildtypprotein durchgeführt werden kann, sondern auch von einigen der Deletionsmutanten. Ein Vergleich der Fragmentationsaktivität der verschiedenen Gelsolinvarianten zeigt, dass für eine erfolgreiche Fragmentation mit voller Aktivität die Domäne 1, sowie die N-terminalen zwei Drittel der Domäne 2 des Proteins vorhanden sein müssen. Die beiden Wildtypformen des Gelsolins zeigen keinen nennenswerten Unterschied in ihrer Aktivität. Auch der zeitliche Verlauf der Reaktion ist bei beiden Messungen fast identisch. Außerdem zeigen beide Proteine eine Abhängigkeit von der Calciumkonzentration, was dadurch zum Ausdruck kommt, dass beide Gelsoline bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM eine Aktivität zeigen, nicht jedoch in Anwesenheit von EGTA. Die Tests auf Calciumsensitivität, die für die hergestellten Deletionsmutanten durchgeführt wurden zeigen, dass alle rekombinant hergestellten Deletionsmutanten, die Aktivität zeigen, nicht durch Calcium aktiviert werden. Dies war insofern zu erwarten, als das bekannt ist, dass Gelsolin unter physiologischen Bedingungen zwischen Domäne 3 und 4 in zwei Teile geteilt werden kann. Dabei zeigt der N-terminale Teil eine ungesteuerte volle Aktivität, der C-terminale Teil jedoch keine Fragmentationsaktivität mehr. Alle hergestellten Mutanten verhielten sich entsprechend ihrer vorhandenen Domänen genau so, wie die beiden bekannten nativen Fragmente.

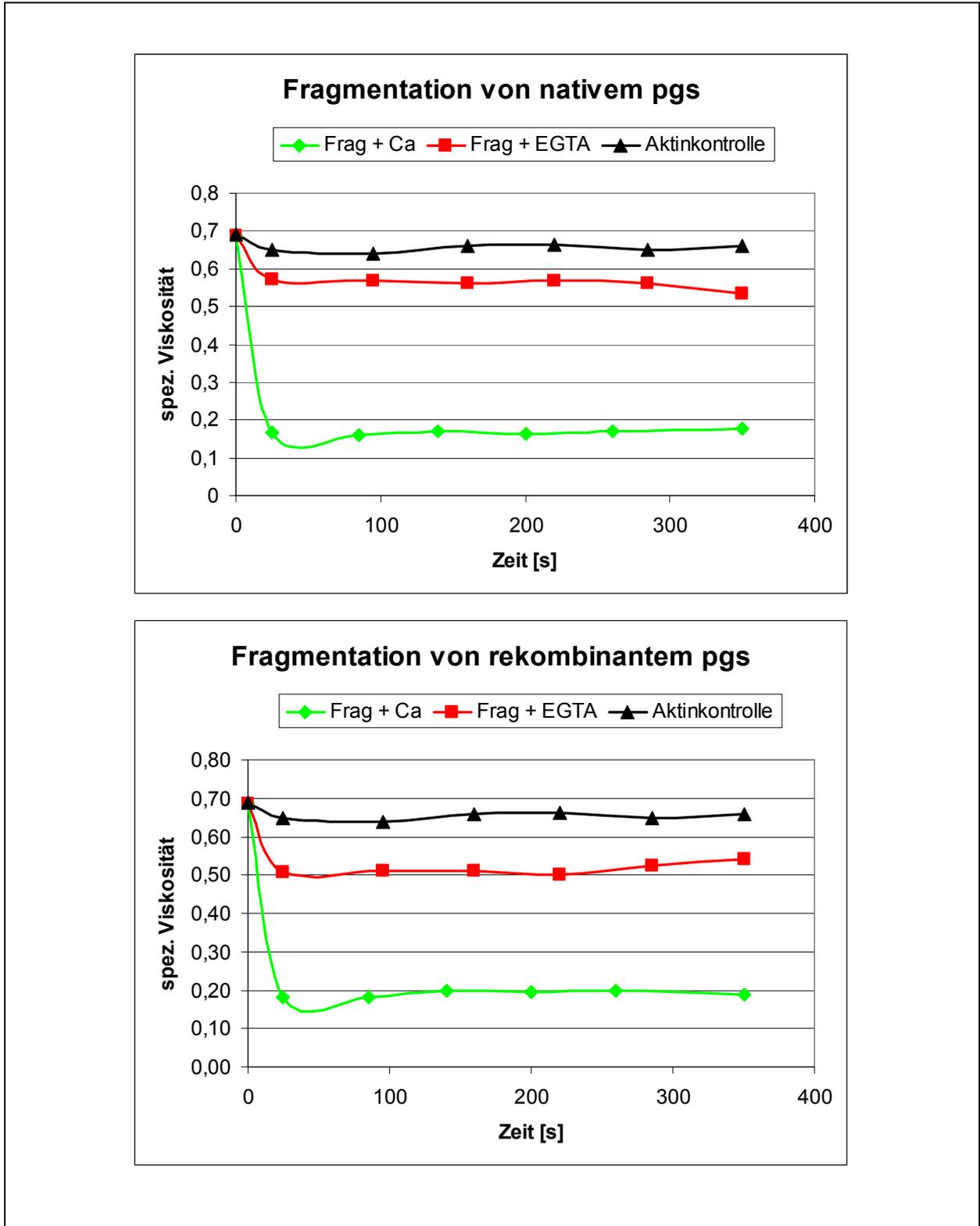


Abb. 3.4.6 Vergleichende Untersuchung der Calciumsensitivität der Fragmentation von nativ präpariertem wt-pgs und rekombinatem wt-pgs. Beide Ansätze wurden mit einem Gelsolin:Aktin-Verhältnis von 1:20 gemessen und enthielten entweder 1 mM EGTA oder 0,2 mM Ca^{2+} .

In Abb. 3.4.6 ist zu sehen, dass sowohl das native, als auch das rekombinante wt-Gelsolin eine Ca-abhängige Fragmentationsaktivität zeigen. Bei Zugabe von EGTA zeigt sich nur noch eine Restaktivität, was durch einen Endwert von 0,53 beim nativen und 0,54 beim rekombinanten Gelsolin zum Ausdruck kommt. Diese Werte liegen deutlich näher an dem Wert der Kontrolle von 0,66 als bei dem Wert, der bei Zugabe von Calcium erreicht wird (0,18 bei nativem und 0,19 bei rekombinantem Gelsolin). Die gemessene geringe Aktivität der beiden Gelsoline in EGTA ist wahrscheinlich präparationsbedingt. Es ist bekannt, dass Gelsolin seine Ca^{2+} -Abhängigkeit im Verlauf der Präparation teilweise verlieren kann [Pope et al., 1989].

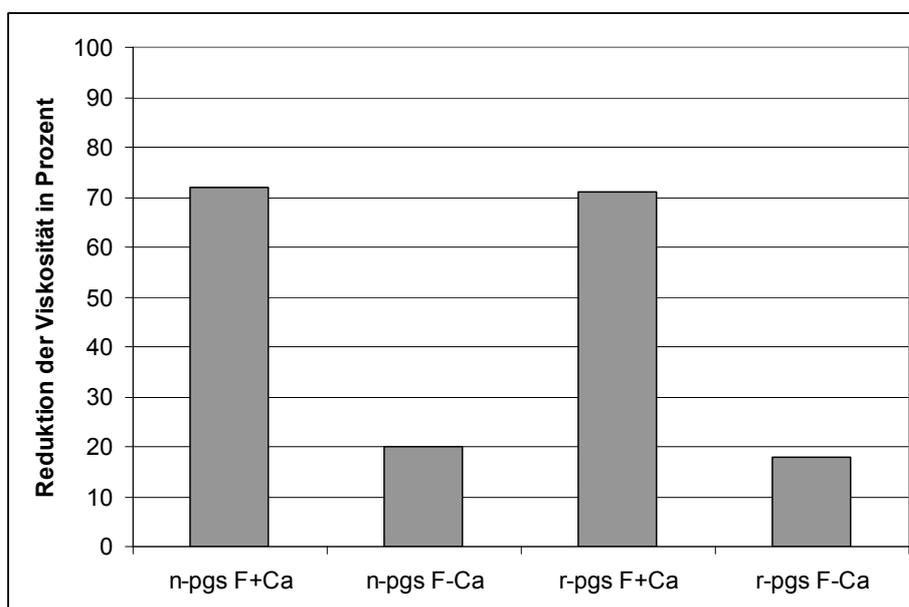
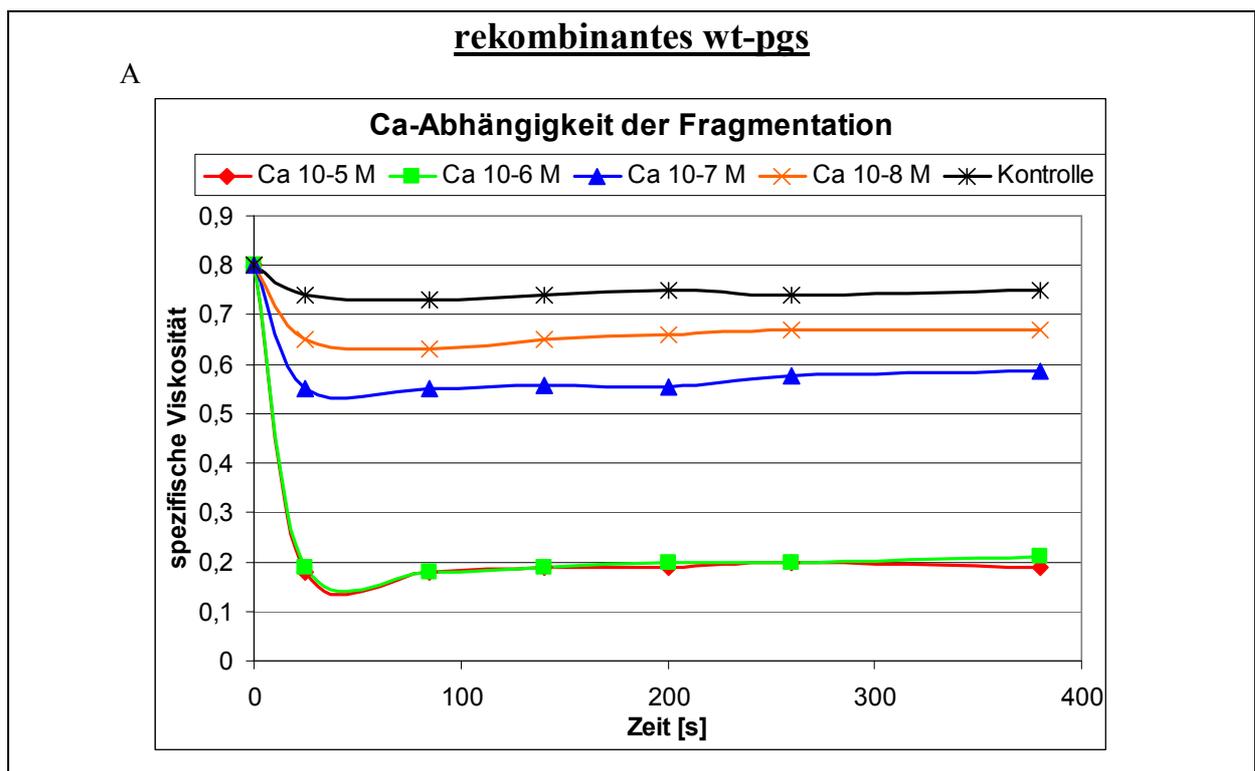


Abb. 3.4.7 Vergleich der Fragmentationsaktivität des rekombinanten Schweine-Gelsolins und des nativen Schweine-Gelsolins. Die prozentuale Reduktion der Viskosität wurde für die Fragmentation (F) entweder in Gegenwart von 0,2 mM Ca^{2+} (F+Ca) oder 1 mM EGTA (F-Ca) gemessen. Alle Ansätze wurden mit einem Gelsolin:Aktin-Verhältnis von 1:20 gemessen.

Der Vergleich zwischen der nativ präparierten Wildtypform und dem rekombinant exprimierten Protein ergab also, dass sich das rekombinant exprimierte wt-Gelsolin grundsätzlich genauso verhält wie das nativ präparierte Protein. In weiteren Messreihen wurde sowohl die Calciumabhängigkeit, als auch die Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität von r-pgs weiter untersucht, um dieses Protein noch genauer mit den später hergestellten und vermessenen Deletionsmutanten des Gelsolins vergleichen zu können.

In Abb. 3.4.8 sind die Messkurven gezeigt, welche bei diesen Messungen erhalten wurden. Für die Ca-Abhängigkeit wurde das in 2.2.14 beschriebene Puffersystem verwendet, um die zu untersuchenden niedrigen Calciumkonzentrationen sicher von einander abgrenzen zu können. Dabei zeigte sich, dass die beiden höheren Calciumkonzentrationen zu einer sehr starken Fragmentationsaktivität führen, was sich durch den starken Abfall der spezifischen Viskosität von ca. 0,8 auf ca. 0,2 zeigt. Die beiden niedrigeren Ca-Konzentrationen führen zu keiner entsprechenden Fragmentationsaktivität. Es verbleibt lediglich eine Restaktivität, die mit einer Höhe von ca. 0,6 mit dem Wert aus der vorherigen Messung mit EGTA-Zusatz vergleichbar ist (siehe Abb. 3.4.6). In der zweiten Grafik von Abb. 3.4.8 ist zu erkennen, dass die Fragmentationsaktivität des r-pgs deutlich mengenabhängig ist. Die Messwerte liegen zwischen einer Endviskosität von 0,49 bei einer Verdünnung von 1:100 und einer Endviskosität von 0,19 bei einer Verdünnung von 1:10, wobei die Viskosität um ca. 55 % abnimmt.



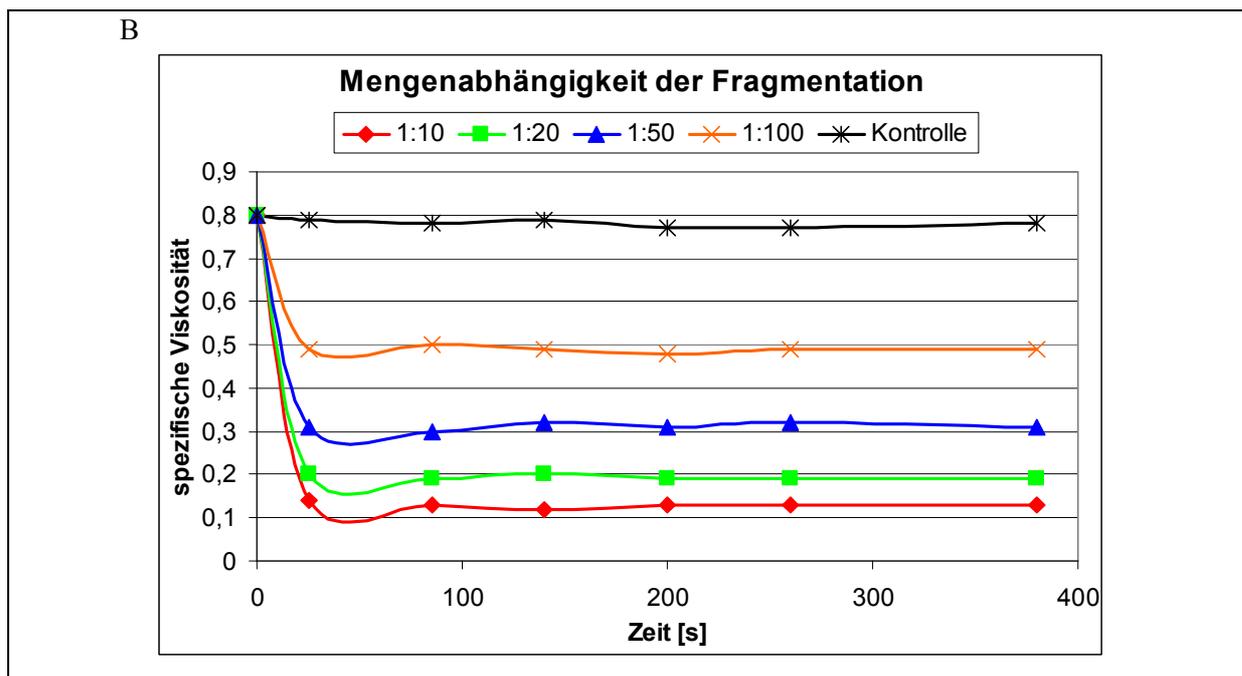


Abb. 3.4.8 Untersuchung des rekombinanten wt-pgs auf Calciumabhängigkeit und Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität. (A) Zunächst wurden Fragmentationsansätze, die unterschiedliche Calcium-Konzentrationen enthielten, in einem Gelsolin:Aktin-Verhältnis von 1:20 vermessen. (B) In der zweiten Grafik ist die Fragmentationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Aktin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden jeweils bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

Nachdem der Vergleich zwischen der nativen und der rekombinanten wt-Form abgeschlossen war und sich zeigte, dass sich das rekombinante Protein wie das native verhält und anschließend das r-pgs noch genauer charakterisiert wurde, wurden im nächsten Schritt entsprechende Messungen mit den verschiedenen Gelsolin-Deletionsmutanten durchgeführt.

In Abb. 3.4.9 sind die Messkurven für die Deletionsmutante pgs2-6 gezeigt. In der oberen Grafik, welche die Messkurven zur Bestimmung der Ca-Abhängigkeit darstellen zeigte sich, dass bei allen verwendeten Calciumkonzentrationen höchstens eine Restaktivität der Fragmentation zu beobachten ist, die mit einer Höhe von minimal 0,52 bei der höchsten verwendeten Ca-Konzentration mit dem Wert aus der Messung des wt-pgs mit EGTA-Zusatz vergleichbar ist. In der unteren Grafik ist zu erkennen, dass die Fragmentationsaktivität von pgs2-6 auch bei deutlich höheren Gelsolinmengen und einer noch höheren Ca-Konzentration von 0,2 mM nicht ansteigt. Die Werte liegen zwischen einer Endviskosität von 0,75 bei einer Verdünnung von 1:100 und einer Endviskosität von 0,58 bei einer Verdünnung von 1:10, was bedeutet, dass die Werte sehr nah an den Werten der Kontrolle ohne jeglichen Gelsolinzusatz liegen, als bei den Werten die man bei einer vollen Aktivierung erwarten kann (siehe Abb. 3.4.8 Werte für wt-pgs).

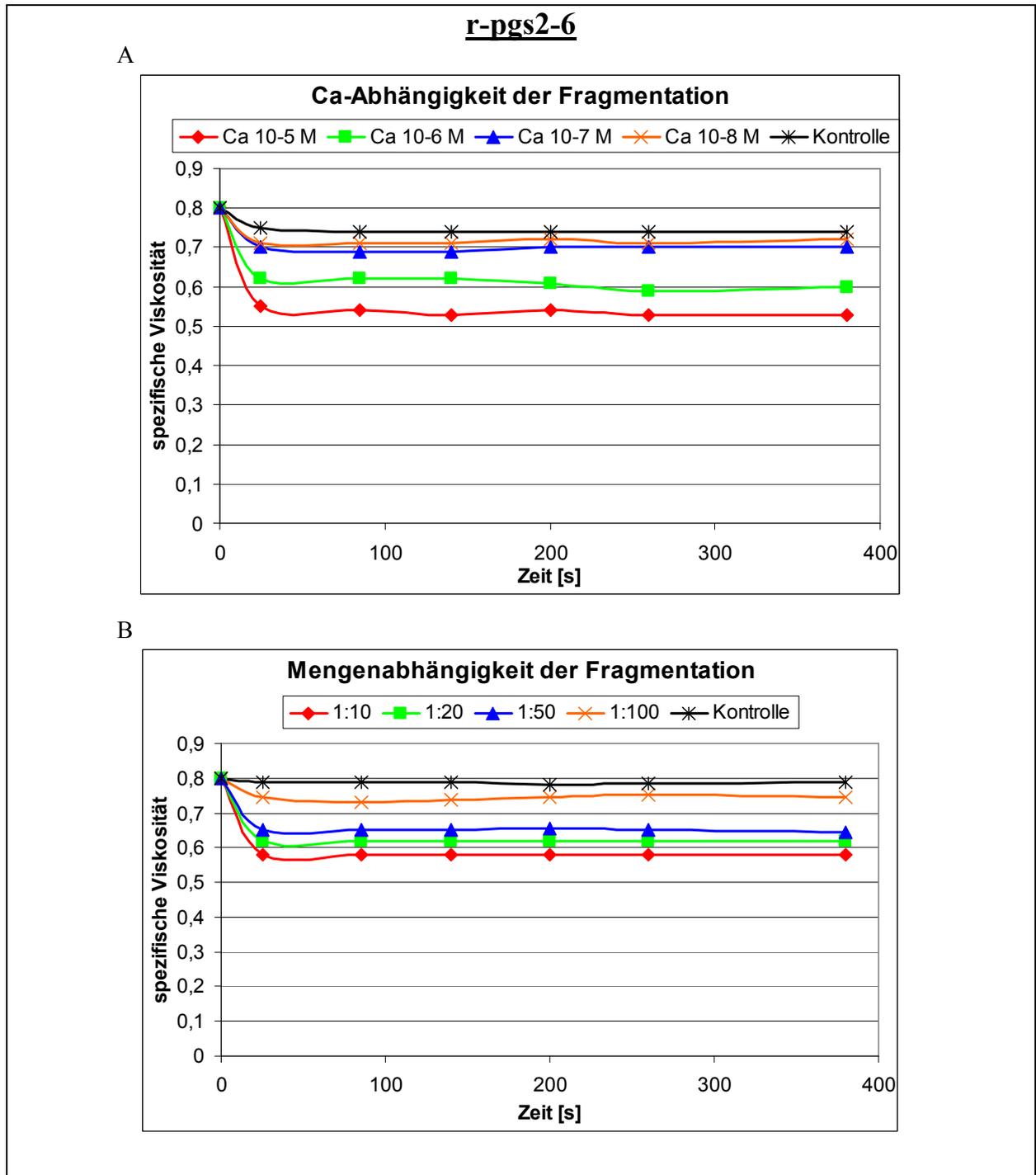
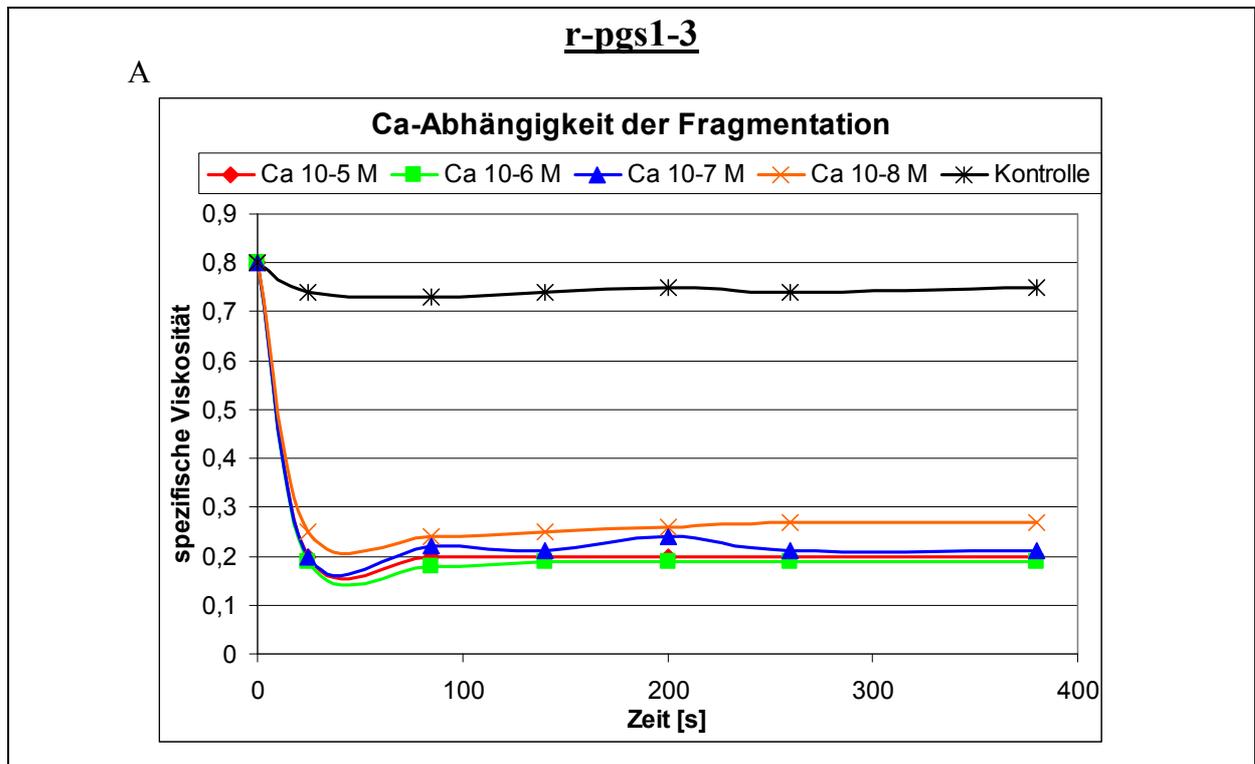


Abb. 3.4.9 Untersuchung von pgs2-6 auf Calcium- und Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität. (A) Es wurden Fragmentationsansätze, mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen, in einem Gelsolin:Aktin-Verhältnis von 1:20 vermessen. (B) Hier ist die Fragmentationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Aktin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

In der folgenden Abb. 3.4.10 sind die Messkurven für die Deletionsmutante pgs1-3 gezeigt. In der oberen Grafik zeigte sich, dass alle verwendeten Calciumkonzentrationen zu einer sehr starken Fragmentationsaktivität führen, was sich durch einen starken Abfall der spezifischen Viskosität von ca. 0,8 auf Werte zwischen 0,19 und 0,27 zeigt. Hieraus kann man folgern, dass die beobachtete Fragmentationsaktivität nicht durch Calcium gesteuert wird. In der zweiten Grafik von Abb. 3.4.10 ist zu erkennen, dass auch die Fragmentationsaktivität des pgs1-3 mengenabhängig ist. Die Werte liegen zwischen einer Endviskosität von 0,41 bei einer Verdünnung von 1:100 und einer Endviskosität von 0,09 bei einer Verdünnung von 1:10, wobei man sieht, dass die Viskosität um ca. 44 % abnimmt. Hierbei muss man allerdings bedenken, dass der Einfluss der Gelsolin-Konzentration auf die Viskosität nicht linear ist: mit steigender Gelsolin-Konzentration wird die Abnahme der Viskosität je Inkrement geringer.



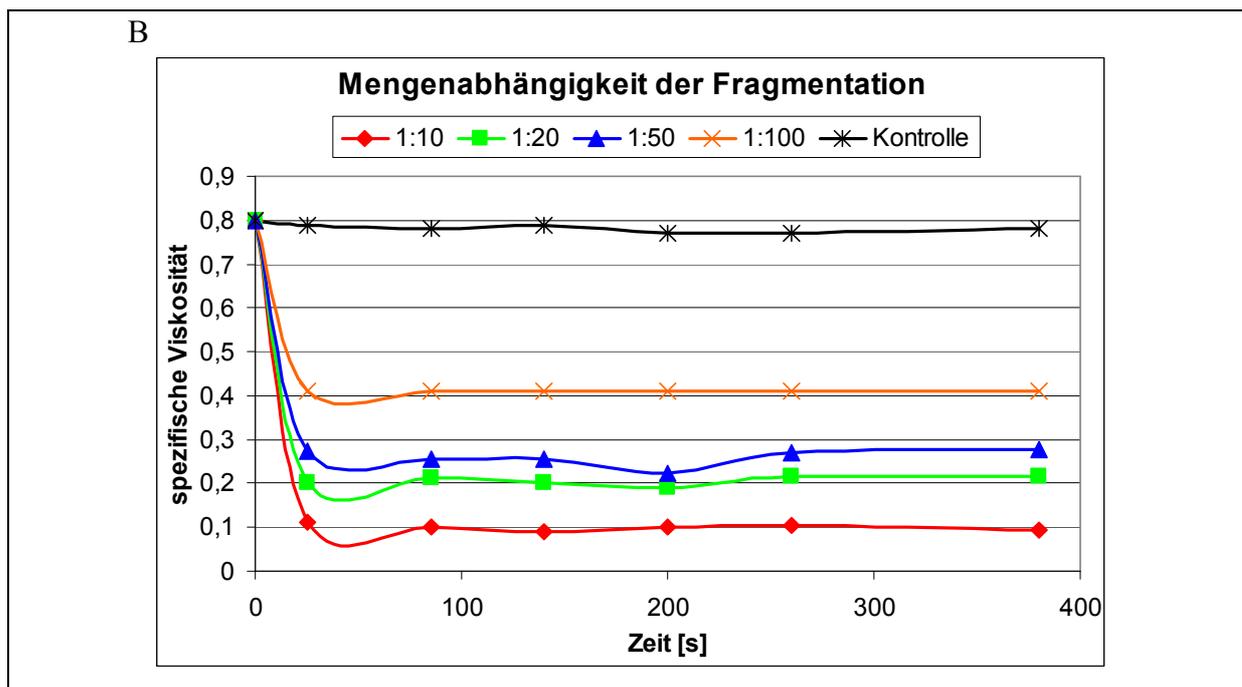


Abb. 3.4.10 Untersuchung des rekombinanten pgs1-3 auf Calciumabhängigkeit und Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität. (A) Zunächst wurden Fragmentationsansätze, die unterschiedliche Calcium-Konzentrationen enthielten, in einem Gelsolin:Actin-Verhältnis von 1:20 vermessen. (B) In der zweiten Grafik ist die Fragmentationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Actin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden jeweils bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

Abb. 3.4.11 zeigt die Messkurven für die Deletionsmutante pgs4-6. In der oberen Grafik, welche die Messkurven zur Bestimmung der Ca-Abhängigkeit darstellt ist zu sehen, dass bei allen verwendeten Calciumkonzentrationen kein nennenswerter Abfall der spezifischen Viskosität zu beobachten ist, woraus folgt, dass bei diesen Messungen keine Fragmentation stattgefunden hat. Die Höhe der gemessenen Endwerte liegt zwischen 0,68 und 0,72, was praktisch dem Endwert der vermessenen Kontrolle von 0,73 entspricht. In der unteren Grafik ist zu erkennen, dass die Fragmentationsaktivität von pgs4-6 auch bei deutlich höheren Gelsolinmengen und einer Ca-Konzentration von 0,2 mM nicht ansteigt. Die Werte liegen zwischen einer Endviskosität von 0,75 bei einer Verdünnung von 1:100 und einer Endviskosität von 0,7 bei einer Verdünnung von 1:10, was bedeutet, dass die Werte sehr nah an dem Wert der Kontrolle liegen, der 0,78 beträgt. Dies bedeutet, dass wie bei den Messungen in der oberen Grafik nicht einmal eine nennenswerte Restaktivität vorliegt, so dass man sagen kann, dass pgs4-6 in keinem der hier vermessenen Reaktionsansätze eine Fragmentationsaktivität zeigt.

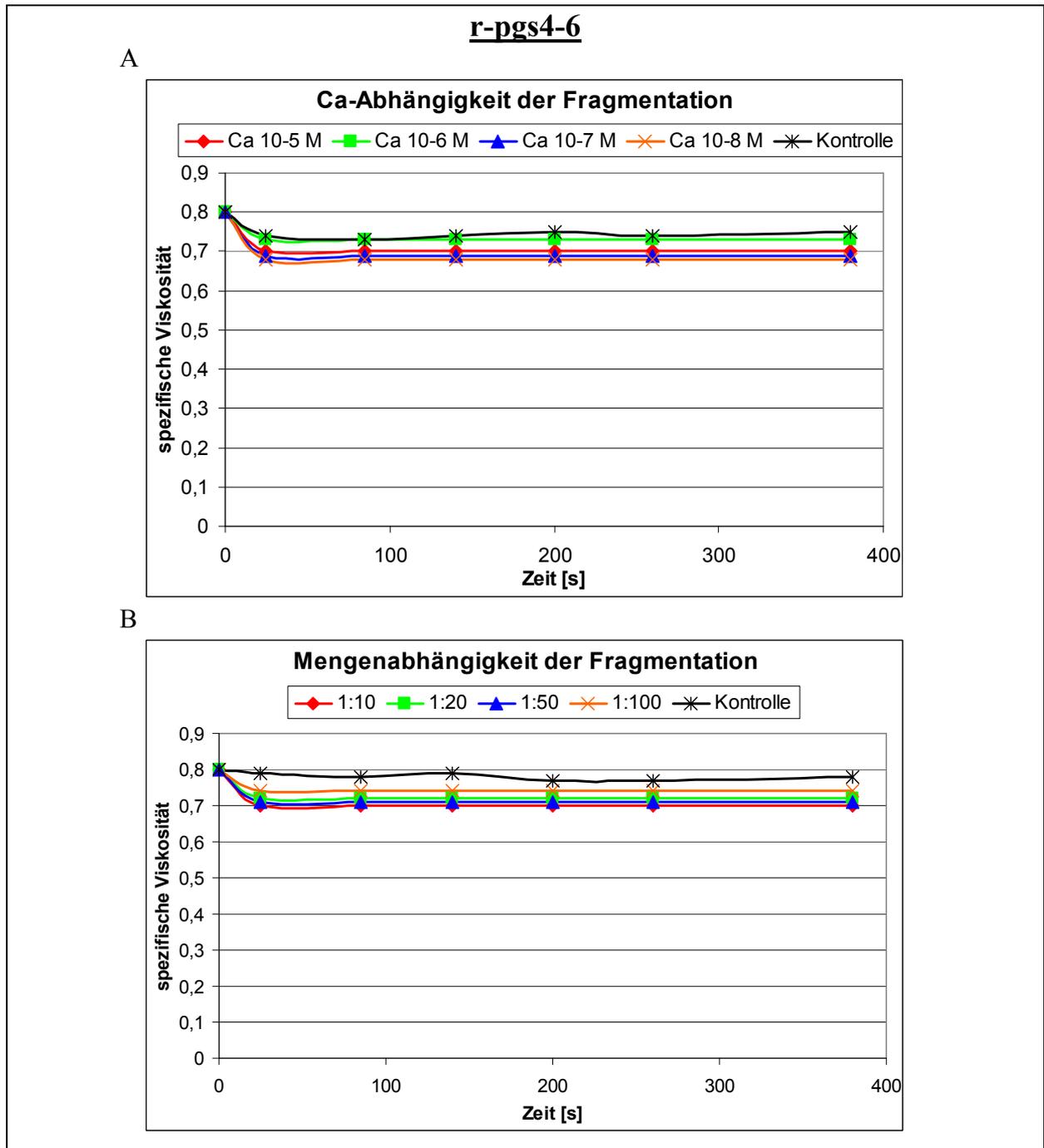


Abb. 3.4.11 Untersuchung des rekombinanten pgs4-6 auf Calciumabhängigkeit und Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität. (A) Zunächst wurden Fragmentationsansätze, die unterschiedliche Calcium-Konzentrationen enthielten, in einem Gelsolin:Aktin-Verhältnis von 1:20 vermessen. (B) In der zweiten Grafik ist die Fragmentationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Aktin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden jeweils bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

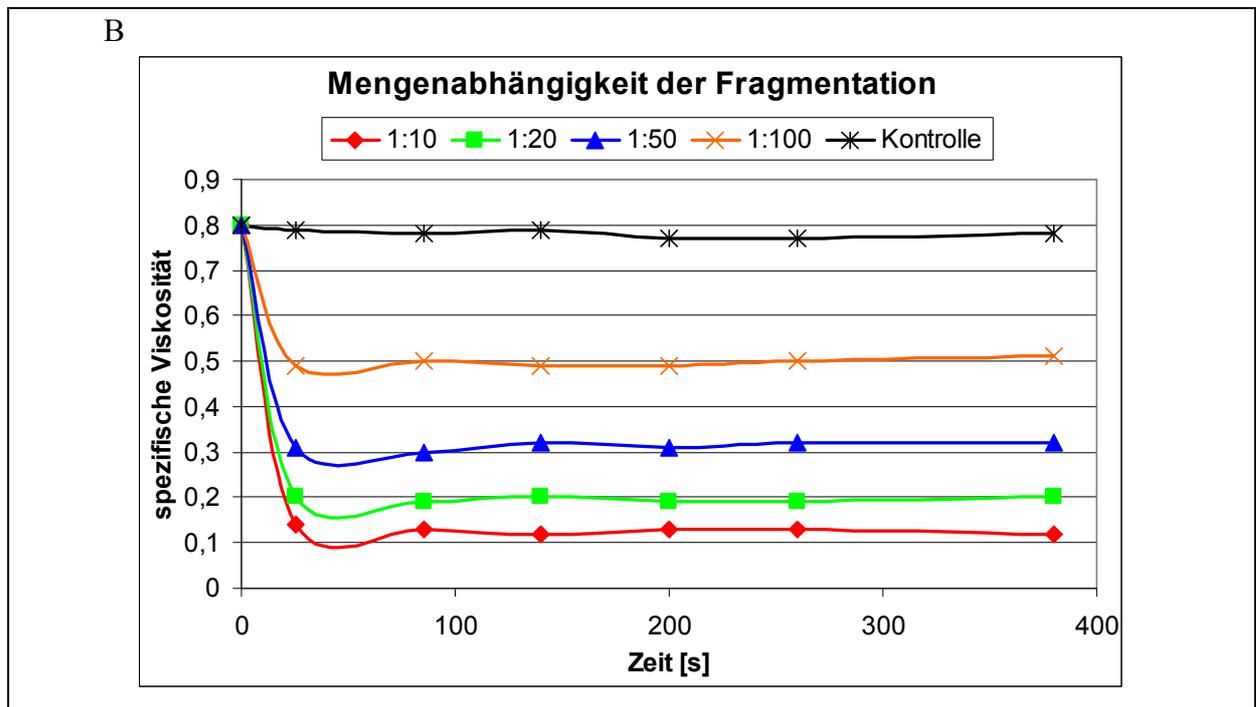
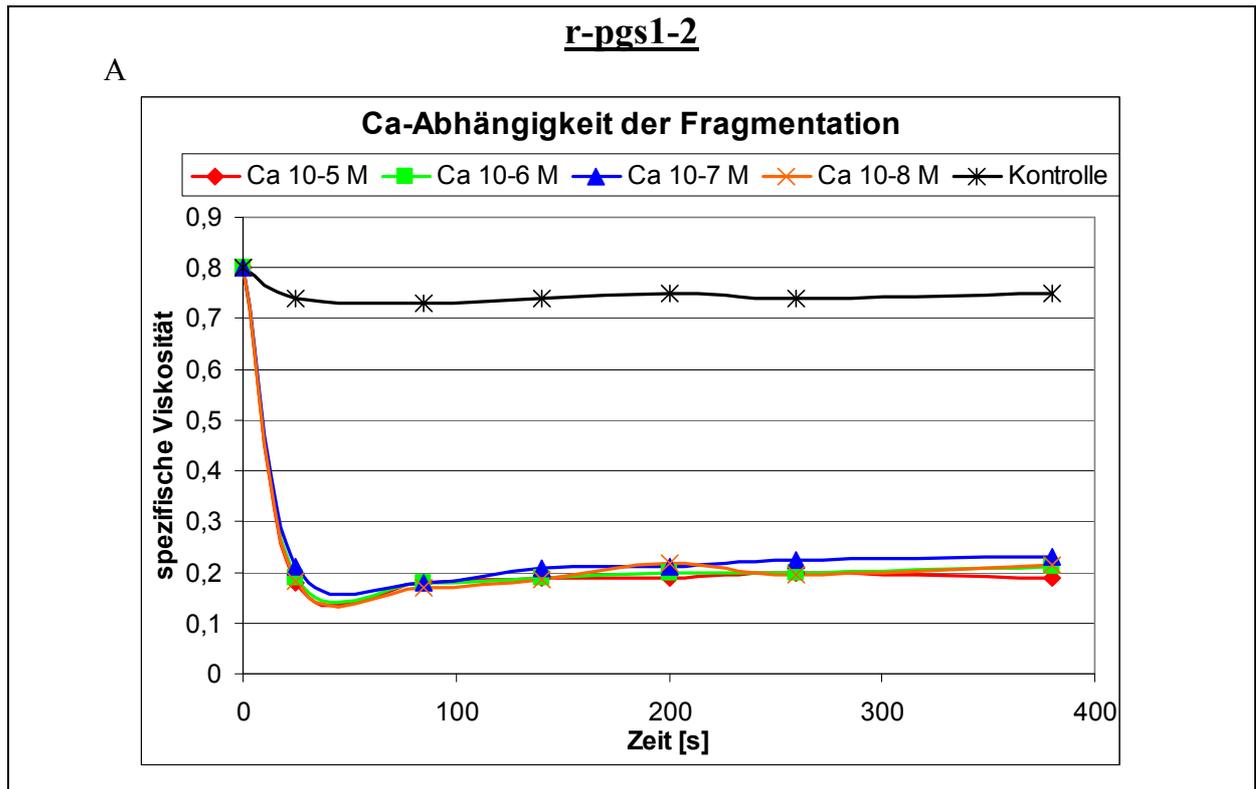


Abb. 3.4.12 Untersuchung des rekombinanten pgs1-2 auf Calciumabhängigkeit und Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität. (A) Zunächst wurden Fragmentationsansätze, die unterschiedliche Calcium-Konzentrationen enthielten, in einem Gelsolin:Actin-Verhältnis von 1:20 vermessen. (B) In der zweiten Grafik ist die Fragmentationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Actin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden jeweils bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

In Abb. 3.4.12 sind die Messkurven für die Deletionsmutante pgs1-2 gezeigt. In der oberen Grafik sieht man, dass alle verwendeten Calciumkonzentrationen zu einer sehr starken Fragmentationsaktivität führen, was sich durch einen starken Abfall der spezifischen Viskosität von ca. 0,8 auf Werte um 0,2 zeigt. Hieraus kann man folgern, dass die beobachtete Fragmentationsaktivität nicht durch Calcium gesteuert wird. In der unteren Grafik von Abb. 3.4.12 ist zu erkennen, dass die Fragmentationsaktivität des pgs1-2 mengenabhängig ist. Die Werte liegen zwischen einer Endviskosität von 0,51 bei einer Verdünnung von 1:100 und einer Endviskosität von 0,12 bei einer Verdünnung von 1:10, wobei man sieht, dass die Viskosität um ca. 50 % abnimmt.

Die Abb. 3.4.13 zeigt die Messkurven für die Deletionsmutante pgs1+3. In der oberen Grafik, welche die Messkurven zur Bestimmung der Ca-Abhängigkeit darstellt ist zu sehen, dass bei allen verwendeten Calciumkonzentrationen kein nennenswerter Abfall der spezifischen Viskosität zu beobachten ist. Die Höhe der gemessenen Endwerte liegt zwischen 0,65 und 0,7, was fast dem Endwert der vermessenen Kontrolle von 0,75 entspricht. In der unteren Grafik ist zu erkennen, dass die Fragmentationsaktivität von pgs1+3 auch bei deutlich höheren Gelsolinmengen und einer Ca-Konzentration von 0,2 mM nicht ansteigt. Die Werte liegen zwischen einer Endviskosität von 0,68 bei einer Verdünnung von 1:50 und einer Endviskosität von 0,73 bei einer Verdünnung von 1:20, was bedeutet, dass die Werte sehr nah an dem Wert der Kontrolle liegen, der 0,78 beträgt. Hierbei kann man sehen, dass allgemein keine Aktivität auftritt und der im einzelnen gemessene Wert nicht einmal mehr von der jeweiligen Verdünnungsstufe abhängt. Man hier also zusammenfassend sagen, dass pgs1+3 in keinem der hier vermessenen Reaktionsansätze eine Fragmentationsaktivität zeigt.

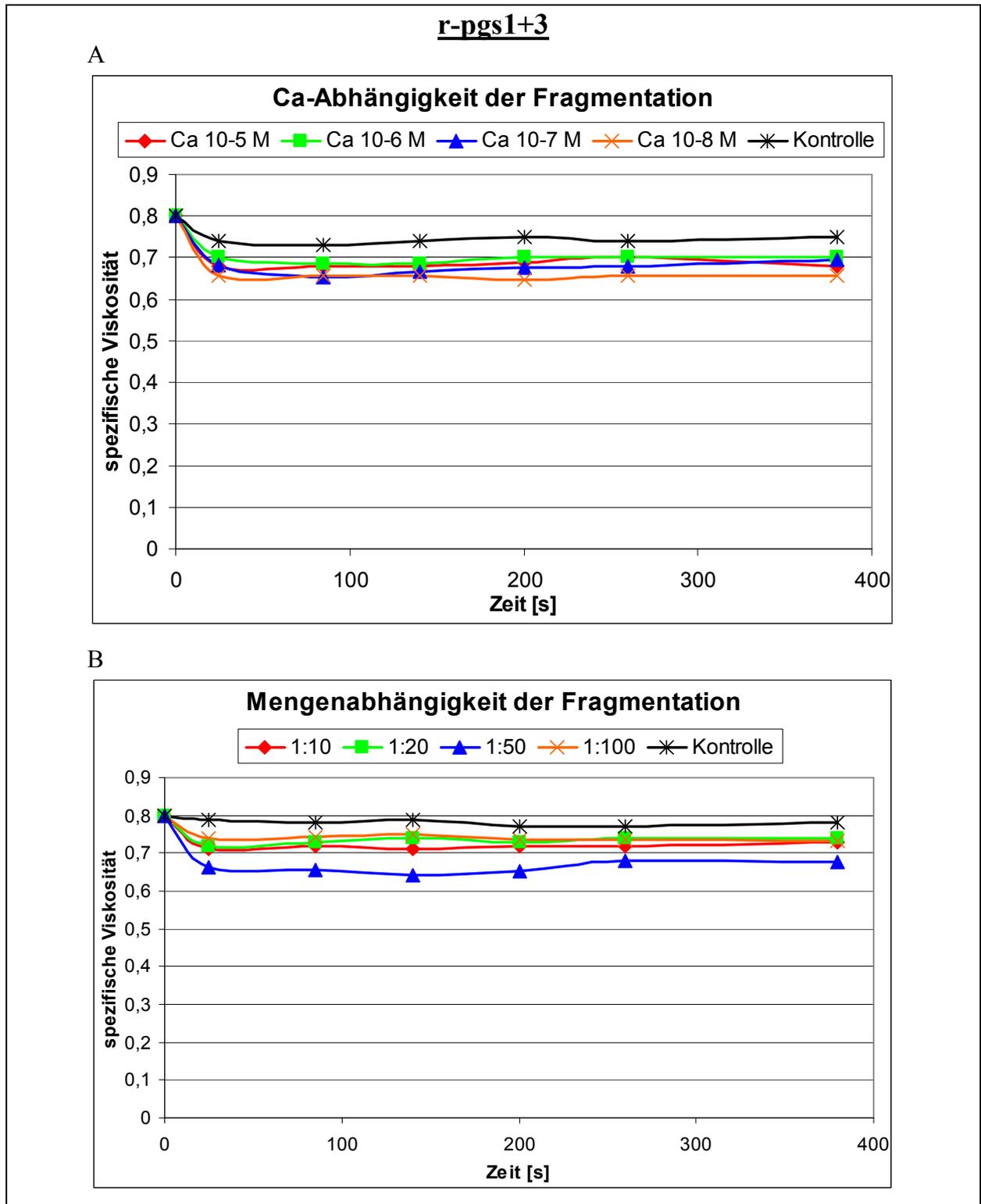


Abb. 3.4.13 Untersuchung des rekombinanten pgs1+3 auf Calciumabhängigkeit und Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität. (A) Zunächst wurden Fragmentationsansätze, die unterschiedliche Calcium-Konzentrationen enthielten, in einem Gelsolin:Aktin-Verhältnis von 1:20 vermessen. (B) In der zweiten Grafik ist die Fragmentationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Aktin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden jeweils bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

In Abb. 3.4.14 sind die viskosimetrischen Messkurven für die mengenabhängige Fragmentation von Aktinfilamenten durch die Gelsolinvariante pgs1-2Df1 gezeigt. Ein vorab durchgeführter Test auf Calciumabhängigkeit zeigte, dass diese Deletionsmutante genauso wie die etwas längere Variante pgs1-2 keiner Aktivitätssteuerung durch Calcium unterliegt (hier nicht gezeigt). Die daraufhin durchgeführten Messungen mit verschiedenen Gelsolinkonzentrationen ergaben, dass die Fragmentationsaktivität des pgs1-2Df1 mengenabhängig ist. Die Werte liegen zwischen einer Endviskosität von 0,53 bei einer Verdünnung von 1:100 und einer Endviskosität von 0,11 bei einer Verdünnung von 1:10, wobei man sieht, dass die Viskosität um ca. 54 % abnimmt.

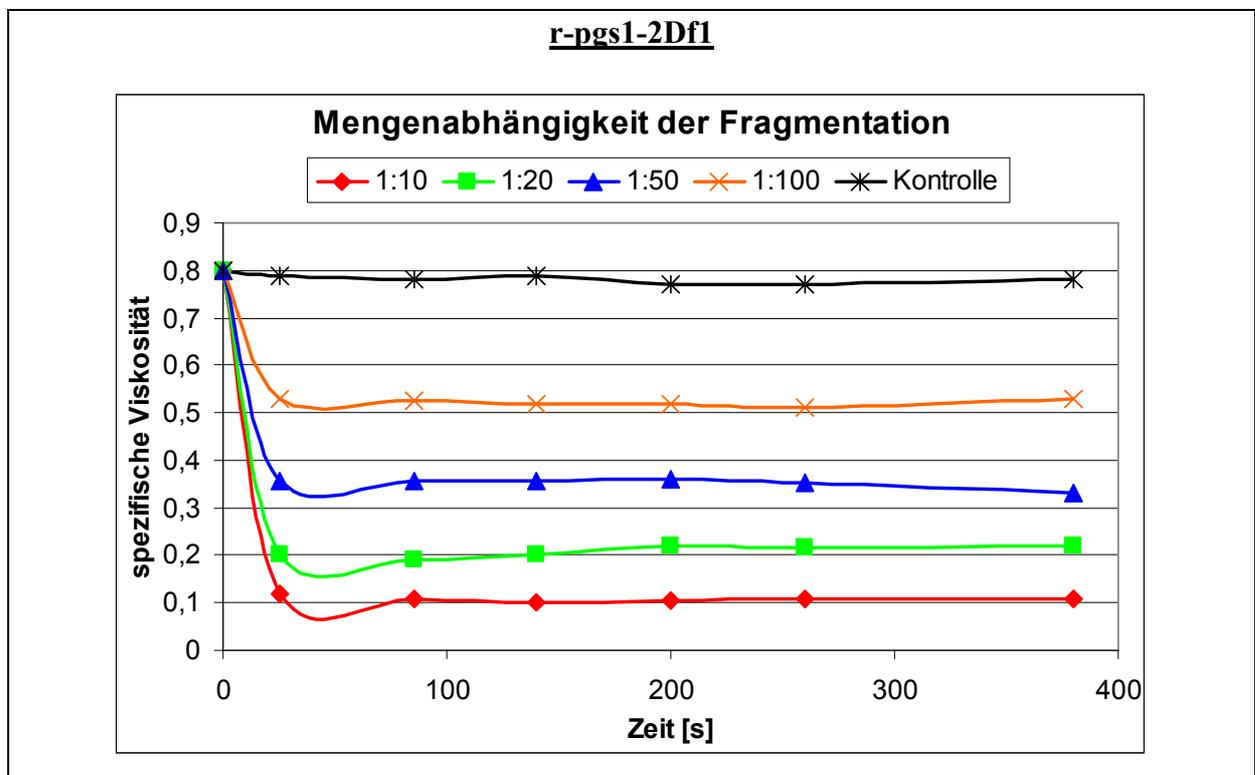


Abb. 3.4.14 Untersuchung des rekombinanten pgs1-2Df1 auf Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität. In der Grafik ist die Fragmentationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Aktin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden jeweils bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

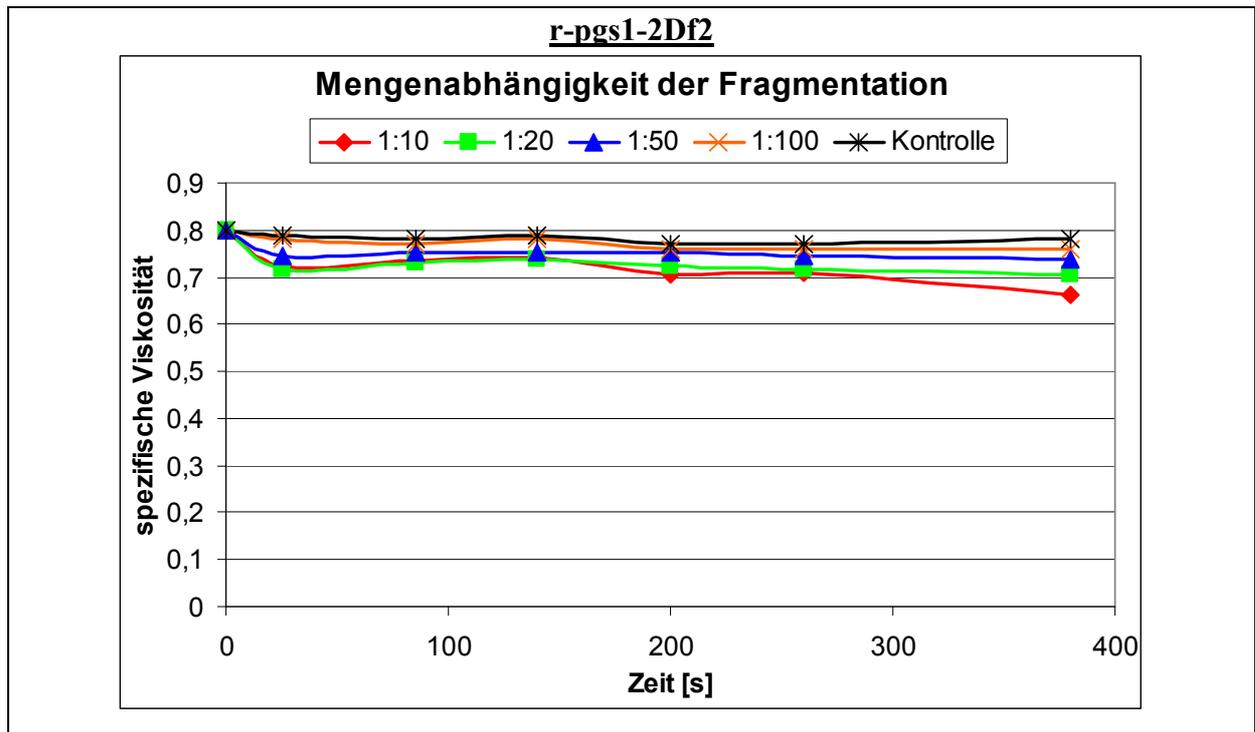


Abb. 3.4.15 Untersuchung des rekombinanten pgs1-2Df2 auf Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität. In der Grafik ist die Fragmentationsaktivität bei unterschiedlichen Gelsolin:Aktin-Verhältnissen gezeigt. Die Messungen wurden jeweils bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

In Abb. 3.4.15 sind die Ergebnisse der viskosimetrischen Messungen für die mengenabhängige Fragmentation von Aktinfilamenten durch die Gelsolinvariante pgs1-2Df2 gezeigt. Ein auch hier vorab durchgeführter Test auf Calciumabhängigkeit zeigte, dass diese Deletionsmutante bei keiner der getesteten Calciumkonzentrationen eine Fragmentation aufwies (hier nicht gezeigt). In der dargestellten Grafik ist zu erkennen, dass die Fragmentationsaktivität von pgs1-2Df2 auch bei deutlich höheren Gelsolinmengen und einer Ca-Konzentration von 0,2 mM nicht ansteigt. Die Werte liegen zwischen einer Endviskosität von 0,66 bei einer Verdünnung von 1:10 und einer Endviskosität von 0,76 bei einer Verdünnung von 1:100, was bedeutet, dass die Werte sehr nah an dem Wert der Kontrolle liegen, der 0,78 beträgt. Man kann hier also zusammenfassend sagen, dass pgs1-2Df2 in keinem der hier vermessenen Reaktionsansätze eine Fragmentationsaktivität zeigt.

Im weiteren Verlauf dieser Untersuchungen wurden noch vergleichbare Messreihen mit den rekombinant exprimierten Gelsolindomänen D1 und D2 durchgeführt. Keine dieser beiden

Domänen allein war in der Lage unter den getesteten Bedingungen (Calciumkonzentrationen von 10 nM bis 0,2 mM und Gelsolin-Aktin-Verhältnisse von 1:10 bis 1:100) eine Fragmentationsaktivität zu zeigen.

Calciumabhängigkeit der Fragmentationsaktivität:

Da die Gelsolinmutanten, die eine Fragmentationsaktivität zeigten, keine Ca-abhängigkeit ihrer Aktivität aufwiesen, kann man keinen Vergleich zwischen den Gelsolinmutanten untereinander und dem Wildtypprotein durchführen. Nur der oben bereits erwähnte Vergleich zwischen der nativen und der rekombinanten Wildtypform konnte erstellt werden.

Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität:

Die Bestimmung der Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität erlaubt den Vergleich zwischen verschiedenen Gelsolinvarianten. Auch lässt sich hieran die Stärke der biologischen Aktivität des jeweiligen Proteins einschätzen. Wie in Abb. 3.4.16 zu sehen ist, ergibt sich bei Zugabe einer steigenden Menge an eingesetztem Protein eine Sättigungskurve, die aber in dem hier abgebildeten Bereich noch nicht ihren Endwert erreicht. Man kann aber bei einem Vergleich der Kurven erkennen, dass die Mengenabhängigkeit der einzelnen Gelsolinvarianten recht ähnlich ist. Alle haben einen ähnlichen Kurvenverlauf, wobei nur das pgs1-3 bereits bei geringen Proteinmengen eine deutlich höhere Aktivität zeigt, die sich aber mit geringer werdenden Gelsolin:Aktin-Verhältnissen abschwächt, obwohl diese Mutante auch bei der höchsten Proteinmenge die größte Aktivität von allen Varianten zeigt. Auffällig ist, dass alle Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp recht hohe Aktivität aufweisen. Bei geringen Mengen liegen die meisten Aktivitätswerte nur geringfügig unter dem des Wildtyp-Proteins (bis auf die erwähnte Mutante pgs1-3), bei größeren Proteinmengen liegen sie jedoch alle leicht über dem Wert des Wildtyp-Proteins. Wenn man die Ergebnisse der ersten Tests betrachtet, die ergaben, dass sich die Werte des nativen und des rekombinanten Proteins nicht wesentlich voneinander unterscheiden und diese Werte mit den weiteren Messungen vergleicht, dann sieht man, dass alle Gelsolinmutanten, die eine Fragmentationsaktivität zeigen, auch eine recht starke Aktivität aufweisen. Daraus kann man auch schließen, dass diese Gelsolinmutanten im Verlauf ihrer Präparation korrekt gefaltet wurden, was sich durch die durchgeführten CD-Messungen bereits für einige Mutanten bestätigen ließ (siehe 3.3).

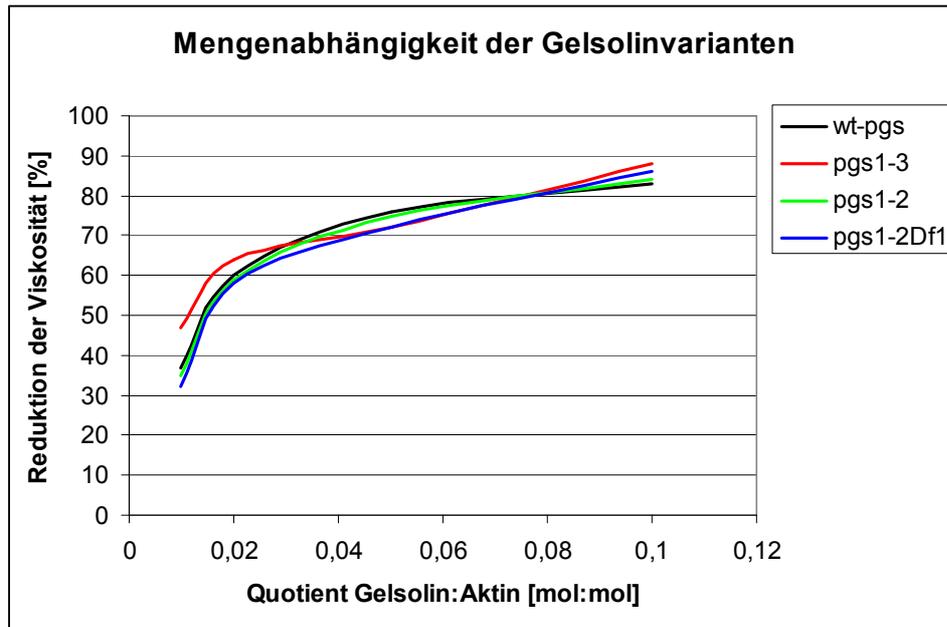


Abb. 3.4.16 Mengenabhängigkeit der Fragmentationsaktivität der aktiven Gelsolinvarianten.

Fehlerbetrachtung der Viskositätsmessungen:

Bei der quantitativen Gegenüberstellung der Messergebnisse, insbesondere der durchgeführten Gegenüberstellung der Mengenabhängigkeiten der verschiedenen Gelsolinvarianten, ergibt sich die Frage, wie zuverlässig die erhobenen Daten für die spezifischen Viskositäten sind. Wenn man die Formel für die spezifische Viskosität betrachtet, stellt man fest, dass es außer der gemessenen Durchflußzeit im Viskosimeter, die für den jeweiligen Messansatz zu verschiedenen Zeiten ermittelt wird, keine weiteren Variablen gibt, die die zu bestimmende abhängige Größe beeinflussen: $\eta = (t_1 / t_2) - 1$. Dabei ist η die Viskosität, t_1 die Durchflusszeit der Probe und t_2 die Durchflusszeit von Wasser, die eine gerätespezifische Konstante ist. Für die Gesamtfehlergrenze $G\eta$ für die zu bestimmende Größe η , welche den maximalen Gesamtfehler $\Delta\eta$ der Viskosität beschreibt ergibt sich:

$G\eta = \Delta\eta = |\partial\eta / \partial t_1| \cdot \Delta t_1 = |-t_2 / t_1^2| \cdot \Delta t_1$, mit $\Delta t_1 = 0,1$ s als angenommenem maximalen Fehler der Zeitmessung.

Damit ergibt sich z.B. für eine Probendurchflusszeit von 40 s und einem Wasserwert von 27,1 s ein maximaler Fehler für die spezifische Viskosität von 0,0017. Da die Werte bei den durchgeführten Messungen nur bis auf die zweite Nachkommastelle genau bestimmt wurden, sind die Fehler, die durch ungenaue Zeitmessung auftreten könnten zu vernachlässigen. Die ermittelten Werte für die spezifische Viskosität scheinen also bei vorsichtiger Versuchsdurchführung recht zuverlässig zu sein.

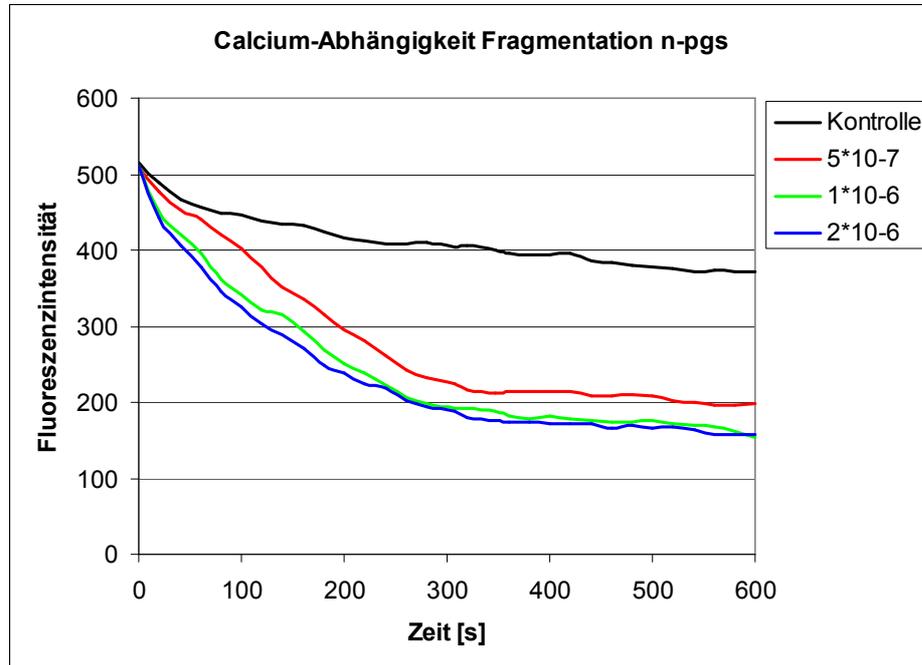
3.4.4 Bestimmung der Fragmentationsaktivität von nativem und rekombinantem Schweinegelsolin durch Fluorometrie bei verschiedenen Aktinen

Wie bereits unter 3.4.3 gezeigt wurde, führt die Zugabe von Schweinegelsolin zu einer Lösung, die F-Aktin enthält, zu einer deutlich messbaren Reduktion der spezifischen Viskosität, was einer Fragmentation der Aktinfilamente entspricht. Dieses Verhalten, welches sowohl bei nativ präpariertem als auch bei rekombinant exprimiertem Schweinegelsolin zu beobachten war, wurde in einem nächsten Schritt durch fluorometrische Messungen ergänzt und bestätigt. Die Messungen wurden wie unter 2.2.14 beschrieben durchgeführt.

Da die Aktivitäten der verschiedenen Deletionsmutanten bei der Fragmentation von Kaninchen-Skelettmuskel-F-Aktin bereits viskosimetrisch vermessen wurden und die Aktivitäten der einzelnen Gelsolin-Deletionsmutanten im Vergleich zu wt-pgs (sowohl dem nativ präparierten als auch dem rekombinant exprimierten) sich lediglich erneut bestätigen ließen, lag der Schwerpunkt bei den folgenden fluorimetrischen Messungen auf der vergleichenden Charakterisierung der Fragmentationsaktivität des nativen und rekombinanten wt-pgs bei unterschiedlichen Aktinen. Es konnte so ermittelt werden, dass die Aktivität beider Gelsoline bei der Fragmentation von vorpolymerisiertem F-Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskel, Schweine-Skelettmuskel und Schweine-Glattmuskel prinzipiell vergleichbar ist. Da das verwendete Gelsolin aus der Glattmuskulatur des Schweins stammte (und das rekombinant hergestellte Gelsolin diesem entsprach) war hierbei zu klären, ob es notwendig ist, Aktin aus dem gleichen Gewebe zu verwenden, oder ob für weitergehende Experimente auch Aktin aus anderen Geweben verwendet werden kann, welches die gleiche Aktivität des Gelsolins auslöst, aber präparativ einfacher herzustellen ist. Die Ergebnisse zeigten, dass die verschiedenen F-Aktine von den beiden Gelsolinen mit gut übereinstimmender Aktivität fragmentiert werden. Da das Kaninchen-SKM-Aktin die beste Polymerisations-Aktivität zeigte, am leichtesten herzustellen war und außerdem nur Skelettmuskelaktin in Pyrenaktin umgewandelt werden kann (bei Glattmuskelaktin muss ein Anteil von fluoreszenzmarkiertem Skelettmuskelaktin zugesetzt werden, da nur dieses markiert werden kann), wurde in allen späteren Fragmentationsversuchen Kaninchen-SKM-Aktin verwendet.

Untersuchung der Fragmentation von Schweine-SKM-F-Aktin durch n-pgs

A



B

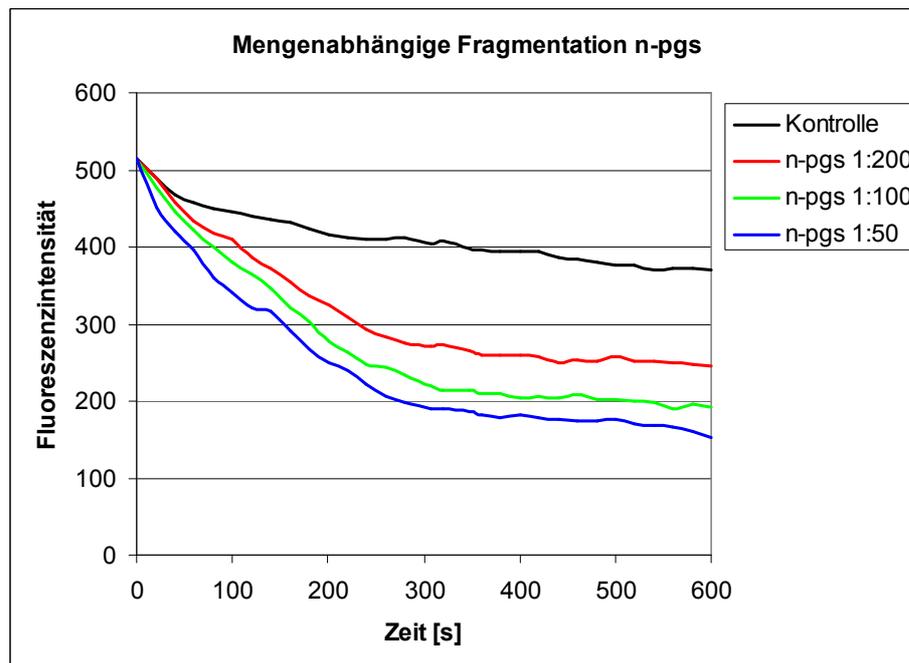


Abb. 3.4.17 Fragmentationsaktivität von n-pgs bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen und Gelsolinmengen in Gegenwart von Schweine-SKM-F-Aktin. (A) Die angegebenen Ca^{2+} -Konzentrationen haben die Einheit mol/l. Das Verhältnis Gelsolin:Aktin betrug hier 1:50. (B) Angegeben sind verschiedene Gelsolin:Aktin-Verhältnisse [mol:mol]. Die Ca^{2+} -Konzentration beträgt 0,2 mM.

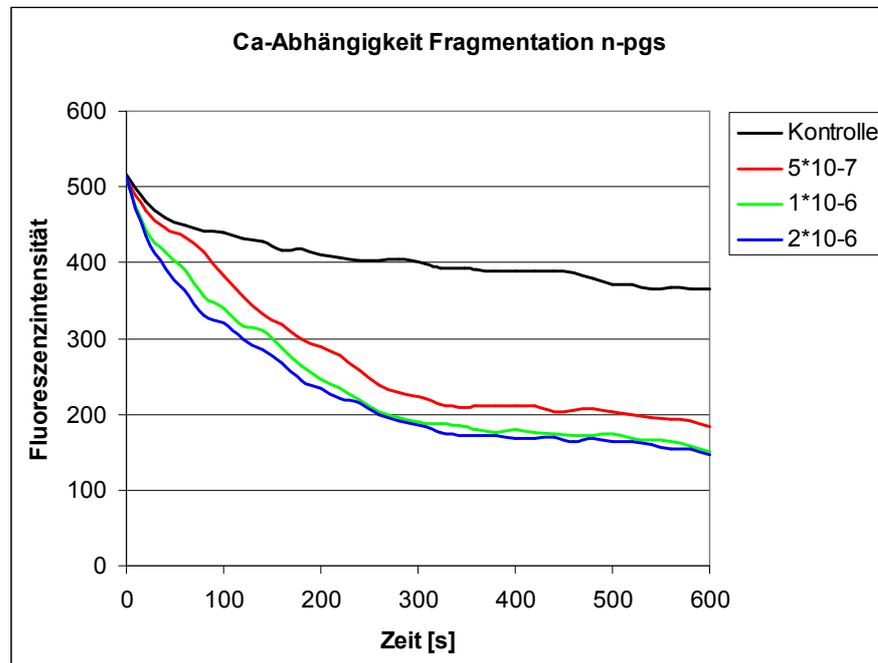
Abb. 3.4.17 stellt die Ergebnisse der Untersuchung der Fragmentation von Schweine-SKM-F-Aktin durch nativ präpariertes Schweinegelsolin dar. Die erste Grafik zeigt, dass n-pgs unter den beschriebenen Bedingungen ab einer Ca-Konzentration von 10^{-6} M volle Fragmentationsaktivität zeigt, die bei höheren Konzentrationen nicht mehr weiter ansteigt, bei geringeren Konzentrationen jedoch rasch geringer wird. Die Fluoreszenzintensität fällt dabei von ca. 500 auf Werte zwischen 160 und 200 ab, was einer Reduktion von 60 bis 70 % entspricht. Die zweite Grafik zeigt die Abhängigkeit der Fragmentationsaktivität von der Gelsolinmenge bei fester Ca-Konzentration von 0,2 mM. Die Werte fallen dabei von anfänglich ca. 510 auf 250 bei einem Aktin-Gelsolin-Verhältnis von 1:200, auf 195 bei 1:100 und 150 bei 1:50. Dies entspricht einem Rückgang der Fluoreszenzintensität von 51 %, 62 % und 71 %.

Im Gegensatz zu den unter 3.4.3 dargestellten viskosimetrischen Fragmentationstests, stellen diese fluorometrisch gemessenen Kurven nicht direkt die Fragmentation des F-Aktin dar, sondern zeigen primär die Depolymerisation des Aktins, woraus aber auf die Fragmentation geschlossen werden kann, weil bei den entstehenden vielen kürzeren Filamenten die Gesamt-Depolymerisation entsprechend schneller ist.

Die Abbildungen 3.4.18 und 3.4.19 stellen die Ergebnisse der Untersuchungen der Fragmentation von Kaninchen-SKM-F-Aktin und Schweine-GM-F-Aktin durch nativ präpariertes Schweinegelsolin dar. Dabei zeigt Grafik A jeweils die Ca-Abhängigkeit der Fragmentation und Grafik B jeweils die mengenabhängige Untersuchung der Fragmentationsaktivität. Die für die entsprechenden Messungen ermittelten Werte für den jeweiligen Rückgang der Fluoreszenzintensitäten sind in Tabelle 3.4.1 zusammenfassend dargestellt.

Untersuchung der Fragmentation von Kaninchen-SKM-F-Aktin durch n-pgs

A



B

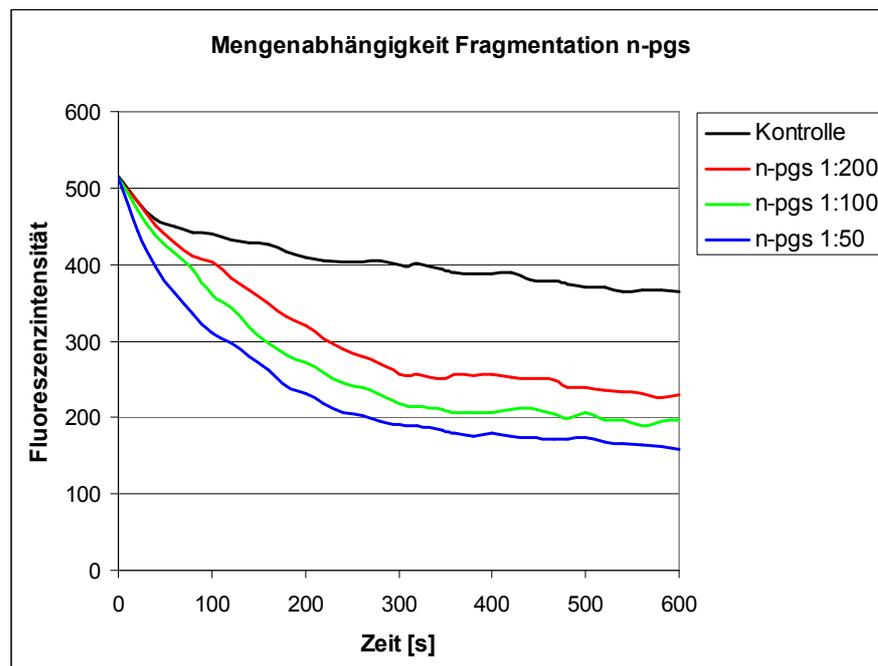


Abb. 3.4.18 Fragmentationsaktivität von n-pgs bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen und Gelsolinmengen in Gegenwart von Kaninchen-SKM-F-Aktin. (A) Die erste Grafik zeigt die Ca-abhängigkeit der Fragmentationsaktivität. Die angegebenen Konzentrationen haben die Einheit mol/l. Das Verhältnis Gelsolin:Aktin betrug hier 1:50. (B) Die zweite Grafik zeigt die Abhängigkeit der Fragmentationsaktivität von der Gelsolinmenge bei fester Ca-Konzentration von 0,2 mM.

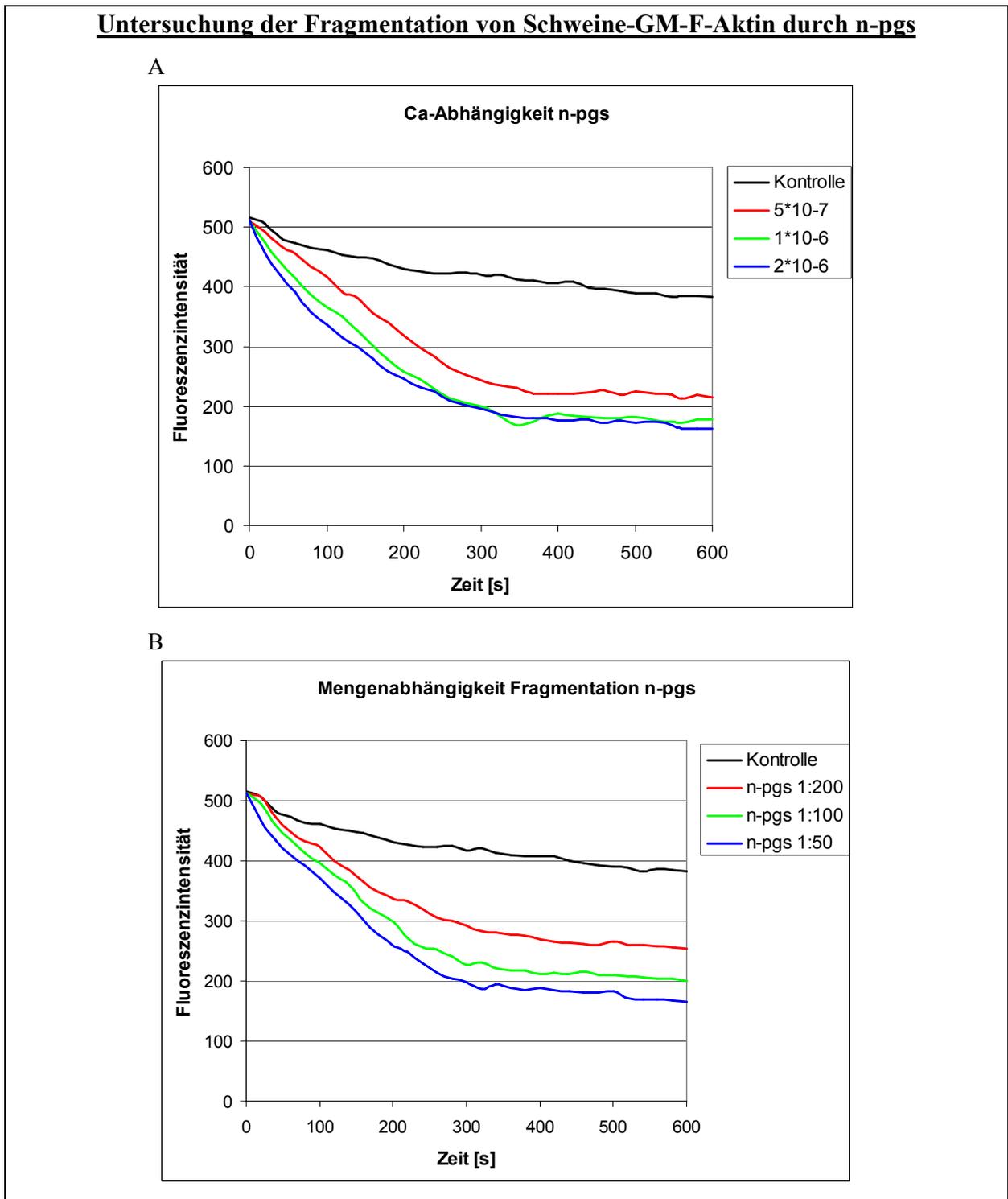


Abb. 3.4.19 Fragmentationsaktivität von n-pgs bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen und Gelsolinmengen in Gegenwart von Schweine-GM-F-Aktin. Die erste Grafik zeigt, dass n-pgs unter den beschriebenen Bedingungen ab einer Ca-Konzentration von 10^{-6} M volle Fragmentationsaktivität zeigt, die bei höheren Konzentrationen nicht mehr weiter ansteigt, bei geringeren Konzentrationen jedoch rasch geringer wird. Die angegebenen Konzentrationen haben die Einheit mol/l. Das Verhältnis Gelsolin:Aktin betrug hier 1:50. Die zweite Grafik zeigt die Abhängigkeit der Fragmentationsaktivität von der Gelsolinmenge bei fester Ca-Konzentration von 0,2 mM.

Die dargestellten Messungen wurden in einem weiteren Schritt mit rekombinant exprimiertem Schweinegelsolin wiederholt. Die Ergebnisse dieser, sowie der oben dargestellten Messungen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Messbedingungen Proteinmischung	[Ca ²⁺] 5·10 ⁻⁷ M	[Ca ²⁺] 1·10 ⁻⁶ M	[Ca ²⁺] 2·10 ⁻⁶ M	Aktin:pgs 1:200	Aktin:pgs 1:100	Aktin:pgs 1:50
n-pgs / Schwein-SKM	61 %	70 %	69 %	52 %	62 %	70 %
n-pgs / Kanin.-SKM	64 %	70 %	71 %	55 %	62 %	69 %
n-pgs / Schwein-GM	58 %	65 %	68 %	50 %	61 %	68 %
r-pgs / Schwein-SKM	60 %	67 %	71 %	51 %	61 %	69 %
r-pgs / Kanin.-SKM	61 %	70 %	69 %	53 %	61 %	70 %
r-pgs / Schwein-GM	59 %	68 %	67 %	51 %	59 %	68 %

Tab. 3.4.1 Übersicht über die gemessenen Fragmentationsaktivitäten bei Verwendung von verschiedenen Aktinen und nativem sowie rekombinantem Schweinegelsolin. Die angegebenen Werte beschreiben den Rückgang der gemessenen Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Startwert.

Wie man anhand der Werte in Tab. 3.4.1 sehen kann, liegen die Abweichungen zwischen den Messwerten beim Vergleich von nativem und rekombinantem Schweinegelsolin zwischen 0 und 3 % und beim Vergleich der Aktinsorten untereinander zwischen 1 % und 6 %. Dies ergänzt die Einschätzung aus den bisherigen Messungen, dass sich das rekombinant exprimierte Gelsolin genauso verhält wie das rekombinante. Auch die Unterschiede zwischen den Aktinen sind so gering, dass man für Messungen mit Glattmuskel-Gelsolin Kaninchen-Skelettmuskel-Aktin verwenden kann, ohne die Bedingungen, wie sie im Glattmuskel herrschen, zu stark zu verfälschen.

3.4.5 Untersuchung der Bindungsfähigkeit der Tropomyosin α -Varianten an Aktin durch Kosedimentation

In weiterführenden Versuchen sollte geklärt werden, ob die Interaktion von Tropomyosin und Gelsolin die Aktivität von Gelsolin beeinflusst. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob das rekombinant exprimierte Tropomyosin α sich genau so gut an F-Aktin anlagert wie nativ präpariertes Tropomyosin aus der Glatt- und Skelettmuskulatur. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Tropomyosinformen zusammen mit F-Aktin kosedimentiert, um zu zeigen ob sich das Tropomyosin zusammen mit dem F-Aktin pellettieren lässt. Tropomyosin allein sedimentiert unter diesen Bedingungen nicht (hier nicht gezeigt).

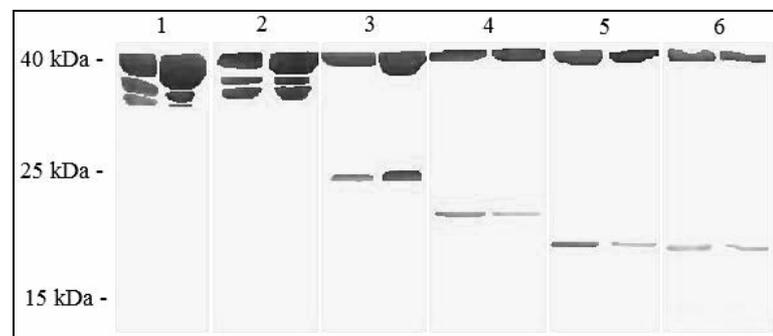


Abb. 3.4.20 Kosedimentation von F-Aktin und verschiedenen Varianten von Tropomyosin. Das Bild zeigt Ausschnitte einer gelelektrophoretischen Analyse. Überstand und Pellet wurden nach erfolgter Zentrifugation getrennt und durch SDS-PAGE miteinander verglichen. Die Proben wurden in einem 12,5 %-igen Gel aufgetrennt. (1) Überstand und Pellet natives GM-TM, (2) Überstand und Pellet natives SKM-TM, (3) Überstand und Pellet TM α F1, (4) Überstand und Pellet TM α F1/101, (5) Überstand und Pellet TM α F1/150, (6) Überstand und Pellet TM α F2. Die molaren Verhältnisse betragen in (1) – (3) Tropomyosin:Aktin 1:2 und in (4) – (6) 1:4.

Sowohl alle Formen von wt-TM, als auch alle Deletionsmutanten von TM α waren in der Lage, an F-Aktin zu binden. Dies ist zusammen mit den durchgeführten CD-Spektroskopiemessungen ein Hinweis darauf, dass die aufgereinigten Tropomyosinvarianten richtig gefaltet sind und ihre natürliche physiologische Funktion ausüben können, die ebenfalls darin besteht, sich an F-Aktin-Filamente anzulagern und dort gegebenenfalls regulatorische Aufgaben zu erfüllen, sowie das F-Aktin zu stabilisieren.

3.5 Nachweis und Charakterisierung der Wechselwirkung von Tropomyosin und Gelsolin

Nachdem in den vorangehenden Versuchen die Basisaktivitäten der verschiedenen Proteine in Bezug auf ihre Aktivität mit Aktin untersucht wurden, sollen nun im nächsten Teil der Arbeit Wechselwirkungen der beiden Proteine Gelsolin und Tropomyosin untereinander untersucht werden. Durch verschiedene biochemische und biophysikalische Methoden soll versucht werden, den Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion bzw. -bindung zu erbringen. Eine solche Wechselwirkung zwischen Gelsolin und Tropomyosin wäre dann die Grundlage um eine Beeinflussung der Aktivitäten der beiden Proteine im Bezug auf Aktin, insbesondere eine veränderte Fragmentationsaktivität des Gelsolins durch den Einfluss von Tropomyosin zu erklären.

3.5.1 Untersuchung der Interaktion von Tropomyosin und Gelsolin durch chemische Quervernetzung

Bei dieser Methode wird versucht, Proteine, welche sich in räumlicher Nähe zueinander befinden durch eine chemische Reagenz quervernetzen. Da dies in kurzer Zeit nur bei Proteinen gelingt, die eine spezifische Affinität zueinander haben, und miteinander wechselwirken, ist dies eine Möglichkeit Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren.

Die zu untersuchenden Proteine wurden mit dem quervernetzenden Reagenz EDC versetzt. Anschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE analysiert. Vor der Zugabe von EDC wurden die Tropomyosin- und Gelsolin-Varianten eine Stunde in Gegenwart von Calcium bei RT inkubiert. Die Proben für die SDS-PAGE wurden nach 5, 15 und 30 Minuten entnommen. Zur Kontrolle wurden die beiden Proteine einzeln durch EDC quervernetzt, um zu zeigen ob die Proteine auch mit sich selbst Quervernetzungsprodukte bilden.

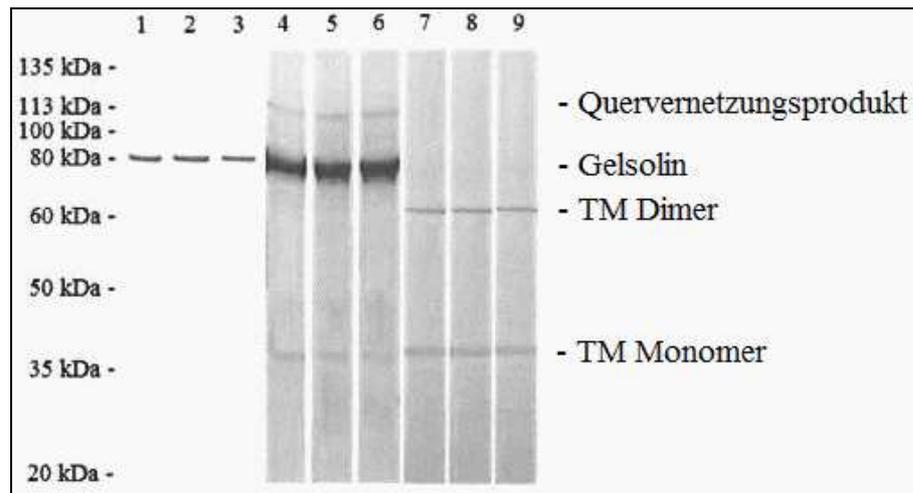


Abb. 3.5.1 Chemische Quervernetzung von r-TM α mit r-pgs durch EDC. Nachdem die beiden Proteine eine Stunde vorinkubiert wurden, wurden die Proben mit 5 mM EDC versetzt. Die Reaktion wurde nach 5, 15 und 30 min mit SDS-Probenpuffer aufgeköcht und so gestoppt. (1) Gelsolin 5 min, (2) Gelsolin 15 min, (3) Gelsolin 30 min, (4) Gelsolin/Tropomyosin 5 min, (5) Gelsolin/Tropomyosin 15 min, (6) Gelsolin/Tropomyosin 30 min, (7) Tropomyosin 5 min, (8) Tropomyosin 15 min, (9) Tropomyosin 30 min.

In Abb. 3.5.1 ist zu erkennen, dass Gelsolin (1-3) keine Quervernetzungsprodukte mit sich selbst bildet (Banden nur bei ca. 80 kDa) und sich bei Tropomyosin (7-9) sehr schnell ein Produkt mit doppelter Masse bildet (Monomer bei ca. 33 kDa; Dimer bei ca. 66 kDa). Das ist verständlich, da Tropomyosin physiologisch als Dimer vorliegt und die Bildung von Dimerquervernetzungsprodukten, die sich durch SDS-PAGE nicht mehr trennen lassen recht einfach möglich sein sollte. Diese Produkte bilden sich auch bei einem Ansatz, der r-pgs und r-TM α enthält recht schnell. Darüber hinaus kann man in den Ansätzen, die Gelsolin und Tropomyosin enthalten recht schnell ein Produkt beobachten, was der Größe von Gelsolin und einem Tropomyosin-Monomer entspricht (113 kDa). Erst bei längerer Inkubation zeigen sich langsam Quervernetzungsprodukte die der Größe von Gelsolin+Tropomyosindimer entsprechen (in Abb. 3.5.1 schwer zu erkennen, Ansätze zeigen sich in (6)). Somit kann gezeigt werden, dass rekombinantes Schweinegelsolin und rekombinantes Tropomyosin α miteinander wechselwirken und Quervernetzungsprodukte bilden. Dies stimmt gut mit Experimenten, die mit nativ präparierten Proteinen durchgeführt wurden überein (hier nicht gezeigt). Es gelang jedoch nicht, positive Resultate aus Quervernetzungs-Experimenten mit verschiedenen Deletionsmutanten zu erhalten, um dadurch eine mögliche Bindungsstelle der beiden Proteine eingrenzen zu können. Um zu ermitteln, ob auch diese Proteine direkt miteinander wechselwirken, was aufgrund der Ergebnisse aus Aktivitätstests zu erwarten war, musste auf noch sensitivere Verfahren zurückgegriffen werden (siehe 3.5.2).

3.5.2 Untersuchung der Interaktion von Tropomyosin und Gelsolin durch Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Die biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA[®]) verwendet das physikalische Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz. Die Änderung dieser Resonanz hängt von der Konzentration an Molekülen auf der Oberfläche eines Sensorchips ab. Dabei können bereits sehr geringe Unterschiede detektiert werden und es ist so möglich kinetische Konstanten und Affinitätskonstanten der Interaktion zwischen zwei Molekülen zu ermitteln, wovon ein Bindungspartner fest auf den Chip gekoppelt ist. Dabei ist der Sensorchip der eigentliche Signalüberträger. Dieser besteht aus Glas und trägt einen dünnen Goldfilm auf einer Seite. Auf dem Goldfilm befindet sich eine Matrix, die über einen Linker mit dem Goldfilm kovalent verknüpft ist. An diese Matrix können Biomoleküle gekoppelt werden.

a) Beladen des Chips mit dem zu koppelnden Bindungspartner

Für die folgenden Versuche wurde der CM5 Chip verwendet, der über eine Carboxymethyl-dextran-Matrix verfügt. Bei der Beladung des Chips wurden zunächst die auf der Dextranmatrix befindlichen Carboxylgruppen mit EDC/NHS aktiviert. Anschließend wurde durch PDEA eine aktive Schwefelgruppe eingefügt, so dass eine Thiolkopplung möglich wurde. Nach der Aktivierung wurde das zu bindende Protein gekoppelt, welches mit dem Liganden interagieren sollte. Nach der Kopplung wurden verbleibende aktivierte Gruppen durch Cystein blockiert.

Es wurden sowohl die Messzelle Fc2 als auch die Referenzzelle Fc1 auf die gleiche Weise behandelt und beide mit dem jeweiligen Protein gekoppelt. Die Menge des Proteins, die auf die Oberfläche des Chips gekoppelt wurde konnte anhand der Höhe der Messkurve verfolgt werden. Für eine optimale Beladung sollte der Anstieg der Kurve bei Zugabe des Proteins ca. 7000 RU betragen.

Der Verlauf des Kopplungsvorgangs ist anhand der nachfolgenden Abbildung 3.5.2 beispielhaft für G-Aktin dokumentiert.

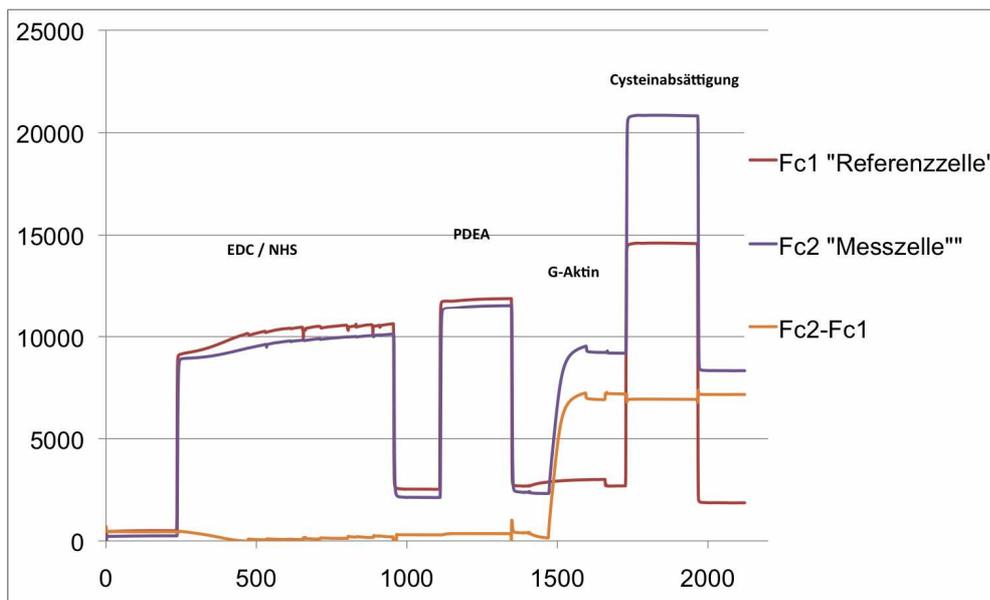


Abb. 3.5.2 Sensogram des Kopplungsvorgangs von G-Aktin auf den CM5 Chip. Die Einheiten der x-Achse sind Sekunden, die der y-Achse RU (Response Units). Gezeigt sind der Verlauf der Kopplung in der Referenzzelle Fc1, der Messzelle Fc2, sowie die errechnete Differenzkurve Fc2-Fc1.

Bei den Messungen, bei denen statt G-Aktin andere Proteine auf den Chip gekoppelt wurden (Gelsolin und Tropomyosin α) wurde prinzipiell genauso verfahren, lediglich die Pufferbedingungen mussten dem entsprechenden Protein angepasst werden.

b) Bindungsstudien von Aktin, Gelsolin und Tropomyosin

Um die Interaktion von Gelsolin und Tropomyosin durch Oberflächenplasmonresonanz zu untersuchen, wurden Ansätze mit verschiedenen auf CM5 Chips gekoppelten Proteinen gemacht. Über die auf die entsprechenden Chips gekoppelten Liganden-Proteine wurden die zu untersuchenden Analyten-Proteine geleitet, welche verschiedene Varianten von Gelsolin und Tropomyosin beinhalteten. Zuerst wurde wieder untersucht, ob für die zu untersuchenden Proteine Wechselwirkungen mit Aktin nachweisbar sind. Dies bietet die Möglichkeit eines Vergleichs mit den durch Viskosität ermittelten Basisaktivitäten. Da Aktin-Filamente aus technischen Gründen nicht adäquat an die Chips gebunden werden können, wurde hier lediglich eine Interaktion mit G-Aktin untersucht. In weiteren Versuchen wurden sowohl Schweinegelsolin als auch Tropomyosin α auf CM5 Chips gekoppelt und untersucht, welche Proteinvarianten jeweils an sie binden. Um abschließend noch Aussagen über die Stärke einer beobachteten Bindung machen zu können, wurden Verdünnungsreihen gemessen aus denen man kinetische Konstanten und Affinitätskonstanten der Interaktion ermitteln konnte. Dabei

wurde in der Regel in einem Konzentrationsbereich von 200 – 50 nM gemessen. Versuche, bei denen bei einer Analyt-Konzentration von 1 μ M keine Bindung detektiert werden konnte, wurden als negativ gewertet.

In den folgenden Abbildungen 3.5.3 bis 3.5.10 sind die Sensogramme der wichtigsten Messungen, bei denen eine Protein-Protein-Interaktion detektiert werden konnte, gezeigt. Messungen, bei denen die Proteine nicht miteinander wechselwirkten sind nicht gezeigt, da solche Messungen keine charakteristischen Kurven ergeben, die auswertbar sind. In Tab. 3.5.1 sind alle durchgeführten und ausgewerteten Messungen in einer Übersichtsgrafik zusammengefasst. Dort sind auch die ermittelten Bindungskonstanten angegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der BIAevaluation 3.0-Software.

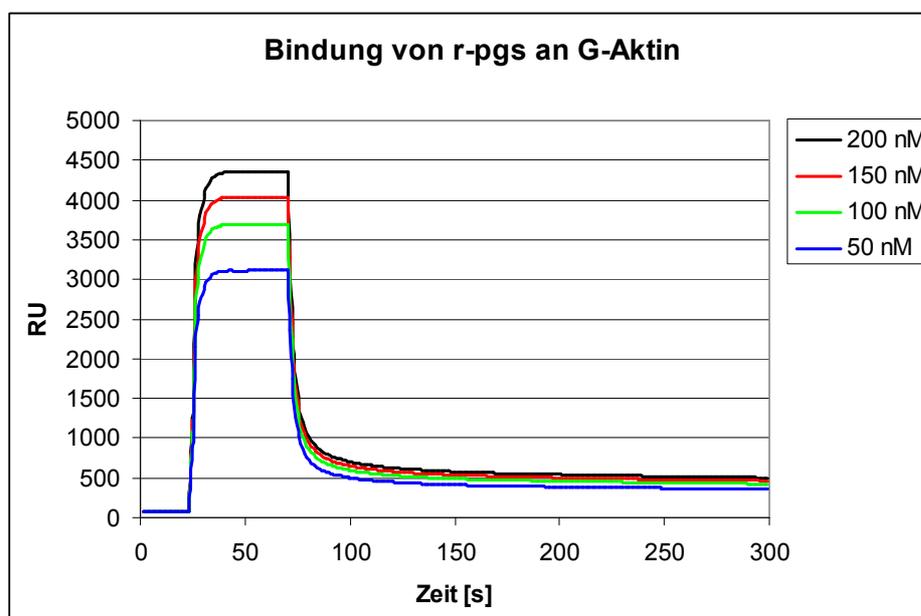


Abb. 3.5.3 SPR-Bindungsstudien mit rekombinantem Schweinegelsolin an immobilisiertem G-Aktin. Durchgeführt wurde eine Bindungsstudie mit Verdünnungsreihe (200 nM, 150 nM, 100 nM und 50 nM r-pgs). Wiedergegeben ist jeweils die Differenz an Response Units (RU) zur Referenzflusszelle nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit.

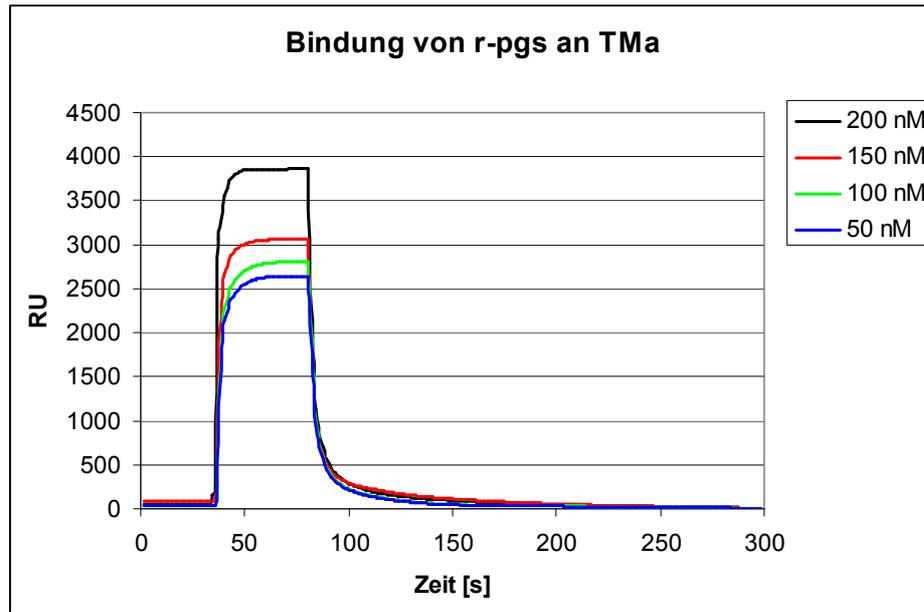


Abb. 3.5.4 SPR-Bindungsstudien mit rekombinantem Schweinegelsolin an immobilisiertem Tropomyosin α . Durchgeführt wurde eine Bindungsstudie mit Verdünnungsreihe (200 nM, 150 nM, 100 nM und 50 nM r-pgs). Wiedergegeben ist jeweils die Differenz an Response Units (RU) zur Referenzflusszelle nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit.

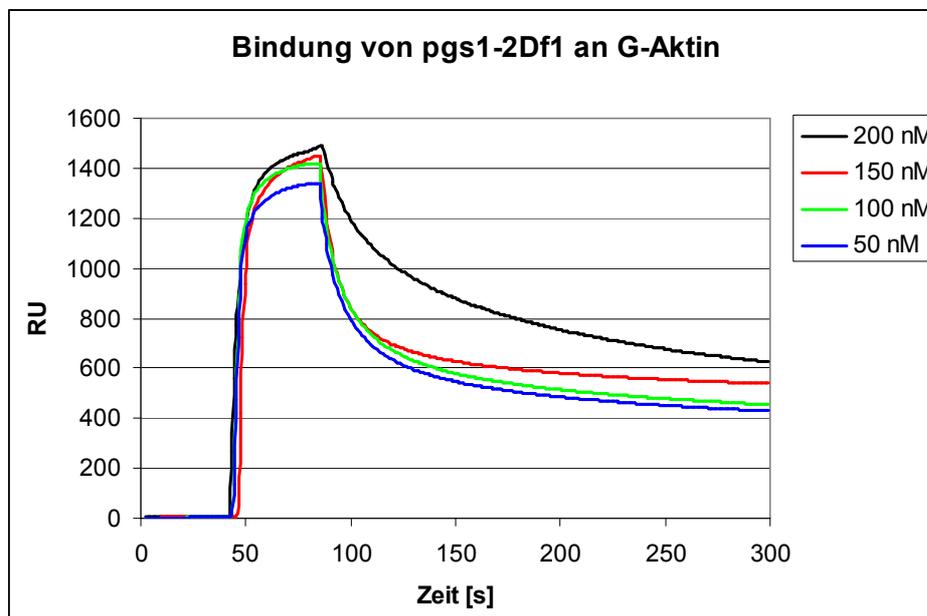


Abb. 3.5.5 SPR-Bindungsstudien mit rekombinantem pgs1-2Df1 an immobilisiertem G-Aktin. Durchgeführt wurde eine Bindungsstudie mit Verdünnungsreihe (200 nM, 150 nM, 100 nM und 50 nM pgs1-2Df1). Wiedergegeben ist jeweils die Differenz an Response Units (RU) zur Referenzflusszelle nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit.

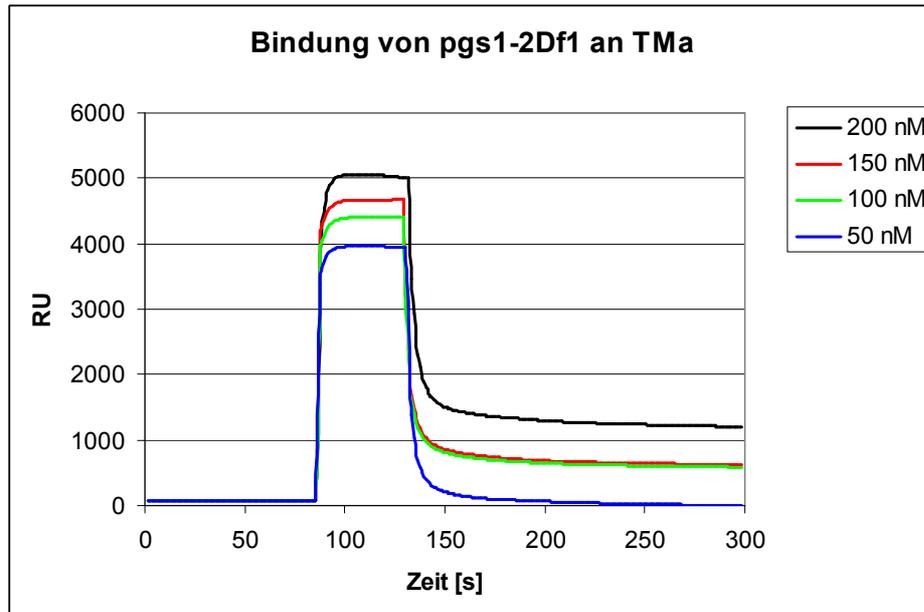


Abb. 3.5.6 SPR-Bindungsstudien mit rekombinantem pgs1-2Df1 an immobilisiertem TMA. Durchgeführt wurde eine Bindungsstudie mit Verdünnungsreihe (200 nM, 150 nM, 100 nM und 50 nM pgs1-2Df1). Wiedergegeben ist jeweils die Differenz an Response Units (RU) zur Referenzflusszelle nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit.

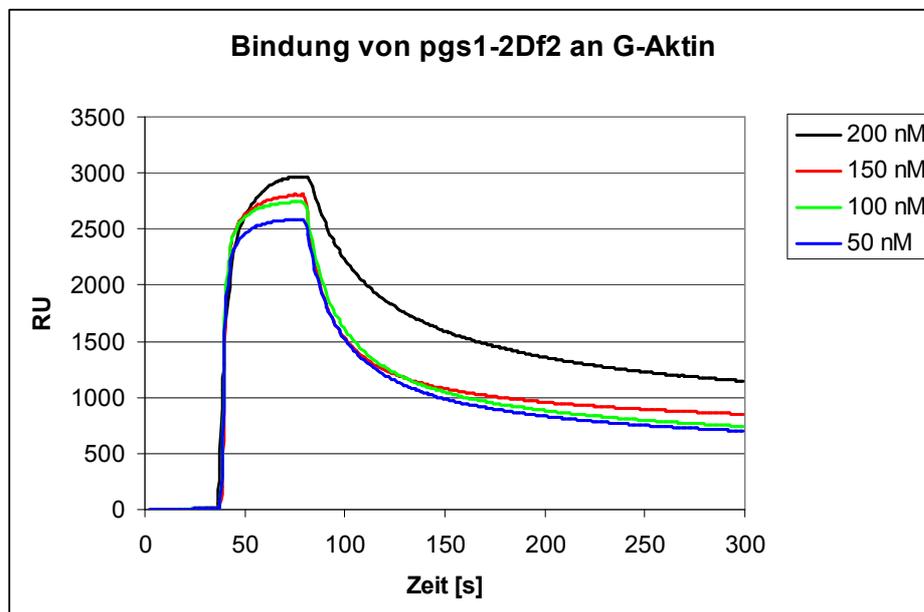


Abb. 3.5.7 SPR-Bindungsstudien mit rekombinantem pgs1-2Df2 an immobilisiertem G-Aktin. Durchgeführt wurde eine Bindungsstudie mit Verdünnungsreihe (200 nM, 150 nM, 100 nM und 50 nM pgs1-2Df2). Wiedergegeben ist jeweils die Differenz an Response Units (RU) zur Referenzflusszelle nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit.

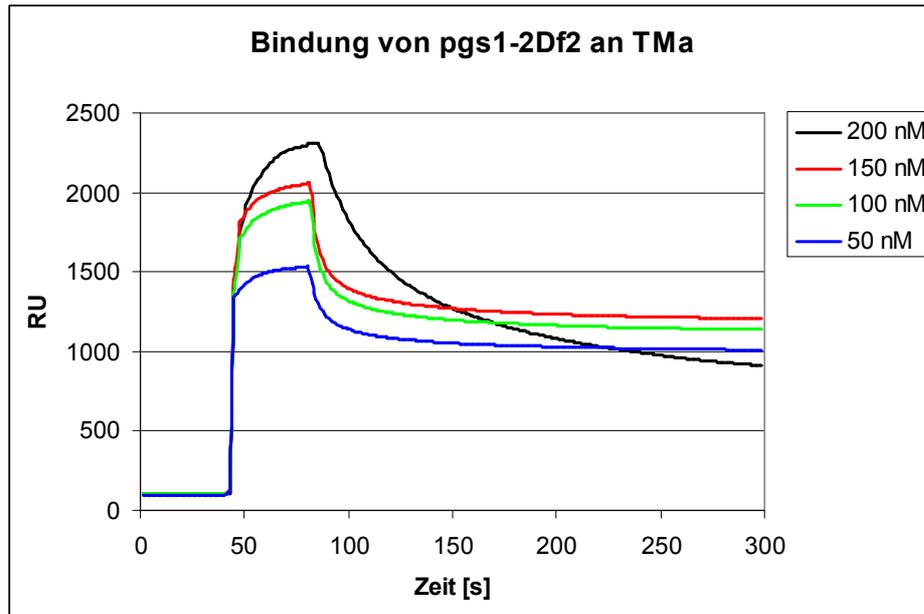


Abb. 3.5.8 SPR-Bindungsstudien mit rekombinantem pgs1-2Df2 an immobilisiertem TM α . Durchgeführt wurde eine Bindungsstudie mit Verdünnungsreihe (200 nM, 150 nM, 100 nM und 50 nM pgs1-2Df2). Wiedergegeben ist jeweils die Differenz an Response Units (RU) zur Referenzflusszelle nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit.

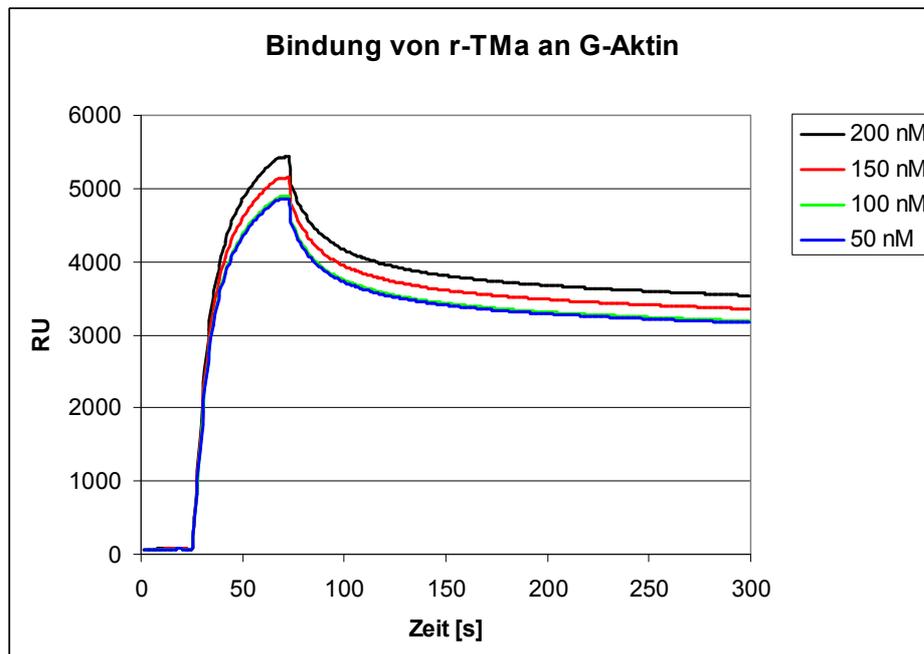


Abb. 3.5.9 SPR-Bindungsstudien mit rekombinantem TM α an immobilisiertem G-Aktin. Durchgeführt wurde eine Bindungsstudie mit Verdünnungsreihe (200 nM, 150 nM, 100 nM und 50 nM r-TM α). Wiedergegeben ist jeweils die Differenz an Response Units (RU) zur Referenzflusszelle nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit.

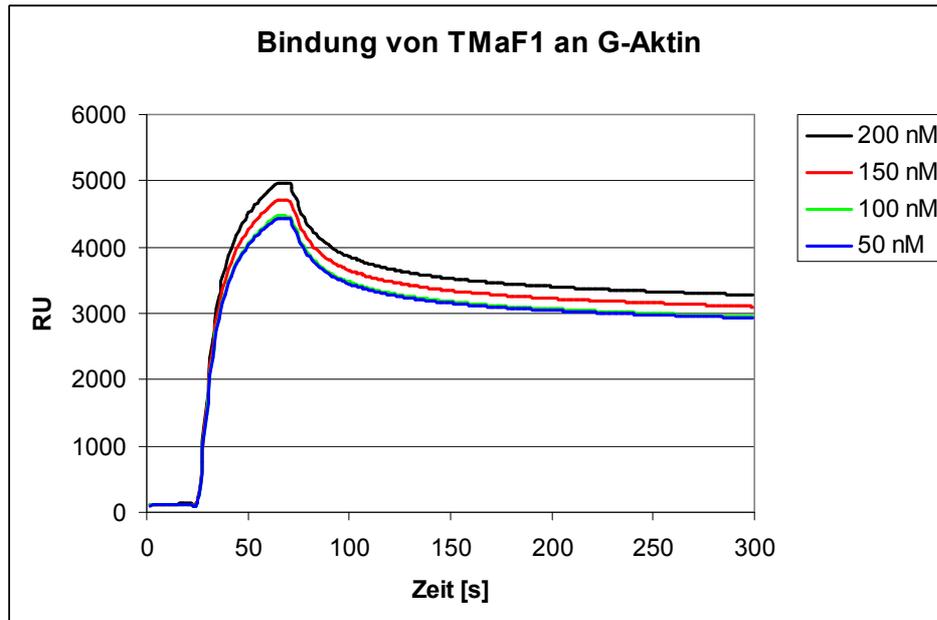


Abb. 3.5.10 SPR-Bindungsstudien mit rekombinantem TMαF1 an immobilisiertem G-Aktin. Durchgeführt wurde eine Bindungsstudie mit Verdünnungsreihe (200 nM, 150 nM, 100 nM und 50 nM TMαF1). Wiedergegeben ist jeweils die Differenz an Response Units (RU) zur Referenzflusszelle nach Injektion des Analyten, aufgetragen gegen die Zeit.

Gekoppeltes Protein → Injiziertes Protein ↓	G-Aktin	TMα	wt-pgs
wt-pgs	$1,28 \cdot 10^{-11}$	$3,03 \cdot 10^{-10}$	
pgs1-3	$2,83 \cdot 10^{-11}$	$8,76 \cdot 10^{-9}$	
pgs1-2	$2,17 \cdot 10^{-11}$	$1,94 \cdot 10^{-10}$	
pgs1-2Df1	$2,50 \cdot 10^{-11}$	$2,55 \cdot 10^{-10}$	
pgs1-2Df2	$3,52 \cdot 10^{-10}$	$8,68 \cdot 10^{-9}$	
pgsD1	$4,62 \cdot 10^{-10}$	Keine Interaktion	
pgsD2	Keine Interaktion	$9,88 \cdot 10^{-9}$	
TMα	$1,02 \cdot 10^{-11}$		$3,03 \cdot 10^{-10}$
TMαF1	$9,96 \cdot 10^{-10}$		$2,75 \cdot 10^{-10}$
TMαF1/101	$1,31 \cdot 10^{-11}$		Keine Interaktion
TMαF1/150	$1,56 \cdot 10^{-11}$		Keine Interaktion

Tab. 3.5.1 Übersicht über die mit SPR untersuchten Bindungen zwischen Aktin, Gelsolin und Tropomyosin und verschiedenen Deletionsmutanten. Die Dissoziationskonstante K_D ist in der Einheit [M] angegeben.

Zusammenfassung:

Die Bindungsexperimente der Gelsolin- und Tropomyosin α -Varianten an G-Aktin ergaben, dass alle Proteine bis auf pgsD2 in der Lage waren an monomeres Aktin zu binden. Die Tatsache, dass über die Bindestellen dieser Proteine auch tatsächlich G-Aktin gebunden werden kann zeigt, dass das jeweilige Protein in einer korrekt gefalteten Konformation vorliegt, was eine Ergänzung zu den durchgeführten CD-Messungen ist. Die Stärke der Bindung an G-Aktin liegt für alle durchgeführten Messungen in einer vergleichbaren Größenordnung. Man kann sehen, dass sowohl die Unterschiede zwischen Gelsolin und Tropomyosin, als auch in den beiden Gruppen von Deletionsmutanten recht gering sind. Dies ergänzt die vorherigen Messungen zur biologischen Aktivität der Proteine, insbesondere des Gelsolins. Da für die Aktivitäten des Gelsolins ein Zusammenspiel zwischen den Domänen 1 und 2 und somit zwischen der G-Aktin- und F-Aktinbindestelle nötig ist, war es schwierig einzuschätzen, welchen Einfluss auf die Gesamtaktivität die einzelnen Bindestellen ausüben. Da man durch die SPR-Messungen sieht, dass die G-Aktinbindestellen alle mit vergleichbarer Stärke binden, müssen die Aktivitätsunterschiede auf Unterschiede im Bereich der F-Aktinbindestelle zurückzuführen sein. Da Gelsolin und Tropomyosin Aktin mit vergleichbarer Stärke binden, ist nicht zu erwarten, dass ein Protein das andere leicht von Aktin als Bindungspartner verdrängen kann, andererseits kann eine Bindung des anderen Proteins auch nicht völlig gehemmt werden, so dass sich wahrscheinlich nach einiger Zeit ein Gleichgewichtszustand einstellen kann.

Die Bindungsstudien von Gelsolin-Varianten an $TM\alpha$ ergaben, dass alle Varianten, bis auf pgsD1 in der Lage sind, an dieses Protein zu binden. Dies erlaubt eine Lokalisation der $TM\alpha$ -Bindestelle im Gelsolin. Die Fähigkeit an $TM\alpha$ zu binden verschwindet plötzlich mit Verlust des N-terminalen Drittels von Domäne 2. Alle Varianten, die über diesen Abschnitt des Proteins verfügen, können an $TM\alpha$ binden und zwar auch mit fast identischer Bindungsstärke, woraus man weiterhin schließen kann, dass dieser Bereich bei allen Proteinen gleich gefaltet ist und sich nicht von Variante zu Variante leicht unterscheidet und zu einem stufenweisen Verlust der Bindungsfähigkeit führt.

Wenn man die SPR-Messungen der $TM\alpha$ -Varianten an Gelsolin auswertet sieht man, dass wt- $TM\alpha$ und $TM\alpha F1$ in der Lage sind, an Gelsolin zu binden. Die N-terminal weiter verkürzten Deletionsmutanten $TM\alpha F1/101$ und $TM\alpha F1/150$ sind dazu jedoch nicht in der Lage, obwohl sie andererseits weiterhin in der Lage sind an Aktin zu binden. Daraus kann man schließen,

dass die Bindestelle für Gelsolin innerhalb der N-terminalen 34 Aminosäuren des Proteins liegt.

Ein Vergleich der bekannten Lage der F-Aktin-Bindestelle auf Gelsolin mit der Lage der neu ermittelten Bindestelle für Tropomyosin zeigt, dass die beiden Bindestellen in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Dies könnte bedeuten, dass sich die Bindung von Tropomyosin und Aktin an Gelsolin gegenseitig behindern. Die Lage der Tropomyosin-Bindestelle auf Gelsolin wäre weiterhin fast identisch mit der PIP₂-Bindestelle auf Gelsolin, für welche ein solcher Hemmmechanismus bekannt ist.

Die Fähigkeit der verschiedenen Proteine aneinander zu binden und auch die Stärke, mit der sie binden, sind einerseits die Grundlage für die bereits vermessenen biologischen Basisaktivitäten der Proteine, als auch andererseits die Grundlage für die im nächsten Abschnitt untersuchten Wechselwirkungen von Tropomyosin und Gelsolin, die zu einer Modulation dieser bereits bekannten Aktivitäten führen. Gelsolin und Tropomyosin binden mit vergleichbarer Stärke sowohl aneinander, als auch an Aktin, was eine Hemmwirkung des Tropomyosins auf die Fragmentations-Aktivität des Gelsolins erklären könnte. Da die Bindung von Gelsolin an Tropomyosin zwar sehr stark ist, aber doch etwas schwächer als die Bindung an Aktin, könnte sich daraus ergeben, dass Tropomyosin nicht in der Lage ist, Gelsolin vollständig an der Bindung an Aktin zu hindern, selbst wenn Gelsolin und Tropomyosin zuerst aneinander binden.

3.6 Einfluss der Wechselwirkung von Tropomyosin mit Gelsolin auf die Fragmentation von F-Aktin durch Gelsolin

Wie bereits bei der Charakterisierung der Basisaktivitäten der Proteine gezeigt, kann die Fragmentationsaktivität des Gelsolins viskosimetrisch nachgewiesen werden. Die spezifische Viskosität einer F-Aktin-Lösung sinkt nach Zugabe von Gelsolin innerhalb kurzer Zeit sehr stark ab. Um zu untersuchen, ob die Gelsolin-Tropomyosin Wechselwirkung einen Einfluss auf die Fragmentationsaktivität von Gelsolin hat, wurden nun viskosimetrische Messungen in Gegenwart von Tropomyosin durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Messansätze verwendet, um zu zeigen ob es einen Unterschied macht, ob das Tropomyosin zuerst mit dem Aktin oder dem Gelsolin interagiert. Im ersten Ansatz wurde F-Aktin zuerst mit Tropomyosin oder einer seiner Deletionsmutanten inkubiert, bevor Gelsolin zu der Lösung zugegeben wurde. Im zweiten Ansatz wurden Tropomyosin und Gelsolin (oder eine Deletionsmutante) zuerst für ein Stunde in Gegenwart von 0,4 mM CaCl_2 vorinkubiert und dann zu der F-Aktin enthaltenden Lösung dazugegeben. Als Kontrollen wurden Messungen mit Proben, die nur F-Aktin, Aktin und Tropomyosin (1:4), Aktin und wt-Gelsolin (20:1) und Aktin und die entsprechende Gelsolin-Variante (20:1) enthielten durchgeführt.

Die Abbildungen 3.6.5 bis 3.6.8 zeigen vergleichende Messungen zur Ermittlung der Fragmentationsaktivität, die durchgeführt wurden, um zu überprüfen, ob die verschiedenen Gelsolin-Varianten von rekombinantem Tropomyosin α gehemmt werden. Zusätzlich sind in den Abbildungen die genannten Kontrollen mit angegeben, sowie als Referenz die entsprechenden Messungen mit wt-Gelsolin.

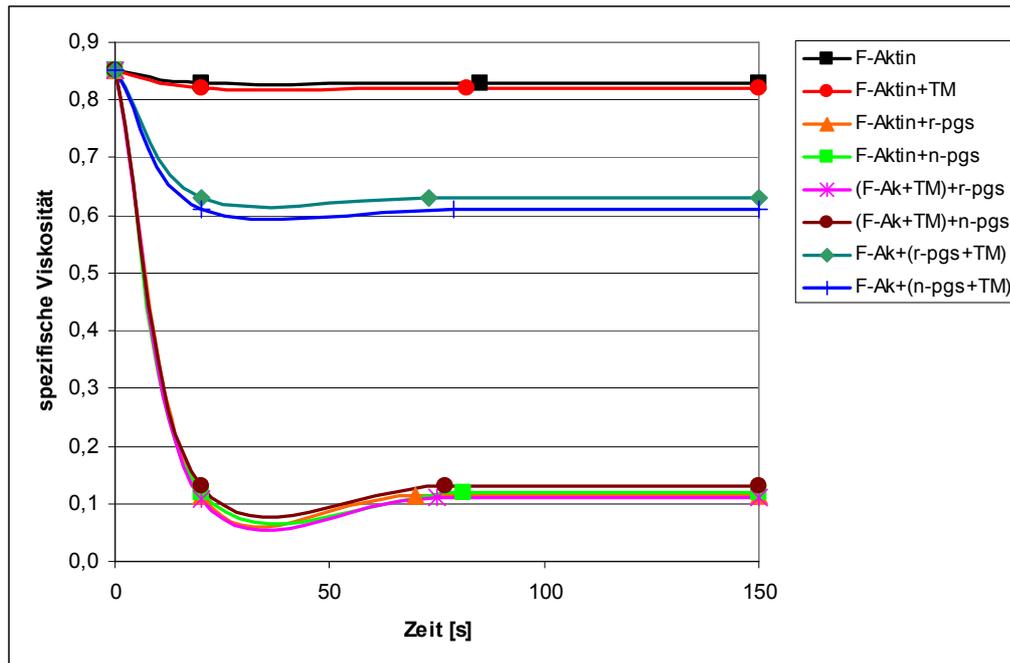


Abb. 3.6.5 Viskosimetrische Messung des Einflusses von $TM\alpha$ auf die Fragmentation von F-Aktin durch n-pgs und r-pgs. Die Ansätze enthielten 1 mg/ml F-Aktin. Die Fragmentation wurde durch die Zugabe von Gelsolin oder Gelsolin/Tropomyosin gestartet.

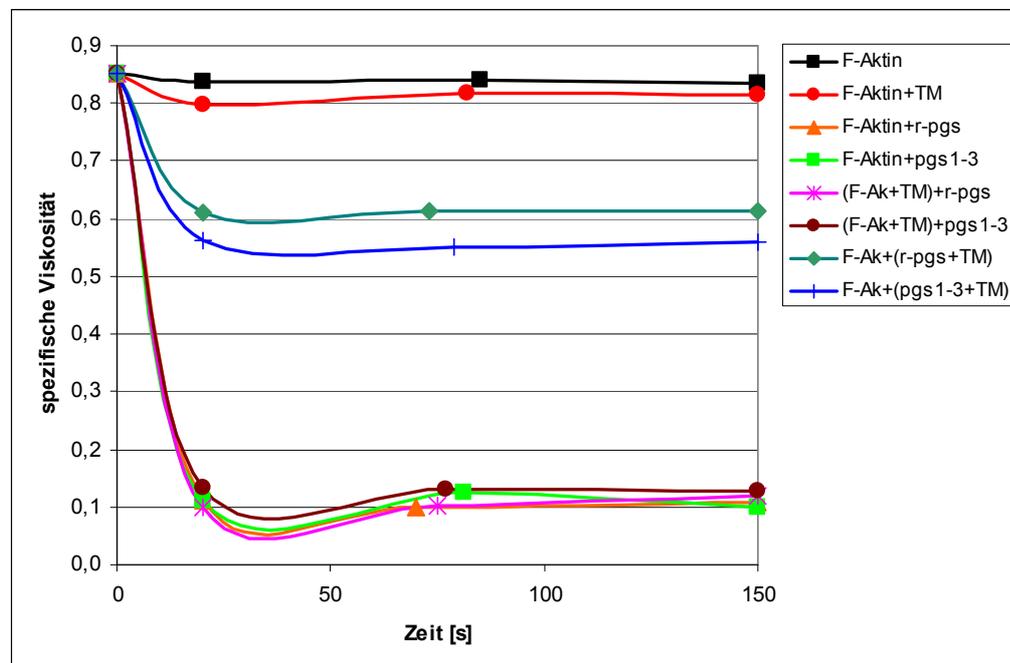


Abb. 3.6.6 Viskosimetrische Messung des Einflusses von $TM\alpha$ auf die Fragmentation von F-Aktin durch r-pgs und pgs1-3. Die Ansätze enthielten 1 mg/ml F-Aktin. Die Fragmentation wurde durch die Zugabe von Gelsolin oder Gelsolin/Tropomyosin gestartet.

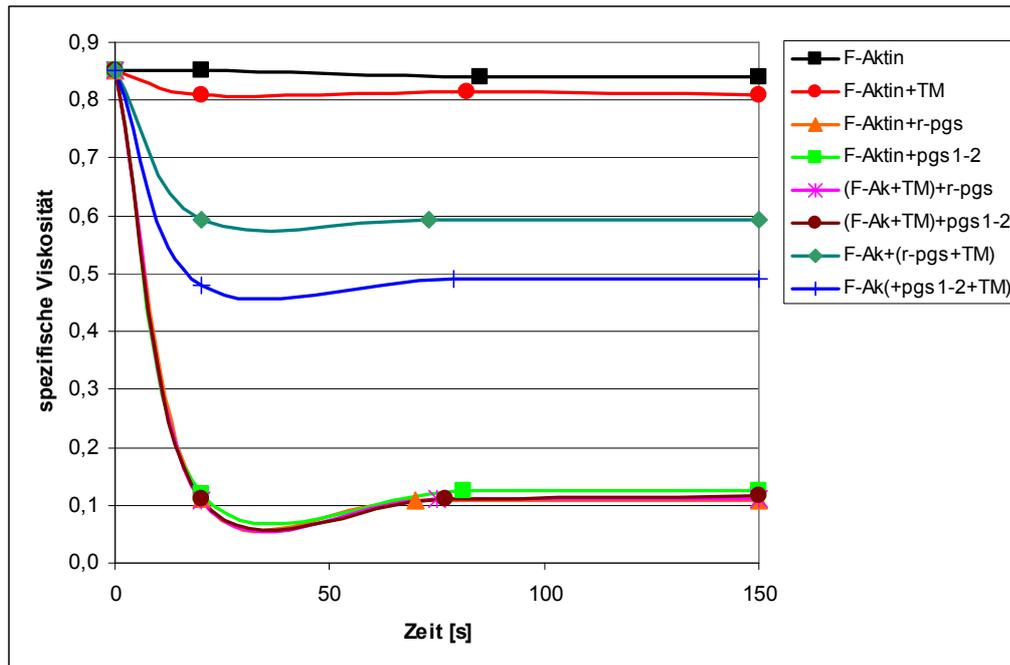


Abb. 3.6.7 Viskosimetrische Messung des Einflusses von $TM\alpha$ auf die Fragmentation von F-Aktin durch r-pgs und pgs1-2. Die Ansätze enthielten 1 mg/ml F-Aktin. Die Fragmentation wurde durch die Zugabe von Gelsolin oder Gelsolin/Tropomyosin gestartet.

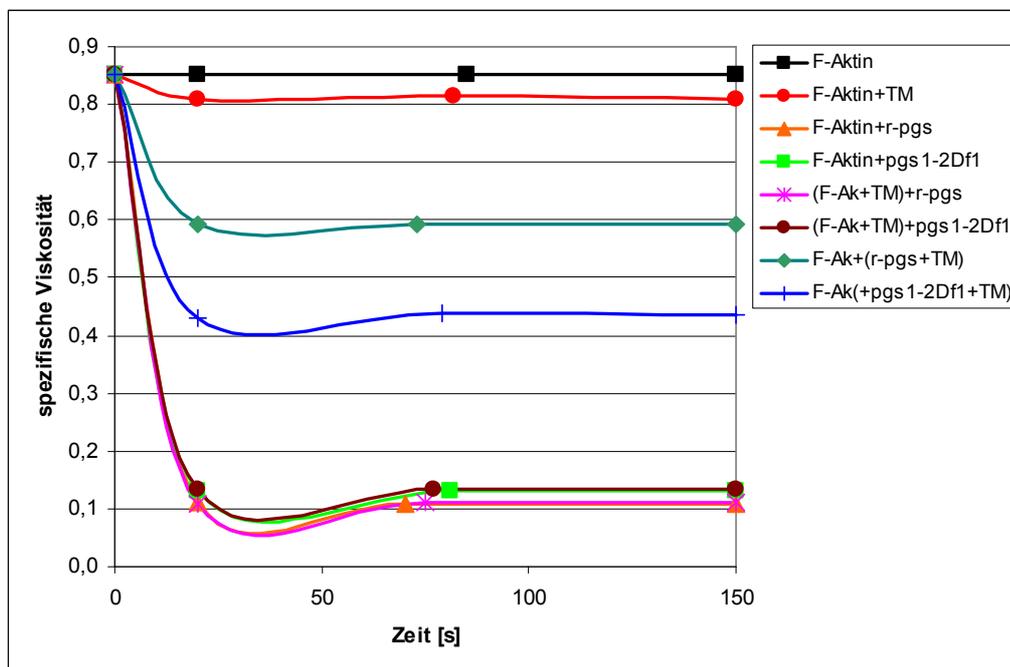


Abb. 3.6.8 Viskosimetrische Messung des Einflusses von $TM\alpha$ auf die Fragmentation von F-Aktin durch r-pgs und pgs1-2Df1. Die Ansätze enthielten 1 mg/ml F-Aktin. Die Fragmentation wurde durch die Zugabe von Gelsolin oder Gelsolin/Tropomyosin gestartet.

Die in den Abbildungen 3.6.5 bis 3.6.8 dargestellten Messungen wurden noch einmal mit verschiedenen Tropomyosin-Varianten wiederholt. Dabei wurden nativ präpariertes Glattmuskel-Tropomyosin (GM-TM), sowie die Tropomyosin α -Deletionsmutanten TM α F1, TM α F1/101 und TM α F1/150 verwendet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, sowie der oben gezeigten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Dabei ist jeweils der Unterschied zwischen dem prozentualen Rückgang der spezifischen Viskosität des Ansatzes mit Tropomyosin-Aktin-Vorinkubation und des Ansatzes mit Gelsolin-Tropomyosin-Vorinkubation angegeben, aus dem man einen vorhandenen Hemmeffekt sehen kann.

	r-TM α	GM-TM	TM α F1	TM α F1/101	TM α F1/150
wt-n-pgs	62 %	58 %	56 %	0 %	0 %
wt-r-pgs	64 %	58 %	55 %	0 %	0 %
pgs1-3	52 %	52 %	46 %	0 %	0 %
pgs1-2	46 %	39 %	49 %	0 %	0 %
Pgs1-2Df1	37 %	33 %	40 %	0 %	0 %

Tab. 3.6.1 Übersicht über die Hemmwirkung der vorherigen Gelsolin-Tropomyosin-Inkubation auf die Fragmentationsaktivität. Gezeigt ist die Hemmwirkung auf die F-Aktin-Fragmentation bei verschiedenen Kombinationen von Gelsolin-Varianten und Tropomyosin α -Varianten.

Zusammenfassung:

Die vorherige Zugabe von Tropomyosin zu einer F-Aktinlösung hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Fragmentationsaktivität des Gelsolins. Gibt man jedoch etwas von einer vorinkubierten Gelsolin-Tropomyosin-Lösung zu F-Aktin, so scheinen die vorgeformten Gelsolin-Tropomyosin-Komplexe eine deutlich geringere Fragmentationsaktivität zu besitzen als das reine Gelsolin, so dass man hier einen Hemmeffekt beobachten kann. Dieser Hemmeffekt ist jedoch in keinem Fall vollständig. Die Messungen zeigen, dass je nach verwendeter Kombination von Gelsolin- und Tropomyosin-Variante entweder gar keine Hemmung zu beobachten ist, oder eine Hemmung zwischen 33 und 64 % erreicht wird. Die Tatsache, dass die Tropomyosin-Varianten TM α F1/101 und TM α /150 in keiner Messung eine

Hemmung der Aktivität bewirken passt gut zu den Ergebnissen der SPR-Messungen, die gezeigt hatten, dass diese Deletionsmutanten nicht an Gelsolin binden können. Da jedoch bekannt ist, dass diese Proteine weiterhin an Aktin binden können, scheint die in den anderen Messungen gezeigte Hemmwirkung nicht auf eine Bindungs-Konkurrenz zwischen Gelsolin und Tropomyosin an Aktin zurückzuführen sein. Die Ergebnisse zeigen eher, dass Tropomyosin durch eine vorherige Bindung an Gelsolin die Fragmentation behindern kann. Die Stärke der Hemmung, die durch die verschiedenen Tropomyosin-Varianten vermittelt wird ist für die jeweils verwendete Gelsolin-Variante von vergleichbarer Größenordnung, wobei das rekombinante T α -Homodimer in den meisten Fällen eine etwas stärkere Hemmung hervorruft, als das native $\alpha\beta$ -Heterodimer aus Glattmuskel. Bei den Gelsolin-Varianten sieht man, dass die stärker verkürzten Gelsolin-Deletionsmutanten sich nicht so gut hemmen lassen, wie die längeren Varianten oder das wt-Gelsolin. Da die in 3.5.2 durchgeführten SPR-Messungen jedoch ergaben, dass die Bindungskonstanten der Proteine etwa gleich groß sind, könnten hier auftretende sterische Effekte eine Rolle spielen, die mit der deutlich veränderten Größe der Proteine zusammenhängen.

4 Diskussion

Die Stabilisierung und die Veränderung der Form einer Zelle, sowie in vielen Fällen auch die Fortbewegung einer Zelle, hängen von Auf- und Umbauprozessen des Cytoskeletts ab [Pollard & Borisy, 2003]. Insbesondere die Aktinfilamente spielen hierbei eine wichtige Rolle. Um diese Filamente entsprechend den jeweiligen Erfordernissen, denen die Zelle ausgesetzt ist, zu beeinflussen und somit ihre Funktion möglichst exakt zu regulieren, verfügt die Zelle über eine Kollektion von Proteinen, die mit Aktin interagieren [Dos Remedios, 2003; Stossel et al., 1985; Vandekerckhove, 1990; Hartwig & Kwiatkowski, 1991; Pollard, 1992]. Zwei wichtige Vertreter dieser Gruppe, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen, sind das Gelsolin und das Tropomyosin. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion dieser beiden Proteine mit dem Aktin, sowie die Interaktion der beiden Proteine untereinander untersucht.

Grundsätzlich konnte eine Bindung von Gelsolin an Tropomyosin bereits in früheren Studien nachgewiesen werden [Koepf & Burtnick, 1992; Maciver et al., 2000]. Andere Untersuchungen zeigten, dass die Fähigkeit des Gelsolins, an Aktin zu binden und Aktinfilamente zu fragmentieren, durch Tropomyosin beeinflusst werden kann [Ishikawa et al., 1989; Dabrowska et al., 1996]. Die in diesen Studien erhaltenen Ergebnisse wurden z.T. bestätigt und erweitert.

4.1 Aufreinigung der nativen Proteine aus Geweben

Gelsolin wird in Wirbeltieren in einer Vielzahl von Geweben hergestellt. Dabei kann man jeweils cytosolische Formen und sekretierte Formen unterscheiden, wobei letztere im Blutplasma der Organismen in größerer Menge zu finden sind [Weeds et al., 1986; Ruiz-Silva & Burtnick, 1989]. Cytosolische Formen wurden im Laufe der Jahre z.B. in Ovarien von Mensch [Kwiatkowski et al., 1988] und Maus [Teubner et al., 1994], in Nervengeweben [Tanaka & Sobue, 1994; Vouyiouklis, 1997], Makrophagen und Blutplättchen [Yin & Stossel, 1980; Yin et al., 1980; Kurth et al., 1983], sowie in Muskelgeweben wie der Glattmuskulatur von Blutgefäßen [Chaponnier, 1990], Darm und Magen [Kwiatkowski et al., 1988], der Herzmuskulatur [Rouayrenc, 1984], sowie in der Skelettmuskulatur gefunden [Dissmann, 1994]. Man findet Gelsolin jedoch nicht nur in einer Vielzahl von verschiedenen Geweben bei Vertebraten, es handelt sich bei Gelsolin auch um ein Protein, welches im Tierreich weit

verbreitet ist. So findet man Gelsolin z.B. auch bei Invertebraten [Heintzelman et al., 1993; Stella et al., 1994; Lück, 1995; Remmert, 1999; Unger & Hinssen, 2010].

Gelsolin wurde erstmalig aus Makrophagen der Lunge isoliert und charakterisiert [Yin & Stossel, 1979]. Die Isolierung aus Glattmuskelgewebe gelang erstmalig 1984 [Hinssen, 1984]. Das nativ präparierte Gelsolin wurde in dieser Arbeit nach der dort beschriebenen Methode hergestellt. Die Verwendung von Schweinemagen als Ausgangsmaterial hatte den Vorteil, dass es sich hierbei um gut erhältliches Ausgangsmaterial mit einem relativ hohem Gehalt an Gelsolin handelt. Für Gelsolin aus der Glattmuskulatur des Schweinemagens ist bekannt, dass mit etablierten Methoden recht große Mengen isoliert werden können. Der Gesamtgehalt des Gewebes an Gelsolin liegt bei ca. 0,05 - 0,1 % des Gesamtproteins des Muskels. In Skelettmuskeln von Mammaliern wurden hingegen deutlich niedrigere Konzentrationen an Gelsolin ermittelt [D'Haese & Hinssen, 1987]. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Präparation wurde ein Protein von ca. 80 kDa Größe erhalten, welches nach dem letzten Chromatographieschritt in ausreichender Reinheit vorlag (Abb. 3.1.9) und die von Gelsolin bekannten biologischen Aktivitäten, wie z.B. Förderung der Nukleation und F-Aktin-Fragmentation [Schoepper & Wegner, 1991] zeigte.

Tropomyosin wurde ursprünglich als einer der Hauptbestandteile der Myofibrillen von gestreifter Muskulatur isoliert [Bailey, 1946]. Inzwischen ist jedoch klar, dass es eine ganze Reihe von Tropomyosin-Isoformen gibt, die als Untergruppe der Aktin-bindenden Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktinfilamente in Muskel- und Nichtmuskelzellen spielen. Historisch betrachtet wurde zwar zunächst angenommen, dass Tropomyosin ein reines Muskelprotein sei, mit der Entdeckung des Aktin-Cytoskeletts und seiner Bestandteile in Nichtmuskelzellen wurde jedoch klar, dass dies nicht zutrifft [Gunning et al., 2005]. Bei einem Vergleich der kontraktilen Systeme von Skelett- und Glattmuskeln mit dem Aktinfilament-System, welches ein wichtiger Bestandteil des Cytoskeletts aller Zellen ist, fällt auf, dass dieses System einen hohen Grad an Komplexität und Diversität sowohl hinsichtlich der Zusammensetzung als auch der Funktion hat. In kontraktilen Systemen der Muskulatur findet man 4 Aktin-Isoformen und 5 Tropomyosin-Isoformen, während beim Aufbau des Cytoskeletts 2 verschiedene Aktin-Isoformen und mehr als 40 Tropomyosin-Isoformen vorkommen [Gunning et al., 2005; Herman, 1993; Pittenger et al., 1994; Rubenstein, 1990]. Für eine native Aufreinigung von Tropomyosin bietet es sich an, Muskelgewebe zu

verwenden, es sei denn, man möchte irgendeine spezielle andere Isoform aufreinigen. In diesen Geweben ist Tropomyosin in relativ großer Menge vorhanden. Im Skelettmuskel macht Tropomyosin etwa 3 % des Gesamt-Muskelproteins aus [Pittenger et al., 1994]. Auch in der Glattmuskulatur, wie sie z.B. im Magen-Darm-Trakt oder Arterien vorkommt, findet man große Mengen Tropomyosin. In diesem Gewebe findet man hauptsächlich $\alpha\beta$ -Heterodimere, die sich in ihrer Isoform-Zusammensetzung aber von den entsprechenden Dimeren der Skelettmuskeln unterscheiden [Cummins & Perry, 1974; Cummins & Perry 1973]. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Präparation (nach [Sanders & Smillie, 1985]) wurde ein Protein von ca. 66 kDa Größe erhalten, welches nach der letzten Chromatographie in ausreichender Reinheit vorlag (Abb. 3.1.11). Da es sich bei dem Tropomyosin aus dem Glattmuskel um ein $\alpha\beta$ -Heterodimer handelt, zeigt es im Gel eine Doppelbande bei ca. 33 und 35 kDa.

4.2 Klonierung von Gelsolin, Tropomyosin und ihrer Deletionsmutanten

Sowohl cytoplasmatisches wie auch Plasma-Gelsolin werden von einem Gen codiert [Kwiatkowski et al., 1986], wobei sich die beiden Isoformen nur durch eine N-terminale Plasma-Extension unterscheiden [Way & Weeds, 1988]. Diese kann je nach Spezies unterschiedlich lang sein. Beim Schwein beträgt die Länge 9 Aminosäuren. Bei der Klonierung der cytosolischen Variante des Schweinegelsolins wurde auf die bekannte cDNA-Sequenz von Schweine-Plasma-Gelsolin zurückgegriffen [Way & Weeds, 1988]. Durch entsprechende Auswahl von Primern wurde durch PCR die cytosolische Variante generiert, die eine Länge von 731 AS aufweist.

Bei der Klonierung von Gelsolin-Deletionsmutanten wurde zunächst einmal darauf geachtet, Konstrukte zu erstellen, die aus verschiedenen Kombinationen von kompletten Domänen bestehen. Es war bereits bekannt, dass sich Konstrukte erstellen lassen, die der N- oder C-terminalen Hälfte (Domäne 1-3 / Domäne 4-6) oder auch einzelnen Domänen entsprechen, die rekombinant in *E. coli* exprimiert werden können und dabei korrekt gefaltet werden [Way & Weeds, 1990; Maciver et al., 2000]. Die klonierten Gelsolin-Varianten sollten so gestaltet sein, dass beobachtete Effekte bei späteren Messungen einer oder mehrerer Domänen zugeordnet werden können. Aufgrund dieser Überlegungen wurden die Gelsolinvarianten pgs2-6, pgs1-3, pgs4-6, pgs1+3, pgs1-2, pgsD1 und pgsD2 durch PCR erstellt. Nur die beiden

Konstrukte pgs1-2Df1 und pgs1-2Df2 weisen lediglich Teile der zweiten Domäne auf, um z.B. beobachtetes Bindeverhalten speziellen Teilen dieser Domäne zuordnen zu können.

Da Tropomyosin in Glattmuskulatur in der Regel als $\alpha\beta$ -Heterodimer vorkommt, ist es schwierig, bei Messungen mit diesem Protein abzuschätzen, welchen Anteil an der gemessenen Aktivität jeweils die α - und welchen die β -Isoform hat. Aus diesem Grund bietet es sich an, zusätzlich zu den Messungen mit den Wildtypproteinen, Messungen mit einzelnen Isoformen durchzuführen, wie dies im Rahmen dieser Arbeit auch durchgeführt wurde. Zwar ist es möglich die einzelnen Isoformen des nativ präparierten $\alpha\beta$ -Heterodimers von einander zu trennen [Smillie, 1982], jedoch stellt die rekombinante Expression von einzelnen Isoformen eine gute Möglichkeit dar, die Proteine sortenrein herzustellen. Bei bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten mit den nativ präparierten und getrennten Isoformen α und β [Fitz, 2008] wurde festgestellt, dass die α -Isoform, wenn sie präpariert als $\alpha\alpha$ -Heterodimer vorliegt, über eine deutlich stärkere biologische Aktivität verfügt, als die β -Isoform. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit Tropomyosin α kloniert und im weiteren Verlauf rekombinant exprimiert. Bei der Klonierung des Tropomyosin α wurde auf eine bekannte cDNA-Sequenz zurückgegriffen [Whitby et al., 1992; Whitby & Phillips, 2000]. Durch entsprechende Auswahl von Primern wurde das Protein durch PCR generiert, welches eine Länge von 284 AS aufweist.

Da Tropomyosin, im Gegensatz zu Gelsolin, keine Struktur besitzt, die aus definierten Subdomänen aufgebaut ist, wurde bei der Erstellung der Tropomyosin-Deletionsmutanten anders vorgegangen. Das Molekül besteht praktisch aus einer einzelnen α -Helix. Bekannte Bindestellen für Aktin sind gleichmäßig über die gesamte Länge verteilt. Daher sollte praktisch jede beliebige Deletionsmutante in der Lage sein, eine biologische Aktivität, zumindest hinsichtlich der Aktinbindung, zu zeigen. Wichtigste Kriterien bei der Erstellung von Tropomyosin α -Deletionsmutanten waren daher die Stabilität und die korrekte Faltung der Proteine. Es wurden zunächst durch PCR Deletionsmutanten erstellt, die ungefähr der N- und der C-terminalen Hälfte des Tropomyosins entsprachen (TM α F1 und TM α F2). Als sich herausstellte, dass einige der zu untersuchenden biologischen Aktivitäten, speziell die zu untersuchende Tropomyosin-Gelsolin-Interaktion, vermutlich in der N-terminalen Hälfte lokalisiert waren, wurden von TM α F1 noch weiter verkürzte Varianten hergestellt (TM α F1/101 und TM α F1/150).

4.3 Rekombinante Expression und Aufreinigung von Gelsolin, Tropomyosin und verschiedenen Deletionsmutanten

Nachdem die verschiedenen Gelsolin- und Tropomyosin-Varianten, wie unter 4.2. beschrieben, als PCR-Produkt vorlagen, stellte sich die Frage nach der Verwendung eines geeigneten Expressionssystems für die rekombinanten Proteine. Abgesehen davon, dass die Deletionsmutanten natürlich nur durch Verwendung molekularbiologischer Techniken erhalten werden können, sollte das Expressionssystem aber auch hinsichtlich der zu erzielenden Ausbeute und der Einfachheit der Präparationsmethode eine gute Alternative zu der bereits durchgeführten nativen Aufreinigung aus Geweben sein. Zunächst wurden sowohl verschiedene Expressionsvektoren, darunter einige Vertreter der pQE-Familie (z.B. pQE60) und einige Varianten von pET-Vektoren (z.B. pET21a(+)), als auch verschiedene *E. coli*-Expressionsstämme getestet. Erste verwendbare Proteinausbeuten wurden mit einem *E. coli*-Expressionsstamm vom Typ BL21(DE3) erreicht, der in Kombination mit Plasmiden aus der Gruppe der pET-Vektoren bereits erfolgreich bei der Expression von rekombinantem Humangelsolin als auch rekombinantem Invertebraten-Tropomyosin eingesetzt wurde [Way et al., 1992; Nag et al., 2009; Jeong et al., 2004]. In Kombination mit diesem Stamm wurden verschiedene pET-Vektoren getestet, wobei sich pET21a(+) schließlich als erfolgreichste Variante erwies. Deshalb wurde anschließend bei den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionen der Vektor pET21a(+) verwendet. Durch die Verwendung dieses Plasmids bietet sich zwar die Möglichkeit, die hergestellten Proteine mit einem Affinitäts-Anhang (*tag*) zu versehen, jedoch ist der Einfluss, den diese *tags* auf die Faltung und damit auch auf die biologische Aktivität der Proteine ausüben, schwer einzuschätzen. Deshalb wurde bei der Klonierung der PCR-Produkte darauf geachtet, dass vor der Sequenz, welche den *tag* codiert, ein Stopcodon liegt, so dass alle Proteine ohne eine Zusatzsequenz hergestellt wurden.

Ein Problem, das häufig bei der Produktion von eukaryotischen Proteinen in *E. coli* auftritt ist, dass die zu exprimierenden Gene Codons verwenden, die für tRNAs codieren, welche in *E. coli* nur in geringen Mengen vorkommen, in den Ursprungsorganismen jedoch in größerer Menge vorhanden sind. Bei der Expression kann es nun dazu kommen, dass die gesamte Menge an diesen seltenen tRNAs zu schnell aufgebraucht wird und es dann zu Kettenabbrüchen bei der Translation kommt. Nach der Analyse der Codon-Verwendung bei der cDNA von Schweinegelsolin wurde festgestellt, dass in dieser Sequenz eine recht große Anzahl von in *E. coli* selten verwendeten Codons vorkommt. Aus diesem Grund wurde ein

anderer Expressionsstamm getestet, der zusätzliche Kopien von Genen enthielt, welche für die seltenen tRNAs codieren. Zwar konnte das Schweinegelsolin auch in dem Stamm BL21(DE) in Mengen bis zu 25 mg/l hergestellt werden, doch brachte eine Umklonierung in den weiter optimierten Stamm BL21(DE3)-CodonPlus-RIPL eine deutliche Steigerung der Expressionsrate. Diese lag dann bei ca. 80 mg/l und damit in vergleichbaren Größenordnungen, wie bei anderen Expressionen von rekombinanten Gelsolinvarianten bislang erzielt wurden [Way et al., 1990]. Bei den nachfolgenden Expressionen der Gelsolinmutanten, sowie Tropomyosin α und Tropomyosin-Deletionsmutanten, wurde auf die anhand der Expression des wt-Gelsolins gewonnenen Erfahrungen zurückgegriffen und die Proteine mit gutem Erfolg in dem selben Expressionssystem hergestellt.

Bei der Expression von heterologen Proteinen in *E. coli* besteht immer die Möglichkeit, dass die exprimierten Proteine in Einschlusskörpern abgelagert werden [Prouty & Goldberg, 1972; Marston, 1986; Rudolph & Lilie, 1996; Clark, 1998; Misawa & Kumagai, 1999, Tsumoto et al., 2003]. Dies war jedoch in dieser Arbeit nur bei der Gelsolin-Deletionsmutante pgs1+3 der Fall. Eine bekannte Ursache für die Bildung von Einschlusskörpern ist eine Selbstaggregation von nur teilweise gefalteten Peptidketten [Speed, et al., 1996], wobei vor allem eine hohe Konzentration des Proteins im Cytoplasma die wichtigste Ursache zu sein scheint [Gribskov & Burgess, 1983]. Wird ein exprimiertes Protein in Einschlusskörpern abgelagert, hat dies für die Präparation sowohl Vorteile als auch Nachteile. Vorteile sind z.B. dass die Proteine weitgehend vor proteolytischer Degradation geschützt sind [Li & Higgs, 2003], ein Nachteil ist jedoch, dass die Proteine in der Regel in einem denaturierten Zustand vorliegen. Es wurde zunächst versucht, die Bildung von Einschlusskörpern bei der Mutante pgs1+3 zu verhindern. Zu diesem Zweck sind bislang verschiedene Methoden entwickelt worden, die in der Literatur beschrieben sind, wie z.B. die Zugabe von bestimmten Additiven oder eine Herabsetzung der Expressionsrate [Schäffner et al., 2001; Blackwell & Horgan, 1991; Baneyx, 1999]. Letztere Methode wurde hier angewandt, führte jedoch nicht zu dem gewünschten Erfolg. Aus diesem Grund wurde versucht die aggregierten Proteine in Lösung zu bringen und zu renaturieren. Dies lies sich durch Aufnehmen in 8 M Harnstofflösung und anschließendes stufenweises Herausdialysieren dieser Substanz bewerkstelligen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine im Vergleich zu den nativen Präparationen einige Vorteile aufweist. So lassen sich alle

erforderlichen Arbeitsschritte, sofern die Methode erst einmal etabliert ist, in ca. 2 - 3 Arbeitstagen durchführen.

4.4 Charakterisierung der Aktin-modulierenden Aktivitäten der aufgereinigten Proteine

4.4.1 Gelsolin und Gelsolin-Deletionsmutanten

Gelsolin ist ein Calcium-abhängiges Aktin fragmentierendes und cappinges Protein, welches in den Geweben von Vertebraten weit verbreitet ist [Yin et al., 1981; Kwiatkowski et al., 1988]. Es kann außerdem mit zwei Aktin-Monomeren interagieren und so die Nukleation fördern, die zur Bildung eines gecappten Aktin-Filaments führt [Bryan & Kurth, 1984; Weeds et al., 1986]. Es sind 3 Aktin-Bindestellen bekannt, die sich ungleichmäßig über die 6 Domänen des Moleküls verteilen [Way & Weeds, 1988; Bryan, 1988; Yin et al., 1988]. Es gibt G-Aktin-Bindestellen in Domäne 1 und 4, sowie eine F-Aktin-Bindestelle in Domäne 2 [Sun et al., 1999]. Domäne 1 bindet ein Aktin-Monomer mit hoher Affinität, während sich Domäne 2 stöchiometrisch an F-Aktin anlagert. Diese beiden Aktivitäten des Gelsolins sind Calcium-unabhängig [Way et al., 1990]. Im Gegensatz dazu bindet die C-terminale Hälfte (Domäne 4-6) ein einzelnes Aktin-Monomer, aber nur in Gegenwart von Calcium. Studien mit Fragmenten aus proteolytischen Spaltungen haben gezeigt, dass für die Fragmentationsaktivität des Gelsolins sowohl die G-Aktin- als auch die F-Aktin-Bindestelle in der N-terminalen Hälfte des Proteins vorhanden sein müssen, die in den Domänen 1 bzw. 2 liegen [Bryan, 1988; Yin et al., 1988]. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Gelsolin-Varianten zeigten in der Regel die Aktivitäten, die man aufgrund der zu ihnen gehörenden Teile des Gelsolin-Moleküls erwarten konnte.

Die jeweils durchgeführte Überprüfung auf Nukleationsaktivität ergab, dass nur die präparierten Wildtypformen und diese nur in Gegenwart von Calciumionen in der Lage waren, die Nukleation zu fördern. Für die Deletionsmutanten pgs1-3 und pgs4-6 war bereits aus anderen Studien bekannt, dass sie keine Nukleationsaktivität zeigen [Way & Weeds, 1989]. Deshalb ist es auch verständlich, dass diese Proteine sowie die Deletionsmutanten pgs1-2, pgs1-2Df1, pgs1-2Df2, pgsD1 und pgsD2 die Nukleation nicht fördern, da diese Varianten über höchstens eine G-Aktin-Bindestelle verfügen [Sun et al., 1999].

Bezüglich der Fragmentation von F-Aktin ist bekannt, dass die N-terminale Hälfte von Gelsolin in der Lage ist, eine Ca-unabhängige Fragmentationsaktivität zu zeigen [Way et al., 1989]. Die Domäne 1 allein ist dafür jedoch nicht ausreichend. Es müssen also Teile von Domäne 2 und 3 für die Ausbildung der Fragmentationsaktivität notwendig sein. Es wurde gefunden, dass für die Fragmentationsaktivität ein 11 Aminosäuren langer Abschnitt im N-terminalen Bereich von Domäne 2 (AS 150-160) verantwortlich ist [Kwiatkowski et al., 1989]. Bei der Überprüfung der Gelsolinvarianten auf Fragmentationsaktivität zeigte sich, dass die Wildtypproteine, sowie die Deletionsmutanten pgs1-3, pgs1-2 und pgs1-2Df1 vollständig aktiv waren. Die Ergebnisse der Fragmentationstests entsprechen somit aus der Literatur bekannten Daten [Way & Weeds, 1989].

Keine Fragmentation ließ sich bei der Mutante pgs4-6 beobachten. Dieser Unterschied ist verständlich, wenn man bedenkt, dass die beiden Hälften des Gelsolin-Moleküls sich in ihren Eigenschaften deutlich unterscheiden [Chaponnier et al., 1986; Bryan, 1988]. Unter physiologischen Bedingungen zeigt die N-terminale Hälfte eine Calcium-unabhängige Fragmentationsaktivität, während die C-terminale Hälfte in der Lage ist, Ca-abhängig ein G-Aktin zu binden, jedoch kein F-Aktin zu schneiden [Way et al., 1992]. Des Weiteren zeigen auch die Gelsolin-Varianten pgs1+3, pgs1-2Df2, pgsD1 und pgsD2 keine Fragmentationsaktivität. Da aus der Literatur bekannt ist, dass für diese Aktivität ein Zusammenwirken der beiden Domänen D1 und D2 nötig ist, ist verständlich, warum die Varianten, die nicht über die beiden Domänen verfügen, keine Aktivität zeigen.

Aufgrund der beobachteten Fragmentations- und z.T. auch Nukleationsaktivitäten ließ sich für die Gelsolinvarianten wt-pgs (nativ und rekombinant), pgs1-3, pgs1-2 und pgs1-2Df1 schließen, dass sie in einem korrekt gefalteten Zustand vorlagen. Für die Varianten wt-pgs, pgs1-3 und pgs1-2 ließen sich diese Annahmen durch CD-Messungen bestätigen. Bei den anderen rekombinant exprimierten Proteinen war die Konformation zunächst unklar, da bei diesen Proteinen auch in einem korrekt gefalteten Zustand eine biologische Aktivität nicht unbedingt zu erwarten war. Aufgrund der durchgeführten Bindungsstudien mit SPR-Spektroskopie ließ sich zeigen, dass die Deletionsmutanten pgs1-2Df2 und pgsD1, in der Lage sind, eine starke Bindung zu G-Aktin einzugehen. Außerdem ließ sich für pgsDf2 und pgsD2 eine Bindung an TMA α zeigen. Deshalb kann man auch bei diesen Proteinen davon ausgehen, dass sie korrekt gefaltet sind.

Alle Funktionen von wt-pgs wie Fragmentation, Nukleation und Capping sind Ca-abhängig [Bryan & Coluccio, 1985; Bryan & Kurth, 1984; Janmey et al., 1985]. Gelsolin ist dabei in der Lage, pro Mol Protein 2 Mol Ca^{2+} zu binden [Bryan & Coluccio, 1985; Bryan & Kurth, 1984; Yin et al., 1980]. Die Affinitätskonstante K_a dieser Bindung beträgt ca. 10^6 M. Gelsolin ist in der Lage, bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-6} M 2 G-Aktin-Monomere zu binden. Unterhalb dieser Konzentration ist keine Aktivität des Gelsolins, sowohl Fragmentation als auch Nukleation, zu beobachten. Durch die Bindung von Calcium an Gelsolin wird eine Konformationsänderung induziert [Kilhoffer et al., 1985; Patkowski et al., 1990]. Besonders ausgeprägte Veränderungen sind in der C-terminalen Hälfte des Moleküls zu beobachten [Kwiatkowski, et al., 1985; Hellweg et al., 1993]. Dass die Calcium-Steuerung der verschiedenen Aktivitäten durch den C-Terminus vermittelt wird, konnte u.a. dadurch gezeigt werden, dass eine Deletion von 15 Aminosäuren am C-Terminus zu einem völligen Verlust der Calcium-Regulation von Nukleation und Fragmentation führt [Kwiatkowski et al., 1989]. Weitere Studien, die zeigen sollten, wie die Calcium-Regulation auf molekularer Ebene zu Stande kommt, führten zur Formulierung der Pseudosubstrat-Theorie. Diese besagt, dass in Abwesenheit von Calcium das Segment D1 mit der C-terminalen Hälfte D4-6 interagiert, wobei D4-6 an die G-Aktin-Bindestelle von D1 bindet und diese so blockiert. Bei Zugabe von Calcium wird die Bindestelle freigegeben und kann dann zur Ausübung der biologischen Aktivitäten beitragen [Vandekerckhove & Weber, 1979].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Calcium-Abhängigkeit der Gelsolinaktivitäten überprüft. Insbesondere für die wt-Proteine sollte zunächst gezeigt werden, dass diese sich entsprechend der in der Literatur bereits veröffentlichten Daten verhielten. Dies sollte dann helfen die anderen Aktivitäten, die die Wildtypproteine im Vergleich zu den Aktivitäten der Deletionsmutanten zeigen, besser einschätzen zu können. Die durchgeführten Messungen zeigten sowohl für das native wie auch das rekombinant exprimierte wt-Gelsolin, dass diese Proteine bei Ca-Konzentrationen von über 10^{-6} M (bei den meisten Experimenten waren es $2 \cdot 10^{-4}$ M) eine Nukleations- und Fragmentationsaktivität besitzen, die mit denen von anderen Gelsolinen vergleichbar war. Andererseits zeigte sich auch, dass bei sehr niedrigen Calciumkonzentrationen, wie sie durch die Zugabe von 1 mM EGTA erreicht wurden, keine Aktivitäten mehr bei den Wildtypproteinen zu beobachten waren. Da nach der oben dargestellten Theorie in erster Linie die Segmente D4-6 für die Calcium-Regulation verantwortlich sind, ist es auch nicht verwunderlich, dass Deletionsmutanten wie pgs1-3,

pgs1-2 und noch weitere Verkürzungen keine Calciumregulation ihrer Aktivitäten zeigten und sowohl bei hohen, als auch bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen aktiv waren.

Als weiteres Vergleichsmerkmal der verschiedenen Gelsolinmutanten wurde die Mengenabhängigkeit der Aktivitäten getestet. Hierbei konnte zum einen durch Betrachtung der Nukleation gezeigt werden, dass das native und das rekombinante Gelsolin sich identisch verhalten. Zum anderen ergab insbesondere der Vergleich der Fragmentationsaktivitäten bei verschiedenen Mengen, dass sich die getesteten Deletionsmutanten untereinander und im Vergleich zum Wildtypprotein sehr ähnlich verhalten, wenn gleiche molare Mengen im Verhältnis zum Aktin verwendet werden. Die Abschätzung, ob eine bestimmte Deletionsmutante wirklich die größtmögliche für sie zu erwartende Aktivität zeigt, war in sofern wichtig, als dass diese Werte als Referenz für die Untersuchung der Hemmwirkung von Tropomyosin auf die Gelsolinaktivität dienen sollten. Wären die verschiedenen Deletionsmutanten nur eingeschränkt aktiv, wäre eine Einordnung des Hemmeffekts bei Zugabe einer Tropomyosin-Variante nur schwer einzuordnen.

4.4.2 Tropomyosin und TMs-Deletionsmutanten

Unter physiologischen Bedingungen bindet Tropomyosin entlang der Aktinfilamente und schützt diese sowohl vor dem Abbau durch verschiedene Proteine, als auch vor Depolymerisation am *pointed end* [Bernstein & Bamburg, 1982; Burgess et al., 1987; Broschat, 1990; Cooper, 2002; DesMarais et al., 2002]. Aktinfilamente, denen angelagertes Tropomyosin fehlt, unterliegen einem verstärkten *treadmilling*. Dies beobachtet man z.B. bei einigen Typen von invasiven Karzinomzellen [DesMarais, 2002]. Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die Zerstörung der Stressfasern, die bei einigen Zelltypen bei der Zelltransformation während der Tumorgenese auftritt, durch Transfektion dieser Zellen mit einigen TM-Isoformen rückgängig gemacht werden konnte [Boyd et al., 1995; Prasad et al., 1993; Takenaga et al., 1994; Shah et al., 2001]. Die genaue Wirkung, die Tropomyosin auf andere Proteine wie z.B. Motorproteine oder Aktin-fragmentierende Proteine ausübt, ist von der jeweiligen Tropomyosin-Isoform abhängig. So gibt es Isoformen, die durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen die Filamentstabilität erhöhen, in dem sie Schneideaktivitäten unterdrücken und die Interaktion mit Motorproteinen fördern, andere Isoformen tun das Gegenteil. Aufgrund der Tatsache, dass Tropomyosine an allen

Aktinfilamenten entlang verlaufen, können sie eine zentrale Rolle bei der Regulation der Aktinfilament-Dynamik und der mechanischen Eigenschaften von Aktinfilamenten einnehmen, so dass diese in verschiedenen Geweben, aber auch bei verschiedener intrazellulärer Lokalisation unterschiedliche Aufgaben erfüllen können [Gunning et al., 2005]. Die im Rahmen dieser Arbeit präparierten Tropomyosin-Isoformen wurden zunächst daraufhin überprüft, ob sie in der Lage sind an F-Aktin zu binden, da dies die wichtigste biologische Aktivität von Tropomyosin ist. Darüber hinaus ergibt sich daraus ein Hinweis, ob die Regionen des Moleküls, die über eine Aktinbindestelle verfügen, korrekt gefaltet sind. Wie sich aus Kosedimentationstudien ergab, waren alle präparierten Tropomyosine dazu in der Lage, so dass man, nachdem auch noch ergänzende CD-Messungen ausgewertet wurden, davon ausgehen konnte, dass alle Proteine in der richtigen Konformation vorlagen. Dies war eine wichtige Voraussetzung dafür, dass die Proteine bei den folgenden Versuchen, die eine Hemmwirkung von Tropomyosin-Varianten auf Gelsolinaktivitäten, sowie die Lokalisation einer Tropomyosin-Gelsolin-Bindestelle zum Ziel hatten, ihre Funktionen ausüben konnten. Nur so ließ sich ausschließen, dass eine nicht vorhandene Hemmwirkung oder Bindung an Gelsolin durch ein falsch gefaltetes Protein zustande kommt.

4.5 Untersuchungen zur Gelsolin-Tropomyosin-Interaktion

Gelsolin ist in Glattmuskeln in relativ hohen Konzentrationen vorhanden, die eher denen in Nichtmuskel-Zellen als in Skelettmuskelzellen entsprechen [Hinssen et al., 1984]. Auch Tropomyosin ist ein Hauptbestandteil der dünnen Filamente von Glatt- und Nichtmuskelzellen und lagert sich lateral entlang der gesamten Länge des Aktinfilaments an dieses an [Chacko et al., 1987; Marston, 1990]. Wenn man die Einzelaktivitäten der beiden Proteine in Bezug auf Aktin betrachtet, stellt sich die Frage, ob und wie sich Gelsolin und Tropomyosin gegenseitig in ihren Aktivitäten beeinflussen. Es ist bekannt, dass Tropomyosin die Fragmentationsaktivität von Gelsolin moduliert, wobei beobachtet werden konnte, dass Tropomyosine mit hohem Molekulargewicht die Filamente schützen, während Tropomyosine mit geringem Molekulargewicht dies nicht tun [Ishikawa et al., 1989]. Wie es zu diesen Unterschieden kommt und durch welchen Mechanismus die Schutzwirkung zustande kommt war jedoch noch unklar. Studien haben jedoch ergeben, dass Tropomyosin an die Domäne 2 von Gelsolin bindet, wobei die Bedingungen, unter denen Tropomyosin an Gelsolin bindet, Ähnlichkeiten aufwies zu den Bedingungen, unter denen Gelsolin an Aktin bindet [Maciver

et al., 2000]. Die Tatsache, dass Gelsolin an Tropomyosin bindet und zwar wahrscheinlich auf eine Art und Weise, die die Bindung von Gelsolin an F-Aktin unterbindet, führt zu der Annahme, dass dies ein Mechanismus ist, durch den die Zelle den Umbau des Mikrofilamentsystems reguliert. Es konnte beobachtet werden, dass Mikrofilamente in manchen Zelltypen nur sehr eingeschränkt durch Gelsolin beeinflusst werden [Sanger et al., 1987; Huckriede et al., 1988; Gonsior & Hinssen, 1995].

4.5.1 Ermittlung der Bindestellen der Tropomyosin/Gelsolin-Interaktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die direkte Wechselwirkung zwischen Gelsolin und Tropomyosin aus Glattmuskel untersucht. Mit Hilfe der chemischen Quervernetzung konnte ein direkter Nachweis für die Interaktion von wt-Gelsolin und GM-Tropomyosin erbracht werden. Ergänzende Untersuchungen mit Tropomyosin aus Skelettmuskel ergaben, dass auch dieses Tropomyosin an Gelsolin bindet, jedoch etwas schwächer. Dies könnte daran liegen, dass die Proteine aus verschiedenen Geweben stammen. Durch chemische Quervernetzung ließ sich jedoch keine Interaktion zwischen den Deletionsmutanten von Gelsolin und Tropomyosin zeigen. Zwar hatten bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien ergeben, dass sich auch die N-terminale Hälfte des Gelsolins, in Form des proteolytischen Spaltprodukts TL40, mit Tropomyosin quervernetzen lässt [Fitz, 2008], doch ließen sich diese Resultate nicht mit der rekombinanten Deletionsmutante pgs1-3 verifizieren. Da diese beiden Gelsolinfragmente zwar sehr ähnlich, aber nicht identisch sind, könnten geringe Strukturunterschiede, die zu unterschiedlichen sterischen Verhältnissen führen, hierfür verantwortlich sein, da für den Erfolg dieser Methode die räumliche Nähe zwischen verschiedenen Peptidstrukturen ausschlaggebend ist.

Mit der Methode der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie ließen sich jedoch Bindungen von verschiedenen Gelsolin-Deletionsmutanten an $TM\alpha$, sowie Bindungen von Tropomyosin-Deletionsmutanten an Gelsolin zeigen. Durch Auswertung dieser Messungen ließen sich sowohl auf dem Gelsolin, als auch dem Tropomyosin Sequenzbereiche einengen, die für die Bindung der beiden Proteine aneinander notwendig sind. Für Gelsolin ließ sich zum einen bestätigen, dass die Bindestelle für Tropomyosin wie erwartet [Maciver et al., 2000] in Domäne 2 liegt. Es ließ sich weiterhin zeigen, dass das vordere Drittel der Domäne 2, welches bei der Deletionsmutante pgs1-2Df2 noch vorhanden ist, nicht aber bei der weiter verkürzten Deletionsmutante pgsD1, für die Interaktion verantwortlich ist. Dies entspricht

dem Sequenzbereich der Aminosäuren 114 – 148 des cytosolischen Gelsolins. Für denselben Sequenzbereich war bereits bekannt, dass dort eine PIP₂-Bindestelle liegt [Sun et al., 1999]. An dieser Tatsache ist interessant, dass PIP₂ ebenfalls die Eigenschaft hat, die Filamentbindung durch Gelsolin und dadurch auch die Fragmentation zu verhindern, was daran liegt, dass sich die Bindestellen für F-Aktin und PIP₂ räumlich überschneiden [Janmey et al., 1992; Sun et al. 1994]. Somit ist auch ein möglicher Mechanismus denkbar, durch den das Tropomyosin die Fragmentationsaktivität von Gelsolin hemmt.

Dass die Tropomyosinbindestelle dabei räumlich eher mit der PIP₂-Bindestelle als mit der F-Aktin-Bindestelle übereinstimmt ergibt sich aus weiteren Messungen, die zeigen, dass die Deletionsmutante pgs1-2Df2 zwar eine Bindung an Tropomyosin und G-Aktin zeigt (letzteres ist auch ein Hinweis auf die korrekte Faltung der Domäne 1 innerhalb dieser Mutante), aber über keine messbare Fragmentationsaktivität mehr verfügt. Daraus kann man schließen, dass die F-Aktin-Bindestelle in dieser Mutante nicht mehr vorhanden ist. Dass die Bindestelle nicht weiter in Richtung N-Terminus lokalisiert ist, kann man daran erkennen, dass die Domäne 1 allein nicht in der Lage ist an Tropomyosin zu binden. Dafür ist diese Domäne aber in der Lage, sehr stark an G-Aktin zu binden, was darauf hindeutet, dass diese Einzeldomäne in korrekter Konformation vorliegt. SPR-Messungen ergaben, dass die Bindung an G-Aktin sehr stark ist, was durch einen gemessenen K_D-Wert von ca. 5 · 10⁻¹⁰ M zum Ausdruck kommt. Dieser ist dabei nur etwas schwächer als bereits vorher für die Bindung von Domäne 1 an G-Aktin ermittelte Werte von ca. 5 · 10⁻¹² M [Pope et al., 1995].

Für Tropomyosin ließ sich zeigen, dass die Tropomyosin-Varianten TM α und TM α F1 in SPR-Studien an Gelsolin binden, nicht jedoch die N-terminal weiter verkürzten Mutanten TM α F1/101 und TM α F1/150. Aus diesen Messungen kann nun geschlossen werden, dass die Bindestelle für Gelsolin innerhalb der Sequenz der N-terminalen 34 Aminosäuren liegt. Dabei fällt auf, dass die Aminosäuren 1-34 durch das 1a-Exon des α -TM-Gens codiert werden, welches die Aminosäuren 1-38 umfasst [Ruiz-Opazo et al., 1987; Gunning et al., 2005; Lees-Miller et al., 1991]. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, warum manche TM-Isoformen F-Aktin vor Gelsolin schützen können und andere wiederum nicht. Möglicherweise besitzen die verschiedenen Isoformen durch differenzielles Spleißen unterschiedliche Sequenzen in diesem Bereich des Moleküls. Zusammenfassend ergibt sich für die Bindung von Tropomyosin an Gelsolin folgendes, durch die Abb. 4.5.1 dargestelltes Bild.

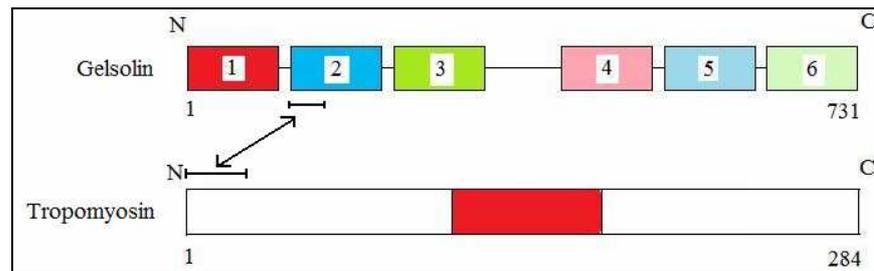


Abb. 4.5.1 Lage der Bindestellen. Die Grafik zeigt die Regionen, mit denen das Gelsolin an Tropomyosin und das Tropomyosin an Gelsolin bindet.

4.5.2 Einfluss der Gelsolin-Tropomyosin-Interaktion auf die Aktinfragmentation

Nachdem nun die Bindung von Tropomyosin und Gelsolin bestätigt wurde und sich für diese Interaktion auch Bindestellen charakterisiert ließen, wurde nun der Frage nachgegangen, wie sich die Ergebnisse der Bindungsstudien mit einer eventuell zu beobachtenden Beeinflussung der Gelsolinaktivität in Einklang bringen lassen. Die Untersuchung der Gelsolinaktivität in Gegenwart von Tropomyosin erfolgte anhand von Viskosimetriemessungen und lieferte die unter 3.6 beschriebenen Ergebnisse. Die Messungen wurden zunächst mit Mischungen von GM-TM und wt-pgs durchgeführt, wobei aber auch vergleichende Messungen mit Tropomyosin aus der Skelettmuskulatur durchgeführt wurden, bei denen der Unterschied bei der Hemmwirkung nicht so ausgeprägt war. Bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführte Messungen mit nativ aufgereinigten α - und β -Homodimeren hatten ergeben, dass der Unterschied der Hemmwirkung, der bei unterschiedlicher Vorinkubation zu sehen ist vor allem durch die α -Isoform vermittelt wird [Fitz, 2008]. Deswegen wurden weitere vergleichende Messungen mit verschiedenen Deletionsmutanten von TM α durchgeführt. Dabei ergab sich, dass alle Tropomyosinvarianten, die in den SPR-Messungen in der Lage waren an Gelsolin zu binden auch eine Hemmwirkung auf die Fragmentationsaktivität des Gelsolins ausüben können. Außerdem ließ sich das unterschiedliche Hemmverhalten beobachten, bei dem gezeigt werden konnte, dass vorgeformte Gelsolin-Tropomyosin-Komplexe F-Aktin deutlich schwächer fragmentieren als Gelsolin, welches zu vorgeformten Aktin-Tropomyosin-Filamenten gegeben wird. Die dabei beobachteten Hemmwirkungen waren etwas stärker als diejenigen, die bei früheren Messungen zur Hemmwirkung von Tropomyosin auf die Gelsolinaktivität ermittelt wurden [Dabrowska et al., 1996]. Allerdings wurde in diesen Studien mit Hühner-GM-Tropomyosin und Schweinegelsolin gearbeitet, während in dieser Arbeit sowohl Schweine-Gelsolin als auch Schweine-Tropomyosin

verwendet wurden, so dass diese Messungen eher den unter physiologischen Bedingungen anzutreffenden Bedingungen entsprechen.

Der Schutz der Aktinfilamente vor Fragmentation durch Gelsolin, der durch Tropomyosin vermittelt wird, könnte am einfachsten dadurch erklärt werden, dass man annimmt, dass Gelsolin und Tropomyosin um eine Bindung an das F-Aktin konkurrieren, da sie an die gleiche Stelle am Aktinmolekül binden. Dies wirft aber Fragen hinsichtlich der Beobachtung auf, dass Gelsolin vorgeformte Aktin-TM-Filamente ohne größere Schwierigkeiten schneiden kann. Außerdem sollte eine Erhöhung der Konzentration von jeder TM-Isoform, die an Aktin binden kann, die Gelsolinaktivität beeinträchtigen. Es gibt aber TM-Isoformen bei denen dies nicht der Fall ist [Ishikawa et al., 1989]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass TM mit Aktin um eine Bindung an Gelsolin konkurrieren kann. Da die SPR-Messungen ergeben haben, dass die K_D -Werte für die Bindung von Gelsolin an Aktin und von Gelsolin an Tropomyosin eine ähnliche Größe haben, kann man annehmen, dass Gelsolin eine starke Bindung zu demjenigen Molekül ausbildet, mit dem es zuerst interagiert. Da die K_D -Werte zwar eine ähnliche Größe haben, für die Bindung von Gelsolin an Tropomyosin aber doch etwas schwächer sind, ließe sich hiermit auch erklären, warum die Hemmung der Gelsolinaktivität nie vollständig ist, sondern immer eine gewisse Restaktivität verbleibt.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen einige Möglichkeiten auf, wie durch das Zusammenspiel von Tropomyosin und Gelsolin das Mikrofilamentsystem einer Zelle umorganisiert werden kann. Während schon länger bekannt ist, dass intrazelluläres Calcium und PIP_2 die Gelsolinaktivität steuern, zeigen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, dass Tropomyosin eine weitere Rolle in der Regulation der Fragmentationsaktivität von Gelsolin spielt. Darauf deuten auch andere Studien hin, die z.B. zeigen, dass Tropomyosin und Gelsolin in der Zelle zum großen Teil kolokalisiert sind. Es ist somit möglich, dass Tropomyosin unter Bedingungen, die zu einer Aktivierung von Gelsolin führen (wie z.B. hoher Ca^{2+} -Spiegel) die Gelsolinaktivität zumindest teilweise inhibieren kann. Diese Beobachtungen lassen auch die Möglichkeit zu, dass Gelsolin und Tropomyosin, sowie die Interaktion zwischen ihnen, eine wichtige Rolle bei der Umorganisation des Mikrofilamentsystems spielen, die bei der Transformation von Krebszellen beobachtet wird. Darauf deuten auch neuere Studien hin, die zeigen, dass die Expressionsraten dieser beiden Proteine bei Transformationsvorgängen deutlich verändert werden.

Literaturverzeichnis

- Amann, K. J., T. D. Pollard** (2000). "Cellular regulation of actin network assembly." *Curr Biol* 10(20): 728-30.
- Amann, K. J., T. D. Pollard et al.** (2001). „Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions." *Science* 293(5539): 2456-9.
- Bailey, K.** (1946). "Tropomyosin: a new asymmetric protein component of muscle." *Nature* 157: 368.
- Bartegi, A., A. Fattoum, et al.** (1990). „Cross-linking of smooth muscle caldesmon to the NH₂-terminal region of skeletal F-actin." *J Biol Chem* 265(4): 2231-7.
- Baneyx, F.** (1999). "Rekombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Curr Opin Biotechnol* 10: 411–421.
- Bernstein, B. W., J. R. Bamburg** (1982). „Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF)." *Cell Motil* 2(1): 1-8.
- Blackwell, J. R., R. Horgan** (1991). "A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form." *FEBS Lett* 295(1-3): 10–12.
- Boyd, J., et al.** (1995). "Regulation of the microfilament organization and anchorage-independent growth by Tropomyosin 1." *PNAS* 92: 11534-8.
- Bremel, R. D., A. Wever** (1973). "Does ATP cause relaxation by binding to actin or its regulatory proteins?" *Biochim Biophys Acta* 325(2): 333-5.
- Bremer, A., U. Aebi** (1992). "The structure of the F-actin filament and the actin molecule." *Curr Opin Cell Biol* 4(1): 20-6.
- Broschat, K. O.** (1990). "Tropomyosin prevents depolymerization of actin filaments from the pointed end." *J Biol Chem* 265(34): 21323-9.
- Bryan, J.** (1988). "Gelsolin has three actin-binding sites." *J Cell Biol* 106(5): 1553-62.

- Bryan J., L. M. Coluccio** (1985). "Kinetic analysis of F-actin depolymerization in the presence of platelet gelsolin and gelsolin-actin complexes." *J Cell Biol* 101(4): 1236-44.
- Bryan J., M. C. Kurth** (1984). „Actin-gelsolin interactions. Evidence for two actin-binding sites." *J Biol Chem* 259(12): 7480-7.
- Burgess, D. R., K. O. Broschat, J. M. Hayden** (1987). "Tropomyosin distinguishes between the two actin-binding sites of villin and affects actin-binding properties of other brush border proteins." *J Cell Biol* 104(1): 29-40.
- Burtnick, L. D., E. K. Koepf, et al.** (1997). "The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping and nucleation." *Cell* 90(4): 661-70.
- Burtnick, L. D., R. C. Robinson, et al.** (2001). "Structure and function of gelsolin." *Results Probl Cell Differ* 32: 201-11.
- Carlier, M. F.** (1991). "Actin: protein structure and filament dynamics." *J Biol Chem* 266(1): 1-4.
- Carlier, M. F., D. Pantaloni** (1997). "Control of actin dynamics in cell motility." *J Mol Biol* 269(4): 459-67.
- Chacko, S., H. Miyata, K. Y. Horiuchi** (1987). "Modulation of actomyosin ATPase by thin filament-associated proteins." *Prog Clin Biol Res* 245: 143-58.
- Chaponnier, C., P. A. Janmey, et al.** (1986). "The actin filament-severing domain of plasma gelsolin." *J Cell Biol* 103(4): 1473-81.
- Chaponnier, C., O. Kocher, G. Gabbiani** (1990). „Modulation of gelsolin-content in rat aortic smooth muscle cells during development, experimental thickening and culture." *Eur J Biochem* 190: 559-565.
- Clark, E.** (1998). "Refolding of recombinant proteins." *Curr Opin Biotechnol* 9: 157–163.
- Compton, S. J., C. G. Jones** (1985). "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay." *Annal Biochem* 151(2): 369-74.

- Cooper, J. A.** (2002). "Actin dynamics: tropomyosin provides stability." *Curr Biol* 12(15): 523-5.
- Cummins, P., S. V. Perry** (1973). "The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin." *Biochem J* 133(4): 765-77.
- Cummins, P., S. V. Perry** (1974). "Chemical and immunochemical characteristics of tropomyosins from striated and smooth muscle." *Biochem J* 141(1): 43-9.
- Dabrowska, R., H. Hinssen, et al.** (1996). "Modulation of gelsolin-induced actin-filament severing by caldesmon and tropomyosin and the effect of these proteins on the actin activation of myosin Mg^{2+} -ATPase activity." *Biochem J* 315 (Pt 3): 753-9.
- Dabrowsk, R., J. M. Sherry, et al.** (1978). "Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard." *Biochemistry* 17(2): 253-8.
- De la Cruz, E. M., T. D. Pollard** (1995). "Nucleotide-free actin: stabilization by sucrose and nucleotide binding kinetics." *Biochemistry* 34: 5452–5461.
- DesMarais, V., I. Ichetovkin, J. Condeelis, S. E. Hitchcock-DeGregori** (2002). "Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge." *J Cell Sci* 115(23): 4649-60.
- D'Haese, J., M. Rutschmann, B. Dahlmann, H. Hinssen** (1987). „Activity of a gelsolin-like actin modulator in rat skeletal muscle under protein catabolic conditions." *Biochem J* 248: 397-402.
- Dissmann E, H. Hinssen** (1994). "Immunocytochemical localization of gelsolin in fibroblasts, myogenic cells, and isolated myofibrils." *Eur J Cell Biol* 63(2): 336-44.
- Doolittle, R.F.** (1992). "Stein and Moore Award address. Reconstructing history with amino acid sequences." *Protein Sci* 1(2): 191-200.
- Dos Remedios C. G., J. Barden** (1983). "Actin structure and function in muscle and nonmuscle cells." Academic press Sydney 1-336.

- Dos Remedios, C. G., D. Chabra, et al.** (2003): „Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments.“ *Physiol Rev* 83(2): 433-73.
- Fitz, H.** (2008). „Funktionelle Aspekte der Gelsolin-Tropomyosin-Bindung“. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Frid, M., B. Shekhonin, V. Keteliansky, M. Glukhova** (1992). “Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin.” *Dev Biol* 153: 185–193.
- Gershman, L. C., L. A. Selden, et al.** (1989). “High affinity divalent cation binding to actin. Effect of low affinity salt binding.” *J Biol Chem* 264(16):9271-7.
- Gimona, M., M. Herzog, et al.** (1990). “Smooth muscle specific expression of calponin.“ *FEBS Lett* 274(1-2): 159-62.
- Goa, J.** (1953). “A micro biuret method for protein determination; determination of total protein in cerebrospinal fluid.” *Scand J Clin Lab Invest* 5(3): 218-22.
- Gonsior, S., H. Hinssen** (1995). “Exogenous gelsolin binds to sarcomeric thin filaments without severing.” *Cell Motil Cytoskeleton* 31(3): 196-206.
- Gordon, A. M., E. Homsher, et al.** (2000). “Regulation of contraction in striated muscle.” *Physiol Rev* 80(2): 853-924.
- Gribskov, M., R. Burgess** (1983). “Overexpression and purification of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA-polymerase.” *Gene* 26: 109–118.
- Gunning, P. W., G. Schevzov, A. J. Kee, E. C. Hardeman** (2005). “Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function.” *Trends Cell Biol* 15: 333–341.
- Guo, D.-C., H. Pannu, L. Ades, et al.** (2007). “Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections.” *Nature Genet* 39: 1488-1493.
- Hartwig, J. H., D. J. Kwiatkowski** (1991). “Actin-binding proteins.“ *Curr Opin Cell Biol* 3(1): 87-97.

- Hatano, S., F. Oosawa** (1966). "Extraction of an actin-like protein from the plasmodium of a myxomycete and its interaction with myosin A from rabbit striated muscle." *J Cell Physiol* 68(2): 197-202.
- Heintzelman, M. B., S. A. Frankel, S. Artavanis-Tsakonas, M. Mooseker** (1993). „Cloning of a secretory gelsolin from *Drosophila melanogaster*.“ *J Mol Biol* 230: 709-16.
- Hellweg, T., Hinssen H., et al.** (1993). "The Ca²⁺-induced conformational change of gelsolin is located in the carboxyl-terminal half of the molecule." *Biophys J* 65(2): 799-805.
- Herman, I. M.** (1993). "Actin isoforms." *Curr Opin Cell Biol* 5: 48–55.
- Hertzog, M., Carlier, M.** (2005). "Functional characterization of proteins regulating actin assembly." *Curr Prot Cell Biol* 13: 6
- Hightower, R. C., R. B. Meagher** (1986). "The molecular evolution of actin." *Genetics* 114(1): 315-32.
- Hinssen, H., J. V. Small, et al.** (1984). "A Ca²⁺-dependent actin modulator from vertebrate smooth muscle." *FEBS Lett* 166(1): 90-5.
- Holmes, K. C., W. Kabsch, et al.** (1991). „Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11):5041-5.
- Holmes, K. C., D. Popp, et al.** (1990). "Atomic model of the actin filament." *Nature* 347(6288): 44-9.
- Huckriede, A., H. Hinssen, B. M. Jockusch, E. Lazarides** (1988). „Gelsolin sensitivity of microfilaments as a marker for muscle differentiation." *Eur J Cell Biol* 46(3): 506-12.
- Ishikawa, R., S. Yamashiro, F. Matsumura** (1989). "Differential modulation of actin-severing activity of gelsolin by multiple isoforms of cultured rat cell tropomyosin. Potentiation of protective ability of tropomyosins by 83-kDa nonmuscle caldesmon." *J Biol Chem* 264(13): 7490-7.

- Jancso, A., P. Graceffa** (1991). "Smooth muscle tropomyosin coiled-coil dimers. Subunit composition, assembly, and end-to-end interaction." *J Biol Chem* 266(9): 5891-7.
- Janmey, P. A., J. Lamp, et al.** (1992). "Phosphoinositide-binding peptides derived from the sequences of gelsolin and villin." *J Biol Chem* 267(17): 11818-23.
- Janmey, P. A., T. P. Stossel** (1987). "Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." *Nature* 325(6102): 362-4.
- Janmey, P. A., C. Chaponnier, S. E. Lind, K. S. Zaner, T. P. Stossel, H. L. Yin** (1985). „Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking." *Biochemistry* 24(14): 3714-23.
- Jeong, K. Y., H. Y. Yum, I. Y. Lee, H. I. Ree, C. S. Hong, D. S. Kim, T. S. Yong** (2004). "Molecular cloning and characterization of tropomyosin, a major allergen of *Chironomus kiiensis*, a dominant species of nonbiting midges in Korea." *Clin Diagn Lab Immunol* 11(2): 320-4.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, et al.** (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." *Nature* 347(6288): 37-44.
- Kabsch, W., J Vandekerckhove** (1992). "Structure and function of actin." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21: 49-76.
- Kaindl, A. M., F. Ruschendorf, A. Huebner, et al.** (2004). „Missense mutations of ACTA1 cause dominant congenital myopathy with cores." *J Med Genet* 41: 842-848.
- Kamada, S., H. Kusano, et al.** (1998). "A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8532-7.
- Khaitlina S. Y.** (2001). "Functional specificity of actin isoforms." *Int Rev Cytol* 202: 35-98.
- Kilhoffer, M. C., Y. Mely, D. Gérard** (1985). "The effect of plasma gelsolin on actin filaments. Ca²⁺-dependency of the capping and severing activities." *Biochem Biophys Res Commun* 131(3): 1132-8.

- Kinosian, H. J., L. A. Selden, J. E. Estes, L. C. Gershman** (1993). „Nucleotide binding to actin. Cation dependence of nucleotide dissociation and exchange.” *J Biol Chem* 268: 8683–8691.
- Koepf, E. K., L. D. Burtnick** (1992). “Interaction of plasma gelsolin with tropomyosin.” *FEBS Lett* 309(1): 56-8.
- Kothakota, S., T. Azuma, et al.** (1997). “Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis.” *Science* 278(5336): 294-8.
- Kouyama, T., K. Mihashi** (1981). “Fluorometry study of N-(pyrenyl)-iodoacetamid labeled F-Actin.” *Eur J Biochem* 114: 33–38.
- Kudryashov, D., M. Sawaya, H. Adisetiyo, T. Norcross, G. Hegyl, E. Reisler, T. Yeates** (2005). “The crystal structure of a cross-linked actin dimer suggests a detailed molecular interface in F-actin.” *PNAS* 102: 13105-13110.
- Kurth, M. C., L. Wang, J. Dingus, J. Bryan** (1983). „Purification and characterization of a gelsolin-actin complex from human platelets. Evidence for Ca^{2+} -insensitive functions.“ *J Biol Chem* 258: 10895-10903.
- Kwiatkowski, D. J.** (1999). “Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer.” *Curr Opin Cell Biol* 11(1): 103-8.
- Kwiatkowski, D. J., T. P. Stossel, et al.** (1986). „Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain.“ *Nature* 323(6087): 455-8.
- Kwiatkowski, D. J., R. Mehl, S. Izumo, B. Nadal-Ginard, H. L. Yin** (1988). „Muscle is the major source of plasma gelsolin.“ *J Biol Chem* 263: 8239-8243.
- Kwiatkowski, D. J., P. A. Janmey, H. L. Yin** (1989). “Identification of critical functional and regulatory domains in gelsolin.” *J Cell Biol* 108(5): 1717-26.

- Kyhse-Anderson, J.** (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Methods* 10(3-4): 203-9.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lamb, J. A., P. G. Allen, et al.** (1993). "Modulation of gelsolin function. Activation at low pH overrides Ca²⁺ requirement." *J Biol Chem* 268(12): 8999-9004.
- Lee, W. M., R. M. Galbraith** (1992). "The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity." *N Engl J Med* 326(20): 1335-41.
- Lees-Miller, J. P., D. M. Helfman** (1991). „The molecular basis for tropomyosin isoform diversity.“ *BioEssays* 13: 429-437.
- Lehrer, S. S., Y. D. Qian, et al.** (1989). "Assembly of the native heterodimer of *Rana esculenta* a tropomyosin by chain exchange." *Science* 246(4932): 926-8.
- Lehrer, S. S., W. F. Stafford, 3rd** (1991). "Preferential assembly of the tropomyosin heterodimer: equilibrium studies." *Biochemistry* 30(23): 5682-8.
- Li, F., H. Higgs** (2003). "The mouse formin mDial1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition." *Curr Biol* 13: 1335–1340.
- Lück, A., J. D'Haese, H. Hinssen** (1995). „A gelsolin-related protein from lobster muscle: cloning, sequence analysis and expression.“ *Biochem J* 305(3): 767-75.
- Maciver, S. K., D. Ternent, et al.** (2000). "Domain 2 of gelsolin binds directly to tropomyosin." *FEBS Lett* 473(1): 71-5.
- Marston, F.** (1986). "The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*." *Biochem J* 240: 1–12.
- Marston, S. B.** (1990). "A tight-binding interaction between smooth-muscle native thin filaments and heavy meromyosin in the presence of MgATP." *Biochem J* 259(1): 303-6.

- McLachlan, A. D., M. Stewart** (1975). "Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure." *J Mol Biol* 98(2): 293-304.
- McLaughlin, P. J., J. T. Gooch, et al.** (1993). "Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing." *Nature* 364(6439): 685-92.
- Milligan, R. A., M. Whittaker, D. Safer** (1990). "Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites." *Nature* 348(6298):217-21.
- Misawa, S., I. Kumagai** (1999). "Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies." *Biopolymers* 51: 297–307.
- Moore, P. B., H. E. Huxley, et al.** (1970). "Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments." *J Mol Biol* 50(2): 279-95.
- Nag, S., Q. Ma, H. Wang, R. C. Robinson, et al.** (2009). „Ca²⁺ binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin." *PNAS* 106(33): 13713-18.
- Olson, T. M., V. V. Michels, S. N. Thibodeau, Y. S. Tai, M. T. Keating** (1998). "Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure." *Science* 280: 750-752.
- Oosawa, F., et al.** (1983). "Studies on conformation of F-actin in muscle fibers in the relaxed state, rigor, and during contraction using fluorescent phalloidin." *J Cell Biol* 97(6):1663-7.
- Patkowski, A., J. Seils, H. Hinssen, T. Dorfmueller** (1990). „Size and shape of the gelsolin molecule and its ligand-induced conformational change in the presence of Ca²⁺." *Biopolymers* 30: 427-35.
- Perry, S. V.** (2001). "Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function." *J Muscle Res Cell Motil* 22(1): 5-49.
- Phillips, G. N., Jr., J. P. Fillers, et al.** (1986). "Tropomyosin crystal structure and muscle regulation." *J Mol Biol* 192(1): 111-31.
- Pittenger, M. F., J. A. Kazzaz, et al.** (1994). "Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms." *Curr Opin Cell Biol* 6(1): 96-104.

Pollard, T. D. (1990). "Actin" *Curr Opin Cell Biol* 2(1): 33-40.

Pollard, T. D. (1992). "Actin and actin-binding proteins, Bd1." Oxford university press.

Pollard, T. D., S. Almo, et al. (1994). "Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution." *Annu Rev Cell Biol* 10: 207-49.

Pollard, T. D., G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." *Cell* 112: 453-465.

Pollard, T. D., J. A. Cooper (1986). "Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions." *Annu Rev Biochem* 55: 987-1035.

Pope, B., S. Maciver, A. Weeds (1995). "Localization of the calcium-sensitive actin monomer binding site in gelsolin to segment 4 and identification of calcium binding sites." *Biochemistry* 34(5): 1583-8.

Potter, J. D., Z. Sheng, B. S. Pan, J. A. Zhao (1995). "A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction." *J Biol Chem* 270(6):2557-62.

Prasad, G. L., et al. (1993). "Expression of transduced tropomyosin 1 cDNA suppresses neoplastic growth of cells transformed by the ras oncogene." *PNAS* 90: 7039-43.

Prouty, W. F., A. L. Goldberg (1972). "Fate of abnormal proteins in *E. coli*. Accumulation in intracellular granules before catabolism." *Nature New Biol* 240: 147-150.

Remmert, K. (1999). „Aktin-modulierende Proteine des Muskels: Reinigung und Charakterisierung von Gelsolin aus Mollusken und von rekombinantem CapZ aus Vertebraten.“ Dissertation, Universität Bielefeld.

Rickard J. E., P. Sheterline (1988). "Effect of ATP removal and inorganic phosphate on length redistribution of sheared actin filament populations. Evidence for a mechanism of end-to-end annealing." *J Mol Biol* 201(4):675-81.

- Rouayrenc J. F., A. Fattoum, J. Gabion, E. Audemard, R. Kassab** (1984). "Muscle gelsolin: isolation from heart tissue and characterization as an integral myofibrillar protein." FEBS Lett 167: 52-58.
- Rubenstein, P. A.** (1990). "The functional importance of multiple actin isoforms." Bioessays 12: 309–315.
- Rudolph, R., H. Lilie** (1996). "In vitro folding of inclusion body proteins." FASEB J 10(1): 49–56.
- Ruiz-Opazo, N., B. Nadal-Ginard** (1987). "α-Tropomyosin Gene Organization." J Biol Chem 262(10): 4755-65.
- Ruiz-Silva, B. E., L. D. Burtnick** (1989). "Characterization of horse plasma Gelsolin." Biochem Cell Biol 68: 796-800.
- Sanders, C., L. B. Smillie** (1985). „Amino acid sequence of chicken gizzard beta-tropomyosin. Comparison of the chicken gizzard, rabbit skeletal, and equine platelet tropomyosins." J Biol Chem 260(12): 7264-75.
- Sanger, J. M., B. Mittal, A. Wegner, B. M. Jockusch, J. W. Sanger** (1987). „Differential response of stress fibers and myofibrils to gelsolin." Eur J Cell Biol 43(3): 421-8.
- Schäffner, J., J. Winter, R. Rudolph, E. Schwarz** (2001). "Cosecretion of chaperones and low-molecular-size medium additives increases the yield of rekombinat disulfid-bridged proteins." Appl and Environm Microbiol: 3994–4000.
- Schleicher, M., B. Andre, C. Andreoli, L. Eichinger, M. Haugwitz, A. Hofmann, J. Karakesisoglou, M. Stockelhuber, A. A. Noegel** (1995). „Structure/Function studies on the cytoskeletal proteins in Dictyostelium amoeba as a paradigm." FEBS Letter 369 (1) 38-42.
- Schoepper, B., A. Wegner** (1991). "Rate constants and equilibrium constants for binding of actin to the 1:1 gelsolin-actin complex." Eur J Biochem 202(3): 1127-31.
- Shah, V., et al.** (2001). "Cytoskeletal organization in Tropomyosin-mediated reversion of ras-transformation: evidence for rho kinase pathway." Oncogene 20: 2112-2121.

- Sheterline, P., J. C. Sparrow** (1994). "Actin." Protein Profile 1(1): 1-121.
- Smillie, L. B.** (1982). "Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins." Methods Enzymol 85: 234-41.
- Smillie, L. B., et al.** (1979). „Amino acid sequences of rabbit skeletal beta- and cardiac tropomyosins." FEBS Lett 105(2): 232-4.
- Smillie, L. B., et al.** (1977). „Polymerizability of rabbit skeletal tropomyosin: effects of enzymic and chemical modifications." Biochemistry 16(10): 2264-9.
- Smith, C. W., K. Pritchard, S. B. Marston** (1987). "The mechanism of Ca²⁺ regulation of vascular smooth muscle thin filaments by caldesmon and calmodulin." J Biol Chem 262(1): 116-22.
- Sobieszek, A.** (1977). "Ca-linked phosphorylation of a light chain of vertebrate smooth-muscle myosin." Eur J Biochem 73(2): 477-83.
- Sobue, K., Y. Muramoto, et al.** (1981). "Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin." Proc Natl Acad Sci U S A 78(9): 5652-5.
- Speed, M., D. Wang, J. King** (1996). "Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition." Nature Biotechnol 14: 1283–1287.
- Spudich, J. A., S. Watt** (1971). „The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biological studies of the interaction of the Tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin." J Biol Chem 246(15): 4866-71.
- Stella, M. C., H. Schauerte, K. L. Straub, M. Leptin** (1994). „Identification of secreted and cytoplasmic gelsolin in *Drosophila*." J Cell Biol 125: 607-16.
- Straub, F. B.** (1942). "Actin." Studies Med. Inst. Szeged 2 3-15
- Strzelecka-Golaszewska, H.** (2001). "Divalent cations, nucleotides and actin structure." Res Prob Cell Differ 32: 23–42.

- Steinmetz, M. O., K. N. Goldie, U. Aebi** (1997). „A correlative analysis of actin filament assembly, structure, and dynamics.” *J Cell Biol* 138(3):559-74.
- Stossel, T. P., C. Chaponnier, R. M. Ezzell, J. H. Hartwig, P. A. Janmey, D. J. Kwiatkowski, S. E. Lind, D. B. Smith, F. S. Southwick, H. L. Yin, et al.** (1985). “Nonmuscle actin-binding proteins.” *Annu Rev Cell Biol* 1:353-402.
- Sun, H. Q., K. Kwiatkowska, et al.** (1995). „Actin monomer binding proteins.“ *Curr Opin Cell Biol* 7(1): 102-10.
- Sun, H. Q., D. C. Wooten, et al.** (1994). “The actin side-binding domain of gelsolin also caps actin filaments. Implication for actin filament severing.” *J Biol Chem* 269(13): 9473-9.
- Sun, H. Q., M. Yamamoto, et al.** (1999). “Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein.” *J Biol Chem* 274(47): 33179-82.
- Takahashi, K., K. Hiwada, T. Kokubu** (1986). „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.
- Takenaga, K, A. Masuda** (1994). “Restoration of microfilament bundle organisation in v-raf-transformed NRK cells after transduction with tropomyosin 2 cDNA.” *Cancer Lett* 87: 47-53.
- Tanaka J., Sobue K.** (1994). „Localization and characterization of gelsolin in nervous tissue: gelsolin is specifically enriched in myelin-forming cells.” *J Neuroscience* 14:1038-1052.
- Teubner, A., I. Sobeck-Klocke, H. Hinssen, U. Eichenlaub-Ritter** (1994). „Distribution of gelsolin in mouse ovary.“ *Cell Tissue Res* 276: 535-544.
- Tsumoto, K., D. Ejima, I. Kumagai, T. Arakawa** (2003). „Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies.” *Prot Expres Purif* 28: 1–8.
- Unger, A., H. Hinssen** (2010). “Electron-microscopical localization of gelsolin in various crustacean muscles.” *Cell Tissue Res* 341(2): 313-23.

- Valentin-Ranc, C., M. F. Carlier** (1989). "Evidence of the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin. Binding of the lambda isomers of beta gamma-bidentate CrATP to actin." *J Biol Chem* 264(35): 20871-80.
- Vandekerckhove, J., K. Weber** (1978). "At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide." *J Mol Biol* 126(4): 783-802.
- Vandekerckhove, J., K. Weber** (1979). "The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. A protein-chemical analysis of muscle actin differentiation." *Differentiation* 14(3): 123-33.
- Vandekerckhove, J.** (1990). "Actin-binding proteins." *Curr Opin Cell Biol* 2(1):41-50.
- Vouyiouklis, D. A., P. J. Brophy** (1997). "A novel gelsolin isoform expressed by oligodendrocytes in the central nervous system." *J Neurochem* 69: 995-1005.
- Way, M., J. Gooch, et al.** (1989). "Expression of human plasma gelsolin in *Escherichia coli* and dissection of actin binding sites by segmental deletion mutagenesis." *J Cell Biol* 109(2): 593-605.
- Way, M., B. Pope, et al.** (1992). "Evidence for functional homology in the F-actin binding domains of gelsolin and alpha-actinin: implications for the requirements of severing and capping." *J Cell Biol* 119(4): 835-42.
- Way M., A. G. Weeds** (1988). "Nucleotide sequence of pig plasma gelsolin. Comparison of protein sequence with human Gelsolin and other actin-severing proteins show strong homologies and evidence for large internal repeats." *J Mol Biol* 203: 1127-1133.
- Way M., B. Pope, A. G. Weeds** (1992). "Are the conserved sequences of segment 1 of gelsolin important for binding actin?" *J Cell Biol* 116(5): 1135-43.
- Way M., B. Pope, J. Gooch, M. Hawkins, A. G. Weeds** (1990). "Identification of a region in segment 1 of Gelsolin critical for actin binding." *EMBO J* 9(12): 4103-9.
- Weeds, A., S. Maciver** (1993). "F-actin capping proteins." *Curr Opin Cell Biol* 5(1):63-9.

- Weeds, A. G., J. Gooch, B. Pope, H. E. Harris** (1986). "Preparation and characterization of pig plasma and platelet gelsolins." *Eur J Biochem* 161: 69-76.
- Weeds, A. G., H. Harris, W. Gratzner, J. Gooch** (1986). "Interactions of pig plasma gelsolin with G-actin." *Eur J Biochem* 161(1): 77-84.
- Wegner, A.** (1976). "Head to tail polymerization of actin." *J Mol Biol* 108(1): 139-50.
- Wegner, A.** (1982). "Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments." *J Mol Biol* 161(4): 607-15.
- Welch, M. D., A. Mallavarapu, et al.** (1997). "Actin dynamics in vivo." *Curr Opin Cell Biol* 9(1): 54-61.
- Weltman, J. K., R. P. Szaro, et al.** (1973). „N-(3-pyrene)maleimide: a long lifetime fluorescent sulfhydryl reagent.“ *J Biol Chem* 248(9): 3173-7.
- Wen, D., K. Corina, et al.** (1996). "The plasma and cytoplasmic forms of human gelsolin differ in disulfide structure." *Biochemistry* 35(30): 9709-9.
- Whitby, F. G., et al.** (1992). "Structure of tropomyosin at 9 angstroms resolution." *J Mol Biol* 227(2): 441-452.
- Whitby, F. G., G. N. Phillips** (2000). "Crystal structure of tropomyosin at 7 Angstroms resolution." *Proteins* 38(1): 49-59.
- Yin, H. L., P. A. Janmey** (2003). "Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton." *Annu Rev Physiol* 65: 761-89.
- Yin, H. L.** (1987). "Gelsolin: calcium- and polyphosphoinositide-regulated actin-modulating protein." *Bioessays* 7(4):176-9.
- Yin, H. L., K. Iida, P. A. Janmey** (1988). "Identification of a polyphosphoinositide-modulated domain in gelsolin which binds to the sides of actin filaments." *J Cell Biol* 106(3): 805-12.

Yin, H. L., T. P. Stossel (1979). „Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein.“ *Nature* 281(5732): 583-6.

Yin, H. L., T. P. Stossel (1980). „Purification and structural properties of gelsolin, a Ca^{2+} -activated regulatory protein of macrophages.“ *J Biol Chem* 255: 9490-9493.

Yin, H. L., J. H. Hartwig, K. Maruyama, T. P. Stossel (1981). „ Ca^{2+} control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization.“ *J Biol Chem* 256(18): 9693-7.

Yin, H. L., K. S. Zaner, T. P. Stossel (1980). „ Ca^{2+} control of actin gelation. Interaction of gelsolin with actin filaments and regulation of actin gelation“. *J Biol Chem* 255: 9494-9500.

Yu, F., Sun, H., Janmey, P., Yin, H. (1992). “Identification of a Polyphosphoinositide-binding Sequence in an Actin Monomer-binding Domain of Gelsolin“. *J Biol Chem* 267 (21): 14616–14621.

Abkürzungsverzeichnis

[X]	Konzentration von X
a	anti
ABP	Aktinbindeprotein
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat-p-Toluidinsalz
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>)
cDNA	Komplementäre DNA
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DTT	1,4-Dithio-(DL)-Treithol
DNase	Desoxyribonuclease
EDC	1-Ethyl-3-(diethylaminopropyl)-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl-)Tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
F-Aktin	Filamentöses Aktin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-Aktin	Globuläres Aktin
GM	Glattmuskel
SKM	Skelettmuskel
kDa	kDa
l	Liter
M	mol·l ⁻¹ (Molar)
m	milli
min	Minute
NBT	Nitroblautetrazoliumsals
p	pico oder „vom Schwein“ (<i>porcine</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pgs	Schweinegelsolin (<i>pig gelsolin</i>)
PIP ₂	Phosphatidyl-4,5-Inositolphosphat
Pyren	N-(1-pyrenyl)-iodoacetamid
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
TM α	Tropomyosin α
TMAE	Trimethylaminoethyl
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrodaminisothiocyanat
Triton-X	Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
ü.N.	über Nacht